

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 216**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 31/396 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2005 E 10178998 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2260835**

54 Título: **Composición para la inhibición del proteasoma**

30 Prioridad:

07.12.2004 US 634366 P

23.02.2005 US 655930 P

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

19.06.2013

73 Titular/es:

ONYX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

249 East Grand Avenue

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

LEWIS, EVAN R.;

HO, MARK NGUYEN y

FONSECA, FABIANA N.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 408 216 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

Composición para la inhibición del proteasoma

Antecedentes de la invención

5 El proteasoma ha sido validado como una diana terapéutica, tal como se demuestra por la reciente aprobación por parte de la FDA de oxbortezomib, un inhibidor del proteasoma de ácido borónico, para el tratamiento del mieloma múltiple. Sin embargo, recientemente se han descrito otros inhibidores del proteasoma más altamente específicos que podrían tener menos efectos secundarios tóxicos. Estos compuestos incluyen epoxi cetonas de péptido, tales como epoxomicina y péptido (b) descritos en la Patente US N° 6.831.099, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria por referencia, y el péptido (a) descrito en la solicitud provisional US N° 60/569.096, presentada el 7 de Mayo de 2004, cuyo contenido se
10 incorpora a la presente memoria por referencia. Sin embargo, la baja solubilidad acuosa de algunos de estos compuestos hace difícil formular composiciones con una biodisponibilidad óptima. De esta manera, se necesitan procedimientos adicionales de formulación de epoxi cetonas de péptido.

Sumario de la invención

15 Ahora, se ha encontrado que la solubilidad de los inhibidores del proteasoma, tales como las epoxi cetonas de péptido mostradas en la reivindicación 1, se mejora considerablemente cuando se formulan con una ciclodextrina.

En una realización, la presente invención es una composición farmacéutica que incluye un inhibidor del proteasoma prácticamente insoluble, una ciclodextrina y, opcionalmente, un tampón. Típicamente, dichas composiciones farmacéuticas incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor del proteasoma que, por ejemplo, mejora los efectos de enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer), afecciones inmunológicas, enfermedades degenerativas del músculo, cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, fiebre, enfermedad muscular, denervación, lesión nerviosa y/o ayuno, entre otros, cuando se administra a un paciente.

20

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones antiinflamatorias que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del proteasoma, una ciclodextrina y, opcionalmente, un tampón.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de estas preparaciones para la fabricación de un fármaco para su uso en un procedimiento de tratamiento. Los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, inhibir o reducir la infección del VIH en un sujeto; afectar el nivel de expresión génica viral en un sujeto; alterar la diversidad de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma en un organismo; determinar si un proceso o salida celular, de desarrollo o fisiológico en un organismo está regulado por la actividad proteolítica de una Ntn hidrolasa particular; tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto; reducir la tasa de degradación de proteína muscular en una célula, reducir la tasa de degradación de proteína intracelular en una célula; reducir la tasa de degradación de proteína p53 en una célula; inhibir el crecimiento de cánceres relacionados con p53 en un sujeto; inhibir la presentación de antígeno en una célula; suprimir el sistema inmune de un sujeto (por ejemplo, afecciones tales como choque séptico, psoriasis, rechazo de injerto y artritis reumatoide); inhibir la degradación I κ - α en un organismo; reducir el contenido de NF- α B en una célula, músculo, órgano o sujeto; afectar a los ciclos de células eucariotas dependientes de ciclina; tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto; afectar a la regulación dependiente de proteasoma de oncoproteínas en una célula; tratar el crecimiento de un cáncer en un sujeto; tratar la apoptosis relacionada con p53 en un sujeto, y detectar proteínas procesadas por hidrolasas nucleófilas N-terminales en una célula.

25

30

35

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la solubilidad del péptido (a) a varios valores de pH en soluciones acuosas al 10% (p/v) de sulfobutil éter de beta-ciclodextrina (SBECD)/10 mM de citrato de sodio.

La Figura 2 muestra el porcentaje de péptido (a) restante en las soluciones acuosas al 10% (p/v) SBECD/10 mM citrato de sodio con el tiempo, a varios valores de pH.

Descripción detallada

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen un inhibidor del proteasoma prácticamente insoluble, una ciclodextrina y, opcionalmente, un tampón.

La cantidad de inhibidor del proteasoma que puede ser solubilizada depende de diversos parámetros. Uno de dichos parámetros es el pH. Tal como se muestra en la Figura 1, un mayor valor de pH resulta en una solubilidad más baja de un compuesto básico, y se esperaría que un pH más bajo disminuyese la solubilidad de un compuesto ácido, tal como es

50

bien conocido en la técnica. Sin embargo, debería seleccionarse un pH para proporcionar una estabilidad adecuada del inhibidor del proteasoma. Por ejemplo, un pH menor resulta en una menor estabilidad química de uno de dichos compuestos, tal como se demuestra en la Figura 2. Los efectos del pH sobre la estabilidad y la solubilidad de un compuesto se pueden determinar fácilmente usando procedimientos ampliamente conocidos en la técnica y divulgados en la presente memoria. Para las formulaciones a administrar a un mamífero, el pH es, preferiblemente, de pH 2,5 a pH 9.

En muchas composiciones de la invención, la fuente principal de control del pH es el tampón. Típicamente, el tampón está presente como un ácido o una base y su base o ácido conjugado, respectivamente. En una realización, el rango de sal de tamponamiento es 1-100 mM, preferiblemente, entre 5-50 mM, más preferentemente, de aproximadamente 10 mM (en formulaciones sólidas, la cantidad de tampón está seleccionado para producir esta concentración después de la reconstitución/dilución). La concentración de tampón y el pH de la solución se eligen ventajosamente para proporcionar el equilibrio óptimo entre solubilidad y estabilidad.

Los ejemplos de tampones adecuados incluyen mezclas de ácidos débiles y sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio) de la base conjugada de ácidos débiles tales como tartrato de sodio y citrato de sodio. El tampón preferente es citrato de sodio/ácido cítrico.

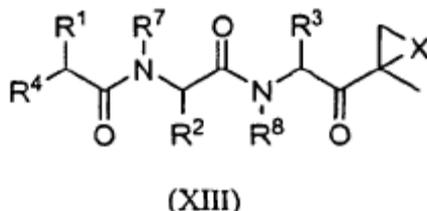
Las ciclodextrinas de la invención incluyen hidroxipropil beta-ciclodextrina (HPBCD) y sulfobutiléter beta-ciclodextrina (SBECD), preferentemente SBECD.

Una realización particular de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende de 1 a 5 mg/ml de un inhibidor del proteasoma, del 5% al 25% (p/v) de una ciclodextrina, tal como HPBCD o SBECD y de 5 mM a 20 mM de un tampón que produce un pH de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 6, por ejemplo, una solución de 2 mg/ml de un inhibidor del proteasoma (péptido (a)), 10% (p/v) SBECD, 10 mM citrato de sodio, pH 3,5. El uso de ciclodextrinas para disolver formulaciones de fármacos insolubles en agua se describe, entre otros, en Liu (Water-insoluble drug formulation) Interpharm press, Denver, páginas 111-130 (2009).

Inhibidores del proteasoma

Algunos inhibidores del proteasoma similares a los de la reivindicación 1 se describen en Chemistry and Biology, 6 (11), páginas 411 - 420 (1995).

Los inhibidores del proteasoma tienen una estructura de Fórmula (XIII) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,



en la que

cada Ar es independientemente un grupo heteroaromático de 5-6 miembros, sustituido opcionalmente con 1 a 4 sustituyentes;

L está seleccionado de entre C=O, y SO₂

X es O;

Y está ausente;

Z está ausente;

Cada R¹, R², y R³ está seleccionado, independientemente, de entre alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxialquilo C₁₋₆, arilo, aralquilo C₁₋₆, heteroarilo, heteroalquilo C₁₋₆, heterociclilo y heterocicloalquilo C₁₋₆;

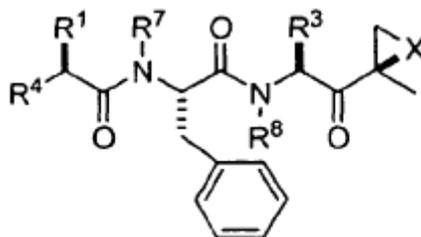
R⁴ es N(R⁵)L-Z-R⁶;

R⁵ es hidrógeno;

R⁶ está seleccionado de entre un heterociclilo; y

R^7 y R^8 están seleccionados de entre hidrógeno.

En realizaciones preferentes, el inhibidor tiene una estructura de Fórmula (XV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(XV)

en la que:

cada R^1 y R^3 está seleccionado, independientemente, de entre alquilo C_{1-6} , hidroxialquilo C_{1-6} , alcoxialquilo C_{1-6} y arilo y aralquilo C_{1-6} .

Definiciones

El término "alquilo C_{x-y} " se refiere a grupos hidrocarburos saturados, sustituidos o no sustituidos, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal y grupos alquilo de cadena ramificada que contienen de x a y átomos de carbono en la cadena, incluyendo grupos haloalquilo, tales como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc.

El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo que tiene un oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, tert-butoxi y similares.

El término "alcoxialquilo C_{1-6} " se refiere a un grupo alquilo C_{1-6} sustituido con un grupo alcoxi, formando, de esta manera, un éter.

El término "aralquilo C_{1-6} ", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo C_{1-6} sustituido con un grupo arilo.

El término "arilo", tal como se usa en la presente memoria, incluye grupos aromáticos, sustituidos o no sustituidos, de un solo anillo de 5, 6 y 7 miembros en los que cada átomo del anillo es carbono. El término "arilo" incluye también sistemas anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos en los que al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclicos. Los grupos arilo incluyen benceno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina y similares.

El término "tampón" es una sustancia que, debido a su presencia en solución, aumenta la cantidad de ácido o álcali que hay que añadir para causar un cambio de una unidad en el pH. De esta manera, un tampón es una sustancia que ayuda a regular el pH de una composición. Típicamente, un tampón se escoge en base al pH deseado y la compatibilidad con otros componentes de una composición. En general, un tampón tiene un valor pK_a que no es superior a 1 unidad menor, o mayor que el pH deseado de la composición (o el que producirá la composición después de la disolución).

El término "heteroalquilo C_{1-6} ", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo C_{1-6} sustituido con un grupo heteroarilo.

El término "heteroarilo" incluye estructuras anillo aromáticas, sustituidas o no sustituidas, de 5 a 7 miembros, más preferiblemente anillos de 5 - 6 miembros, cuyas estructuras anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. El término "heteroarilo" incluye también sistemas anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos en los que al menos uno de los anillos es heteroaromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclicos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares.

El término "heteroátomo", tal como se usa en la presente memoria, significa un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los heteroátomos preferentes son nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre.

El término "heterociclilo" o la expresión "grupo heterocíclico" se refieren a estructuras anillo, sustituidos o no sustituidos, no aromáticos, de 3 a 10 miembros, más preferiblemente, anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. El término "heterociclilo" o la expresión "grupo heterocíclico" incluye también sistemas anillo policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos en los que al menos uno de los anillos es heterocíclico, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas y similares.

El término "hidroxialquilo C₁₋₆" se refiere a un grupo alquilo C₁₋₆ sustituido con un grupo hidroxilo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor" se usa para describir un compuesto que bloquea o reduce una actividad de una enzima, en este caso la inhibición de la escisión proteolítica de sustratos peptídicos fluorogénicos estándar, tales como suc-LLVY-AMC, Box-LLR-AMC y Z-LLE-AMC, la inhibición de diversas actividades catalizadoras del proteasoma 20S. Un inhibidor puede actuar con inhibición competitiva o no competitiva. Un inhibidor puede unirse reversible o irreversiblemente y, por lo tanto, el término incluye compuestos que son sustratos suicidas de una enzima. Un inhibidor puede modificar uno o más sitios en o cerca del sitio activo de la enzima, o puede causar un cambio conformacional en cualquier otra parte de la enzima.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "péptido" incluye no sólo un enlace amida estándar con α -sustituyentes estándares, si no también peptidomiméticos usados comúnmente, otros enlaces modificados, cadenas laterales que no ocurren naturalmente y modificaciones de cadena lateral, tal como se detalla en la presente memoria.

Los términos "policiclilo" o "policíclico" se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, por ejemplo, los anillos son "anillos fusionados". Cada uno de los anillos del policiclo puede ser sustituido o no sustituido.

La expresión "prácticamente insoluble" se refiere a inhibidores del proteasoma que tienen, generalmente, una solubilidad de menos de 0,1 mg/ml en agua. La invención incluye también inhibidores del proteasoma que tienen una solubilidad en agua de menos de 0,05 mg/ml e incluso menor que 0,01 mg/ml.

La expresión tratamiento "profiláctico o terapéutico" es reconocida en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones objetivo. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), entonces el tratamiento es profiláctico, (es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada), mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico, (es decir, está dirigido a disminuir, mejorar o estabilizar la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

El término "proteasoma", tal como se usa en la presente memoria, se entiende que incluye inmuno-proteasomas y proteasomas constitutivas.

El término "sustituido" se refiere a fracciones que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más átomos distintos de hidrógeno de la molécula. Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluyen la condición implícita de que dicha sustitución es compatible con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución resulta en un compuesto estable, por ejemplo, que no sufre una transformación espontánea, tal como mediante una reorganización, ciclación, eliminación, etc. Tal como se usa en la presente memoria, se contempla que el término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos, de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más y el mismo o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Para los propósitos de la presente invención, los heteroátomos, tales como nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en la presente memoria que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, alcoxycarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo o una fracción aromática o heteroaromática. Las personas con conocimientos ordinarios en la materia entenderán que, si se considera apropiado, las propias fracciones sustituidas en la cadena de hidrocarburo pueden ser sustituidas.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto con respecto al presente procedimiento de tratamiento, se refiere a una cantidad del compuesto o compuestos en una preparación que, cuando se administra como parte de un régimen de dosificación deseado (a un mamífero, preferiblemente, un ser humano), alivia un síntoma, mejora una afección, o retrasa la aparición de condiciones de enfermedad según unas normas clínicamente aceptables para el trastorno o afección a tratar o con un propósito cosmético, por ejemplo, con una relación beneficio/riesgo razonable

aplicable a cualquier tratamiento médico.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratar" o "tratamiento" incluye invertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos y patología subyacente de una afección de manera que mejora o estabiliza la afección de un sujeto.

Usos de las composiciones

5 Las consecuencias biológicas de la inhibición del proteasoma son numerosas. La inhibición del proteasoma ha sido sugerida como una prevención y/o un tratamiento de una multitud de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades proliferativas, enfermedades neurotóxicas/degenerativas, enfermedad de Alzheimer, afecciones isquémicas, inflamación, enfermedades autoinmunes, VIH, cáncer, rechazo a injerto de órganos, choque séptico, inhibición de la presentación de antígenos, disminución de la expresión de genes virales, infecciones parasitarias, afecciones asociadas con acidosis, degeneración macular, afecciones pulmonares, enfermedades de desgaste muscular, enfermedades fibróticas, enfermedades óseas y de crecimiento del cabello. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas para compuestos específicos de proteasoma, muy potentes, tales como las moléculas de la clase epoxi cetona, proporcionan un medio de administrar el fármaco al paciente y tratar estas afecciones.

10 A nivel celular, se ha informado acerca de acumulación de proteínas poliubiquitinadas, cambios morfológicos celulares y apoptosis después del tratamiento de las células con diversos inhibidores del proteasoma. Se ha sugerido también la inhibición del proteasoma como una posible estrategia terapéutica antitumoral. El hecho de que la epoxomicina se identificó inicialmente en un cribado para compuestos antitumorales valida el proteasoma como un objetivo quimioterapéutico antitumoral. Por consiguiente, estas composiciones son útiles para el tratamiento del cáncer. La inhibición del proteasoma se ha asociada también con la inhibición de NF- κ B, la activación y la estabilización de los niveles de p53. De esta manera, las composiciones de la invención pueden usarse también para inhibir la activación de NF- κ B, y para estabilizar los niveles de p53 en un cultivo celular. Debido a que NF- κ B es un regulador clave de inflamación, es un objetivo atractivo para una intervención terapéutica anti-inflamatoria. De esta manera, las composiciones de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones asociadas con la inflamación, incluyendo, pero no sin limitarse a, EPOC, psoriasis, bronquitis, enfisema y fibrosis quística.

25 Las composiciones divulgadas pueden usarse para tratar afecciones mediadas directamente por la función proteolítica del proteasoma, tal como desgaste muscular, o mediadas indirectamente a través de proteínas que son procesadas por el proteasoma, tales como NF- κ B. El proteasoma participa en la eliminación rápida y el procesamiento post-traduccionales de proteínas (por ejemplo, enzimas) implicados en la regulación celular (por ejemplo, ciclo celular, transcripción de genes y rutas metabólicas), comunicación intercelular y la respuesta inmune (por ejemplo, presentación de antígenos). Los ejemplos específicos descritos más adelante incluyen la proteína β -amiloide y proteínas reguladoras, tales como ciclinas y factor de transcripción NF- κ B.

30 Otra realización de la invención es el uso de las composiciones divulgadas en la presente invención para el tratamiento de enfermedades y afecciones neurodegenerativas, incluyendo, pero sin limitarse a, daño cerebral, accidente isquémico al sistema nervioso, trauma neural (por ejemplo, daño cerebral percusivo, lesión de la médula espinal y daño traumático al sistema nervioso), esclerosis múltiple y otras neuropatías mediadas inmunológicamente (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barre y sus variantes, neuropatía motora axonal aguda, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y síndrome de Fisher), demencia compleja de VIH/SIDA, axonomía, neuropatía diabética, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, meningitis bacteriana, parasitaria, fúngica y viral, encefalitis, demencia vascular, demencia multi-infarto, demencia de cuerpo de Lewy, demencia del lóbulo frontal tal como enfermedad de Pick, demencias subcorticales (tales como Huntington o la parálisis supranuclear progresiva), síndromes de atrofia cortical focal (tal como afasia primaria), demencias metabólicas-tóxicas (tales como hipotiroidismo crónico o deficiencia de B12) y demencias causadas por infecciones (tales como sífilis o meningitis crónica).

35 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por depósitos extracelulares de proteína β -amiloide (β -AP) en placas seniles y vasos cerebrales. La β -AP es un fragmento peptídico de 39 a 42 aminoácidos derivada de un precursor de la proteína amiloide (APP). Se conocen al menos tres isoformas de APP (de 695, 751 y 770 aminoácidos). El corte y empalme alternativo del ARNm genera las isoformas; el procesamiento normal afecta a una parte de la secuencia β -AP, evitando, de esta manera, la generación de β -AP. Se cree que el procesamiento anormal de la proteína por el proteasoma contribuye a la abundancia de β -AP en el cerebro con Alzheimer. La enzima de procesamiento de APP en ratas contiene aproximadamente diez subunidades diferentes (22 kDa-32 kDa). La subunidad de 25 kDa tiene una secuencia N-terminal de X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, que es idéntica a la subunidad β de macropain humana (Kojima, S. et al., Fed. Eur. Biochem. Soc., (1992) 304:57-60). La enzima de procesamiento de APP corta en el enlace Gln¹⁵ - Lys¹⁶; en presencia de iones de calcio, la enzima corta también en el enlace Met¹ - Asp¹, y los enlaces Asp¹ - Ala² para liberar el dominio extracelular de β -AP.

55 Por lo tanto, una realización es un procedimiento de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que incluye la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición divulgada en la presente invención. Dicho

tratamiento incluye la reducción de la tasa de procesamiento de β -AP, la reducción de la tasa de formación de placa de β -AP, la reducción de la tasa de generación de β -AP y la reducción de los signos clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

Otras realizaciones de la invención se refieren a caquexia y enfermedades de atrofia muscular. El proteasoma degrada muchas proteínas en eritrocitos de maduración y fibroblastos en crecimiento. En células privadas de insulina o suero, la tasa de proteólisis casi se duplica. La inhibición del proteasoma reduce la proteólisis, reduciendo, de esta manera, tanto la pérdida de proteína muscular como la carga nitrogenada en los riñones o el hígado. Los inhibidores de la invención son útiles para tratar afecciones tales como cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, fiebre, desuso muscular (atrofia) y denervación, lesión nerviosa, ayuno, insuficiencia renal asociada con acidosis y fallo hepático. Véase, por ejemplo, Goldberg, patente US Nº 5.340.736. Por lo tanto, las realizaciones de la invención comprenden procedimientos para:

reducir la tasa de degradación de proteína muscular en una célula, reducir la tasa de degradación de proteínas intracelulares, reducir la tasa de degradación de proteína p53 en una célula, e inhibir el crecimiento de cánceres relacionados con p53. Cada uno de estos procedimientos incluye poner en contacto una célula (*in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, un músculo en un sujeto) con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria.

La fibrosis es la formación excesiva y persistente de tejido cicatricial resultante del crecimiento hiperproliferativo de fibroblastos y está asociada con la activación de la vía de señalización de TGF- β . La fibrosis implica una deposición extensa de matriz extracelular y puede ocurrir dentro de prácticamente cualquier tejido o a través de diversos tejidos diferentes. Normalmente, el nivel de proteína de señalización intracelular (Smad) que activa la transcripción de genes objetivo tras la estimulación de TGF- β está regulado por la actividad del proteasoma (Xu et al., 2000). Sin embargo, la degradación acelerada de los componentes de señalización TGF- β ha sido observada en cánceres y otras afecciones hiperproliferativas. De esta manera, ciertas realizaciones de la invención se refieren a un procedimiento para tratar afecciones hiperproliferativas tales como retinopatía diabética, degeneración macular, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, nefropatía por IgA, cirrosis, atresia biliar, insuficiencia cardíaca congestiva, esclerodermia, fibrosis inducida por radiación y fibrosis pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad vascular de colágeno, sarcoidosis, enfermedades pulmonares intersticiales y trastornos pulmonares extrínsecos). El tratamiento de víctimas quemadas se ve obstaculizado, frecuentemente, por la fibrosis; de esta manera, una realización adicional de la invención es la administración tópica o sistémica de los inhibidores para tratar quemaduras. El cierre de una herida después de una cirugía se asocia frecuentemente con cicatrices desfigurantes, que pueden prevenirse mediante la inhibición de la fibrosis. De esta manera, en ciertas realizaciones, la invención se refiere a un procedimiento para la prevención o la reducción de cicatrices.

Otra proteína procesada por el proteasoma es NF- κ B, un miembro de la familia de proteínas Rel. La familia Rel de proteínas activadoras transcripcionales puede dividirse en dos grupos. El primer grupo requiere un procesamiento proteolítico, e incluye p50 (NF- κ B1, 105 kDa) y p52 (NF- κ 2, 100 kDa). El segundo grupo no requiere un procesamiento proteolítico, e incluye p65 (RelA, Rel (c-Rel), y RelB). Los homo- y heterodímeros pueden estar formados por miembros de la familia Rel; NF- κ B, por ejemplo, es un heterodímero p50-p65. Después de la fosforilación y ubiquitinación de I κ B y p105, las dos proteínas se degradan y se procesan, respectivamente, para producir NF- κ B activa que se transloca desde el citoplasma al núcleo. La p105 ubiquitinada es procesada también por proteasomas purificados (Palombella et al., Cell (1994) 78:773-785). La NF- κ B activa forma un complejo potenciador estereoespecífico con otros activadores transcripcionales y, por ejemplo, HMG I (Y), induciendo una expresión selectiva de un gen particular.

NF- κ B regula genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria y en eventos mitóticos. Por ejemplo, NF- κ B es necesaria para la expresión gen κ de inmunoglobulina de cadena ligera, el gen de receptor de IL-2 de cadena α , el gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, y una serie de genes de citoquinas que codifican, por ejemplo, IL-2, IL-6, factor estimulante de colonias granulocíticas, y IFN- β (Palombella et al., Cell (1994) 78:773-785). Algunas realizaciones de la invención incluyen procedimientos para afectar el nivel de expresión de IL-2, MHC-I, IL-6, TNF α , IFN- β o cualquiera de las otras proteínas indicadas anteriormente, incluyendo cada procedimiento de administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición divulgada en la presente memoria. Los complejos que incluyen p50 son mediadores rápidos de respuestas inflamatorias e inmune agudas (Thanos, D. y Maniatis, T., Cell (1995) 80:529-532).

NF- κ B participa también en la expresión de los genes de adhesión celular que codifican E-selectina, P-selectina, ICAM y VCAM-1 (Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68:499-508). Una realización de la invención es un procedimiento para inhibir la adhesión celular (por ejemplo, la adhesión celular mediada por E-selectina, P-selectina, ICAM o VCAM-1), incluyendo poner en contacto una célula con (o administrar a un sujeto) una cantidad eficaz de una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria.

La isquemia y la lesión por reperfusión resultan en hipoxia, una afección en la que hay una deficiencia de oxígeno que llega a los tejidos del cuerpo. Esta afección causa un aumento de la degradación de I κ B α , resultando, de esta manera, en la activación de NF- κ B (Koong et al., 1994). Se ha demostrado que la gravedad de la lesión que resulta en hipoxia puede reducirse con la administración de un inhibidor del proteasoma (Gao et al, 2000; Bao et al, 2001; Pye et al, 2003). Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención se refieren a un procedimiento de tratamiento de una afección isquémica o

lesión por reperfusión que comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto divulgado en la presente memoria. Los ejemplos de dichas afecciones o lesiones incluyen, pero no se limitan a, síndrome coronario agudo (placas vulnerables), enfermedad oclusiva arterial (cardíaca, cerebral, oclusiones arteriales periféricas y vasculares), aterosclerosis (esclerosis coronaria, enfermedad de la arteria coronaria), infartos, insuficiencia cardíaca, pancreatitis, hipertrofia de miocardio, estenosis y reestenosis.

NF- κ B se une también específicamente al potenciador/promotor de VIH. Cuando se compara con el Nef de mac239, la proteína Nef de pbj14 reguladora de VIH difiere en dos aminoácidos en la región que controla la unión a la proteína quinasa. Se cree que la proteína quinasa señala la fosforilación de I κ B, provocando la degradación de I κ B a través de la ruta de ubiquitina-proteasoma. Después de la degradación, se libera NF- κ B en el núcleo, mejorando, de esta manera, la transcripción del VIH (Cohen, J., Science, (1995) 267:960). Dos realizaciones de la invención son un procedimiento para inhibir o reducir la infección por VIH en un sujeto, y un procedimiento para reducir el nivel de expresión de genes víricos, incluyendo cada procedimiento la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una composición divulgada en la presente memoria.

La sobreproducción de citoquinas inducida por lipopolisacárido (LPS), tales como Tufa, se considera que es central a los procesos asociados con el choque séptico. Además, se acepta generalmente que la primera etapa en la activación de las células por LPS es la unión de LPS a receptores específicos de membrana. Las subunidades α y β del complejo proteasoma 20S se han identificado como proteínas de unión a LPS, lo que sugiere que la transducción de señal inducida por LPS puede ser un importante objetivo terapéutico en el tratamiento o prevención de sepsis (Qureshi, N. et al., J. Immun. (2003) 171: 1515-1525). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden ser usadas para la inhibición de TNF α para prevenir y/o tratar el choque séptico.

La proteólisis intracelular genera pequeños péptidos para su presentación a los linfocitos T para inducir respuestas inmunes mediadas por MHC de clase I. El sistema inmune realiza un cribado de células autólogas que están infectadas por virus o han experimentado una transformación oncogénica. Una realización es un procedimiento para inhibir la presentación del antígeno en una célula, incluyendo la exposición de la célula a una composición descrita en la presente memoria. Una realización adicional es un procedimiento para suprimir el sistema inmune de un sujeto (por ejemplo, inhibir el rechazo a un trasplante, alergia, asma), incluyendo la administración al sujeto de una cantidad eficaz de una composición descrita en la presente memoria. Las composiciones de la invención pueden usarse también para tratar enfermedades autoinmunes, tales como lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias del intestino, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Otra realización adicional es un procedimiento para alterar el repertorio de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma u otros Ntn con actividad multicatalítica. Por ejemplo, si la actividad PGPH del proteasoma 20S es inhibida selectivamente, un conjunto diferente de péptidos antigénicos serán producidos por el proteasoma y serán presentados en moléculas del MHC sobre la superficie de las células que serían producidas y presentadas sin ninguna inhibición enzimática, o, por ejemplo, con una inhibición selectiva de la actividad similar a quimotripsina del proteasoma.

Ciertos inhibidores del proteasoma bloquean la degradación y el procesamiento de NF- κ B ubiquitinada *in vitro* e *in vivo*. Los inhibidores del proteasoma bloquean también la degradación de I κ B- α y la activación de NF- κ B (Palombella, et al. Cell (1994) 78:773-785, y Traenckner, et al, EMBO J. (1994) 13:5433-5441). Una realización de la invención es un procedimiento para inhibir la degradación de I κ B- α , que incluye poner en contacto la célula con una composición descrita en la presente memoria. Una realización adicional es un procedimiento para reducir el contenido celular de NF- κ B en una célula, músculo, órgano o sujeto, incluyendo poner en contacto la célula, músculo, órgano o sujeto con una composición descrita en la presente memoria.

Otros factores de transcripción eucariotas que requieren procesamiento proteolítico incluyen el factor de transcripción general TFIIA, proteína accesoria (factor de célula huésped) del virus VP 16 del herpes simple, proteína 2 del factor regulador del IFN inducible por virus, y la proteína 1 del elemento de unión regulador de esterol unido a membrana.

Otras realizaciones de la invención son procedimientos para afectar a los ciclos de células eucariotas dependientes de ciclina, incluyendo la exposición de una célula (*in vitro* o *in vivo*) a una composición divulgada en la presente memoria. Las ciclinas son proteínas implicadas en el control del ciclo celular. El proteasoma participa en la degradación de ciclinas. Los ejemplos de ciclinas incluyen ciclinas mitóticas, ciclinas G1 y ciclina B. La degradación de las ciclinas permite a una célula salir de una fase del ciclo celular (por ejemplo, mitosis) y entrar a otra (por ejemplo, división). Se cree que todas las ciclinas están asociadas con la proteína quinasa p34^{cdc2} o quinasas relacionadas. La señal dirigida a proteólisis está localizada en los aminoácidos 42-RAALGNISEN-50 (caja de destrucción). Hay evidencia de que la ciclina es convertida a una forma vulnerable a una ubiquitina ligasa o de que una ligasa específica de ciclina es activada durante la mitosis (Ciechanover, A., Cell, (1994) 79:13-21). La inhibición del proteasoma inhibe la degradación de la ciclina y, por lo tanto, inhibe la proliferación celular, por ejemplo, en cánceres relacionados con ciclina (Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:7071-7075). Una realización de la invención es un procedimiento para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto (por ejemplo, cáncer, psoriasis o reestenosis), incluyendo la administración al sujeto de una cantidad eficaz

de una composición divulgada en la presente memoria. La invención incluye también un procedimiento para tratar la inflamación relacionada con ciclina en un sujeto, incluyendo la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente memoria.

5 Las realizaciones adicionales son procedimientos para afectar a la regulación dependiente de proteasoma de oncoproteínas y procedimientos para tratar o inhibir el crecimiento del cáncer, incluyendo cada procedimiento la exposición de una célula (*in vivo*, por ejemplo, en un sujeto, o *in vitro*) a una composición divulgada en la presente memoria. Las proteínas E6 derivadas de HPV-16 y HPV-18 estimulan la conjugación y degradación de p53 dependientes de ATP y ubiquitina en lisados crudos de reticulocitos. Se ha demostrado que el oncogén p53 recesivo se acumula a la temperatura no permisiva en una línea celular con una E1 termolábil mutada. Los niveles elevados de p53 pueden conducir a apoptosis. Los ejemplos de proto-oncoproteínas degradadas por el sistema ubiquitina incluyen c-Mos, c-Fos y c-Jun. Una realización es un procedimiento para tratar la apoptosis relacionada con p53, que incluye administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición divulgada en la presente memoria.

15 En otra realización, las composiciones divulgadas son útiles para el tratamiento de una infección parasitaria, tal como infecciones causadas por parásitos protozoarios. Se considera que el proteasoma de estos parásitos está implicado principalmente en las actividades de diferenciación y replicación celular (Paugam y col., Trends Parasitol. 2003, 19 (2): 55-59). Además, se ha demostrado que las especies de Entamoeba pierden capacidad de enquistamiento cuando se exponen a inhibidores del proteasoma (Gonzales, y col., Arch. Med. Res. 1997, 28, Spec No: 139-140). En algunas de dichas realizaciones, las composiciones divulgadas son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en humanos causadas por un parásito protozoario seleccionado de entre Plasmodium sps. (Incluyendo P. falciparum, P. vivax, P. malariae y P. ovale, que causan la malaria), Trypanosoma sps. (incluyendo T. cruzi, causante de la enfermedad de Chagas, y T. brucei, que causa la enfermedad del sueño africana), Leishmania sps. (incluyendo L. amazonensis, L. donovani, L. infantum, L. mexicana, etc), Pneumocystis carinii (un protozoo que se sabe que causa neumonía en pacientes de SIDA y otros pacientes inmunodeprimidos), Toxoplasma gondii, Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens y Giardia lamblia. En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en animales y ganado causadas por un parásito protozoario seleccionado de entre Plasmodium hermani, Cryptosporidium sps., Echinococcus granulosus, Eimeria tenella, Sarcocystis neurona y Neurospora crassa. Otros compuestos útiles como inhibidores del proteasoma en el tratamiento de enfermedades parasitarias se describen en el documento WO 98/10779, que se incorpora a la presente memoria, en su totalidad.

25 En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas inhiben irreversiblemente la actividad del proteasoma en un parásito. Se ha demostrado que dicha inhibición irreversible induce la parada de la actividad enzimática sin recuperación en glóbulos rojos y glóbulos blancos. En algunas de dichas realizaciones, la prolongada vida media de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la terapia contra exposiciones recurrentes a parásitos. En ciertas realizaciones, la prolongada vida media de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la quimioprolifaxis frente a una infección futura.

30 Se ha demostrado también que los inhibidores que se unen al proteasoma 20S estimulan la formación de hueso en cultivos de órganos óseos. Además, cuando dichos inhibidores han sido administrados sistémicamente a ratones, ciertos inhibidores del proteasoma aumentaron el volumen óseo y las tasas de formación de hueso en más del 70% (Garrett, IR et al., J. Clin. Invest. (2003) 111: 1771-1782), sugiriendo, por lo tanto, que la maquinaria ubiquitina-proteasoma regula la diferenciación de osteoblastos y la formación de huesos. Por lo tanto, las composiciones divulgadas pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas con la pérdida ósea, tales como osteoporosis.

35 El tejido óseo es una excelente fuente de factores que tienen la capacidad de estimular las células óseas. De esta manera, los extractos de tejido óseo bovino contienen no sólo proteínas estructurales que son responsables de mantener la integridad estructural del hueso, sino también factores de crecimiento óseo biológicamente activos que pueden estimular la proliferación de las células óseas. Entre estos últimos factores hay una familia de proteínas descritas recientemente denominadas proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Todos estos factores de crecimiento tienen efectos sobre otros tipos de células, así como sobre las células óseas; además Hardy, MH, et al., Trans Genet (1992) 8:55-61 describe la evidencia de que las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) se expresan diferencialmente en los folículos pilosos durante el desarrollo. Harris, S.E., et al., J Bone Miner Res (1994) 9:855-863 describen los efectos de TGF- β sobre la expresión de BMP-2 y otras sustancias en las células óseas. La expresión de BMP-2 en folículos maduros ocurre también durante la maduración y después del período de proliferación celular (Hardy, et al. (1992, supra). De esta manera, los compuestos de la invención pueden ser útiles también para la estimulación del crecimiento del folículo piloso.

40 Por último, las composiciones divulgadas son útiles también como agentes de diagnóstico (por ejemplo, en kits de diagnóstico o para su uso en laboratorios clínicos) el cribado de proteínas (por ejemplo, enzimas, factores de transcripción) procesadas por hidrolasas Ntn, incluyendo el proteasoma. Las composiciones divulgadas son útiles también como reactivos de investigación para unirse específicamente a la subunidad X/MB1 o cadena α y para inhibir las actividades proteolíticas asociadas con la misma. Por ejemplo, pueden determinarse la actividad de (y los inhibidores específicos de) otras subunidades del proteasoma.

La mayoría de las proteínas celulares están sometidas a un procesamiento proteolítico durante la maduración o activación. Los inhibidores de enzimas divulgados en la presente memoria pueden ser usados utilizar para determinar si un proceso celular, de desarrollo o fisiológico o de salida es regulado por la actividad proteolítica de una hidrolasa Ntn particular. Uno de dichos procedimientos incluye la obtención de un organismo, una preparación de célula intacta o un extracto celular; exponer el organismo, la preparación celular o el extracto celular a una composición divulgada en la presente invención; exponer el organismo, la preparación celular o el extracto celular expuesto al compuesto a una señal, y supervisar el proceso o salida. La alta selectividad de los compuestos divulgados en la presente memoria permite la eliminación rápida y precisa o la implicación de Ntn (por ejemplo, el proteasoma 20S) en un proceso celular, de desarrollo o fisiológico determinado.

Administración

Las composiciones preparadas según se describe en la presente memoria pueden administrarse en diversas formas, dependiendo del trastorno a tratar y la edad, la condición y el peso corporal del paciente, tal como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando las composiciones deben administrarse por vía oral, pueden formularse en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes; o para la administración parenteral, pueden formularse como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones de infusión por gotas o supositorios. Para la aplicación por vía mucosa oftálmica, pueden formularse como gotas oculares o ungüentos oculares. Estas formulaciones pueden prepararse por medios convencionales en conjunción con los procedimientos descritos en la presente memoria y, si se desea, el ingrediente activo puede ser mezclado con cualquier aditivo o excipiente convencional, tal como un aglutinante, un agente desintegrante, un lubricante, un corrector, un agente solubilizante, una ayuda de suspensión, un agente emulsionante o un agente de revestimiento, además de una ciclodextrina y un tampón. Aunque la dosificación variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar o prevenir, la ruta de administración y la forma del fármaco, en general, se recomienda una dosificación diaria de de 0,01 a 2.000 mg del compuesto para un paciente humano adulto, y esta puede administrarse en una única dosis o en dosis divididas. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será, en general, aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. En general, las composiciones destinadas para uso parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea) incluyen una ciclodextrina sustituida. Las composiciones administradas por otras vías, en particular, la vía oral, incluyen una ciclodextrina sustituida o no sustituida.

El tiempo preciso de administración y/o la cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia de tratamiento en un paciente determinado dependerá de la actividad, la farmacocinética y la biodisponibilidad de un compuesto particular, la condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y la etapa de la enfermedad, condición física general, capacidad de respuesta a una dosis determinada y tipo de medicación), vía de administración, etc. Sin embargo, las directrices anteriores pueden usarse como base para un ajuste fino del tratamiento, por ejemplo, determinando el tiempo y/o la cantidad de administración óptimos, que no requerirá más experimentación que la normal, que consiste en supervisar al sujeto y ajustar la dosificación y/o el tiempo.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para hacer referencia a aquellos ligandos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción beneficio/riesgo razonable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente memoria, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz, almidón de patata, y β -ciclodextrina sustituida o no sustituida; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son no pirógenas, es decir, no inducen elevaciones de temperatura significativas cuando se administran a un paciente.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas, del inhibidor o de los inhibidores. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del inhibidor o los inhibidores, o haciendo reaccionar por separado un inhibidor o unos inhibidores

5 purificados en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal formada de esta manera. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, laurilsulfonato y sales de aminoácidos, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

10 En otros casos, los inhibidores útiles en los procedimientos de la presente invención pueden contener uno o más grupos ácidos funcionales y, de esta manera, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. En estos casos, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales de adición de base orgánica e inorgánica relativamente no tóxica de un inhibidor o inhibidores. Asimismo, estas sales pueden ser preparadas *in situ* durante el aislamiento y purificación finales del inhibidor o inhibidores, o haciendo reaccionar, por separado, el inhibidor o inhibidores purificados en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, etc. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., supra).

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

20 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

25 Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden tener forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida aceite-en-agua o agua-en-aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un inhibidor o inhibidores como un ingrediente activo. Una composición también puede ser administrada como un bolo, electuario o pasta.

35 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, ciclodextrinas, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico, (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol de acetilo y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y sus mezclas y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse también como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras rellenas, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto de peso molecular, y similares.

45 Un comprimido puede fabricarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden ser preparados usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del inhibidor o inhibidores en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte.

55 Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ser opcionalmente marcados o preparados con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o

incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones pueden contener también, opcionalmente, agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente o los ingredientes

5 Los ejemplos de incorporación de composiciones que pueden ser usadas incluyen sustancias y ceras poliméricas. El ingrediente activo puede tener también forma micro-encapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

10 Las formas de dosificación líquidas para su administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y sus mezclas.

15 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

20 Las suspensiones, además del inhibidor o inhibidores activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietileno sorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y sus mezclas.

25 Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden ser presentadas como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más inhibidores con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de coco, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o en la cavidad vaginal y liberará el agente activo.

Las formulaciones que son adecuadas para su administración vaginal incluyen también pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray que contienen vehículos tales como los conocidos en la técnica como apropiados.

30 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un inhibidor o inhibidores incluyen polvos, esprays, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que puedan requerirse.

35 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de inhibidor o inhibidores, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o sus mezclas.

Los polvos y esprays pueden contener, además de un inhibidor o inhibidores, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los esprays pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

40 El inhibidor o inhibidores pueden ser administrados, de manera alternativa, mediante aerosol. Esto se consigue preparando un aerosol acuoso, preparación liposomal, o partículas sólidas que contienen la composición. Podría usarse una sustancia no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarbono). Los nebulizadores sónicos son preferentes debido a que minimizan la exposición del agente a cizallamiento, lo que puede resultar en la degradación del compuesto.

45 Normalmente, un aerosol acuoso se realiza formulando una solución o suspensión acuosa del agente junto con vehículos y estabilizadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Los vehículos y estabilizantes varían con los requerimientos de la composición particular, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic, ésteres de sorbitán, lecitina, cremophor), co-disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como polietilenglicol, proteínas inocuas como albúmina de suero, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan, generalmente, a partir de soluciones isotónicas.

50 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un inhibidor o inhibidores al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden realizarse disolviendo o dispersando el agente en el medio apropiado. Pueden usarse también potenciadores de absorción para aumentar el flujo del inhibidor o inhibidores a través

de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de velocidad o dispersando el inhibidor o inhibidores en una matriz polimérica o gel.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más inhibidores en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden ser reconstituídos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

10 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

15 Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser asegurada mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes de ajuste de tonicidad, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

20 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco desde una inyección subcutánea o intramuscular. Por ejemplo, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente se consigue disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

25 Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de inhibidor o inhibidores en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación del fármaco puede ser controlada. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli (anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectables se preparan también atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

30 Las preparaciones de agentes pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Por supuesto, se proporcionan mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, infusión; tópicamente mediante loción o pomada, y por vía rectal mediante supositorios. La administración oral se considera preferente.

35 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", tal como se usan en la presente memoria, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, inyección intraespinal e intraesternal e infusión.

40 Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se usa en la presente memoria, significa la administración de un ligando, fármaco u otro material que no sea directamente al sistema nervioso central, de manera que entre en el sistema del paciente y, de esta manera, esté sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, la administración subcutánea.

Estos inhibidores pueden ser administrados a humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo la vía oral, nasal, por ejemplo, un aerosol, por vía rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, tal como por polvos, ungüentos o gotas, incluyendo por vía bucal y sublingual.

45 Independientemente de la vía de administración seleccionada, el inhibidor o inhibidores, que pueden ser usados en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por las personas con conocimientos en la materia.

50 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente.

La concentración de un compuesto descrito en una mezcla farmacéuticamente aceptable variará dependiendo de diversos

factores, incluyendo la dosificación del compuesto a administrar, las características farmacocinéticas del compuesto o compuestos empleados y la vía de administración. En general, las composiciones de la presente invención pueden ser proporcionadas en una solución acuosa que contiene aproximadamente del 0,1 al 10% p/v de un compuesto divulgado en la presente memoria, entre otras sustancias, para su administración parenteral. Los intervalos de dosificación típicos son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día, proporcionado en 1-4 dosis divididas. Cada dosis dividida puede contener los mismos o diferentes compuestos de la invención. La dosificación será una cantidad eficaz dependiendo de diversos factores, incluyendo la salud general de un paciente, y la formulación y vía de administración del compuesto o compuestos seleccionados.

En una realización preferente, el inhibidor del proteasoma es un polvo seco antes de su adición a la solución de ciclodextrina. El procedimiento para disolver el fármaco en la solución de ciclodextrina puede mejorarse mediante mezclado o agitación. En la realización más preferente, el disolvente en la disolución de ciclodextrina es "agua para inyección" (WFI), lo que significa que es purificado, estéril y bajo en endotoxinas. Esta formulación es adecuada tanto para administración parenteral como para administración oral.

En otra realización preferente, la composición farmacéutica es una solución oral o una solución parenteral. Otra realización es una preparación liofilizada que puede ser reconstituida antes de su administración. Como un sólido, esta formulación puede incluir también comprimidos, cápsulas o polvos.

Otro aspecto de la invención proporciona una terapia conjunta en la que uno o más agentes terapéuticos diferentes se administran con la composición de inhibidor del proteasoma. Dicho tratamiento conjunto puede conseguirse por medio de una dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención es administrada conjuntamente con uno o más de inhibidores del proteasoma diferentes.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención es administrada conjuntamente con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos adecuados pueden incluir, productos naturales tales como alcaloides de la vinca (es decir vinblastina, vincristina y vinorelbina), paclitaxel, epididodofillotoxinas (es decir, etopósido, tenipósido), antibióticos (dactinomicina (actinomicina D) daunorrubicina, doxorubicina e idarrubicina), antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina, enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente L-asparagina y elimina las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina), agentes antiplaquetarios, agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucil), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), sulfonatos de alquilo (busulfán), nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos-dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (fluorouracilo, floxuridina y citarabina), análogos de purina e inhibidores relacionados (mercaptapurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina), inhibidores de aromatasa (anastrozol, exemestano y letrozol), y complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxurea, mitotano, aminoglutetimida; inhibidores de histona deacetilasa (HDAC) (tricotostatina, butirato de sodio, apicidan, ácido hidroámico suberoil anilida); hormonas (es decir, estrógeno) y agonistas de hormonas tales como la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) agonistas (goserelina, leuprolida y triptorelina). Otros agentes quimioterapéuticos pueden incluir mecloretamina, camptotecina, ifosfamida, tamoxifeno, raloxifeno, gemcitabina, navelbina o cualquier análogo o derivado variante de los anteriores.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención se administra conjuntamente con una citoquina. Las citoquinas incluyen, pero no se limitan a, interferón- γ , - α y - β , interleucinas 1-8, 10 y 12, factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), TNF- α y - β y TGF- β .

En ciertas realizaciones, una composición de la invención se administra conjuntamente con un esteroide. Los esteroides adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difuprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, maziopredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarato, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, prednisona, prednival, prednilidene, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, triamcinolona de benetonida, hexacetónido de triamcinolona y sales y/o derivados de los mismos.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención es administrada conjuntamente con un agente inmunoterapéutico. Los agentes inmunoterapéuticos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, moduladores de MDR (verapamilo, valspodar, biricodar, tariquidar, laniquidar), ciclosporina, talidomida y anticuerpos monoclonales. Los

anticuerpos monoclonales pueden ser desnudos o conjugados, tales como rituximab, tositumomab, alemtuzumab, epratuzumab, ibritumomab tiuxetan, gemtuzumab ozogamicina, bevacizumab, cetuximab, erlotinib y trastuzumab.

Procedimientos de preparación

5 Otro aspecto de la presente invención implica el procedimiento de preparación de una composición farmacéutica de un inhibidor del proteasoma. El procedimiento comprende determinar el volumen deseado, preparar una solución de ciclodextrina que comprende la ciclodextrina y el tampón de ácido entre el 20% y el 90% (por ejemplo, el 75%) del volumen final deseado de H₂O, suspender la cantidad apropiada del inhibidor del proteasoma en la solución de ciclodextrina y agitar hasta que se disuelva, ajustando el pH (por ejemplo, con una solución base, preferiblemente una solución de hidróxido de sodio) y, a continuación, añadir suficiente diluyente acuoso para conseguir el volumen final deseado.

15 Un aspecto adicional de la presente invención implica el procedimiento de preparación de una composición farmacéutica de un inhibidor del proteasoma. El procedimiento comprende determinar el volumen deseado, preparar una solución de ciclodextrina que comprende la ciclodextrina y el tampón de base entre el 20% y el 90% (por ejemplo, el 75%) del volumen final deseado de H₂O, suspender la cantidad apropiada del inhibidor del proteasoma en la solución de ciclodextrina y agitar hasta que se disuelva, ajustando el pH (por ejemplo, con una solución de ácido) y, a continuación, añadir suficiente diluyente acuoso para conseguir el volumen final deseado.

20 Un procedimiento alternativo de preparación de una composición farmacéutica de la invención implica la disolución de un inhibidor del proteasoma en un disolvente apropiado (por ejemplo, un alcohol tal como etanol), disolviendo una ciclodextrina en un disolvente miscible, preferiblemente el mismo, y mezclarlos conjuntamente. A continuación, el disolvente es retirado, tal como mediante evaporación rotatoria, secado por pulverización o liofilización, para obtener un sólido. A continuación, el sólido es disuelto en un diluyente acuoso apropiado y, a continuación, se ajusta el pH, si es necesario.

25 Puede haber un periodo entre la obtención del sólido y su redisolución en tampón acuoso. En un ejemplo, el sólido es esterilizado (por ejemplo, para permitir el almacenamiento y/o envío, generalmente en un contenedor libre de contaminantes y sellado) y es disuelto inmediatamente antes de su uso.

Típicamente, las composiciones obtenidas anteriormente son esterilizadas antes de su uso, a menos que la preparación implique una etapa de esterilización y no se produzca contaminación antes de su uso.

30 El inhibidor del proteasoma disuelto en tampón acuoso, preferiblemente después de una esterilización, opcionalmente puede ser liofilizado (en un recipiente libre de contaminantes y sellado) y puede ser reconstituido en un diluyente acuoso apropiado justo antes de su uso. El diluyente preferente es agua para inyección (WFI).

Ejemplificación

Ejemplo 1

Formulación de péptido (b)/HPBCD

35 Se formularon 100 µg/ml de péptido (b) en una solución acuosa que contenía 130 mg/ml de hidroxipropil beta ciclodextrina (HPBCD) y aproximadamente 0,9% (p/v) de NaCl. Esta era una solución sobresaturada (metaestable) a temperatura ambiente y no podía prepararse simplemente diluyendo el péptido (b) en solución acuosa al 13% de HPBCD/0,9% (p/v) de NaCl.

40 La cantidad deseada de péptido (b) se pesó y se disolvió en etanol absoluto a una concentración de 1 mg/ml. Para cada 1 mg de péptido (b) a formular, se disolvieron 1,3 g de HPBCD en etanol absoluto a una concentración de 10 mg/ml. A continuación, esta solución de etanol/HPBCD se combinó con la solución etanol/péptido (b), se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se evaporó a presión reducida (roto-evaporada) para obtener un sólido blanco. Este sólido se colocó bajo alto vacío (aproximadamente 1 mPa) durante 24 horas, se pulverizó y, a continuación, se colocó bajo alto vacío (aproximadamente 1 mPa) durante otras 4 horas para obtener un sólido seco. La formulación final se preparó disolviendo este producto fármaco sólido a una concentración final de 100 µg de péptido (b)/ml de producto fármaco sólido en solución acuosa al 0,9% (p/v) de NaCl, de calidad USP, enfriada con hielo, seguido por filtración estéril. La estabilidad de la temperatura ambiente del producto de fármaco reconstituido fue de aproximadamente 12 horas.

Ejemplo 2

Formulación de péptido (a)/SBECD

50 Se formularon 2 mg/ml de péptido (a) en una solución acuosa que contenía 10% (p/v) de SBECD y 10 mM de ácido cítrico ajustado a pH 3,5 con 0,1 M de hidróxido sódico acuoso.

Se añadieron las masas apropiadas de SBECD y ácido cítrico a un volumen de WFI correspondiente a aproximadamente el 75% del volumen de la formulación final. A continuación, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se efectuó una disolución completa del SBECD y ácido cítrico. A continuación, se añadió una masa apropiada de péptido (a) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que el péptido (a) añadido se disolvió. A continuación, un electrodo de pH se sumergió en la solución y, con una agitación rápida, el pH se ajustó a 3,5 mediante la adición lenta de hidróxido de sodio 0,1 M en WFI; la adición lenta de la solución de hidróxido de sodio con agitación adecuada fue necesaria para prevenir la precipitación de péptido (a). Con agitación rápida, la solución resultante se diluyó, a continuación, con WFI a una concentración final de péptido (a) de 2,0 mg/ml. A continuación, esta solución fue filtrada de manera estéril para producir la formulación final.

Se usaron diversos valores diferentes de pH finales para las formulaciones de péptido (a)/SBECD. La Figura 1 muestra la solubilidad del péptido (a) a diversos valores de pH en soluciones acuosas al 10% (p/v) de sulfobutiléter beta-ciclodextrina (SBECD)/10 mM de citrato de sodio.

Además, se determinó la estabilidad del péptido (a) en estas formulaciones. La Figura 2 muestra el porcentaje del péptido (a) que permanece en soluciones acuosas al 10% (p/v) SBECD/10 mM de citrato de sodio, con el tiempo, a diversos valores de pH.

Ejemplo 3

Formulación (3X) péptido (a)/SBECD, liofilización y reconstitución de la formulación

Se formularon 6 mg/ml de péptido (a) en una solución acuosa que contenía el 30% (p/v) SBECD y 30 mM de ácido cítrico ajustado a pH 3,5 con hidróxido de sodio 0,5 M acuoso.

Se añadieron las masas apropiadas de SBECD y ácido cítrico a un volumen de WFI correspondiente al 70% del volumen de la formulación final. A continuación, esta mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se efectuó la disolución completa del SBECD y ácido cítrico. A continuación, se añadió una masa apropiada de péptido (a) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvió el péptido (a) añadido. A continuación, un electrodo de pH se sumergió en la solución y, con agitación rápida, el pH se ajustó a 3,5 mediante una adición lenta de hidróxido de sodio 0,5 M en WFI; la adición lenta de la solución de hidróxido de sodio con agitación adecuada fue necesaria para prevenir la precipitación del péptido (a). Con agitación rápida, la solución resultante se diluyó, a continuación, con WFI a una concentración final de péptido (a) de 6,0 mg/ml. A continuación, esta solución fue filtrada, de manera estéril, para obtener la formulación final.

Los viales que contenían el producto se cargaron en los estantes y la temperatura se estableció a 5°C durante 2 horas. A continuación, los estantes se enfriaron a razón de 30°C por hora a un punto de ajuste objetivo de -45°C que se mantuvo, a continuación, durante 4 horas para completar la congelación. El condensador se fijó por debajo de -50°C, y la cámara se evacuó a una presión objetivo de 7,98 Pa. La presión de la cámara se controló introduciendo 0,2 µ de nitrógeno filtrado, NF, a la cámara. A continuación, los estantes se calentaron a un punto de ajuste objetivo de -18°C a una razón promedio controlada de 30°C por hora y control ajustado en ese punto de ajuste para completar el secado primario. Los estantes se calentaron a un punto de ajuste objetivo de 30°C a una razón promedio controlada de 12°C por hora y el control en ese punto de ajuste durante 12 horas para completar el secado secundario.

A continuación, la cámara se rellenó de nuevo con 0,2 µ nitrógeno filtrado, NF, seguido por desactivación del producto a 1 atm.

La reconstitución se efectuó añadiendo 9,75 ml de WFI, USP para producir el volumen de llenado deseado dentro del vial de 10,5 ml. El vial se invirtió varias veces. El tiempo para la disolución fue inferior a 2 minutos. A continuación, el vial se dejó reposar durante varios minutos para permitir que se elevasen burbujas. Se produjo una solución clara incolora sin partículas visibles. El pH medido fue de $3,5 \pm 0,1$.

Ejemplo 4

Formulación de péptido (a)/SBECD en polvo seco

El péptido (a) se formuló como un polvo seco de ciclodextrina complejada para su disolución en 10 mM de ácido cítrico antes de la administración intravenosa.

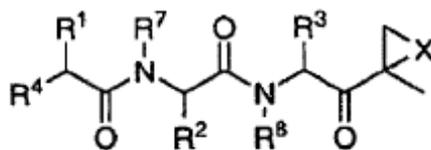
Se añadieron las masas apropiadas de péptido y SBECD a un volumen apropiado de etanol anhidro para obtener una solución etanólica que contenía 4 mg/ml de péptido (a) y 200 mg/ml de SBECD. Esta solución se filtró, de manera estéril, (0,2 µm) y, a continuación, se evaporó (bajo condiciones estériles) hasta la sequedad a temperatura ambiente bajo presión reducida, para obtener un sólido de color blanco a blancuzco. A continuación, este sólido se trituró (bajo condiciones estériles) para obtener un polvo que fluye libremente. Una masa apropiada de este sólido se precargó de

ES 2 408 216 T3

- manera estéril en un frasco estéril de tamaño apropiado. A continuación, el vial se selló con un sistema de cierre de contenedor con precinto flip-off de aluminio de elastómero perforable. A continuación, se añadió un volumen apropiado de 10 mM de ácido cítrico en WFI (ajustado a pH 3,2 con hidróxido de sodio 0,1 M en WFI) mediante una aguja y jeringa estéril a través del elastómero perforable y se agitó a temperatura ambiente hasta que todo el material sólido se disolvió para obtener una solución final que contenía 2 mg/ml de péptido (a), 100 mg/ml de SBECD y 10 mM de ácido cítrico/tampón de citrato de sodio pH 3,2 - 4,0.
- 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor del proteasoma y una ciclodextrina, en la que el inhibidor del proteasoma está representado por la fórmula estructural (XIII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(XIII)

en la que:

10 cada Ar es, independientemente, un grupo heteroaromático de 5-6 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes;

L está seleccionado de entre C=O y SO₂;

X es O;

Y está ausente;

15 Z está ausente;

R¹, R², y R³ están seleccionados, cada uno independientemente, de entre alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxialquilo C₁₋₆, arilo, aralquilo C₁₋₆, heteroarilo, heteroalquilo C₁₋₆, heterociclilo y heterocicloalquilo C₁₋₆;

R⁴ es N(R⁵)L-Z-R⁶;

R⁵ es hidrógeno;

20 R⁶ está seleccionado de entre Ar-Y- y heterociclilo;

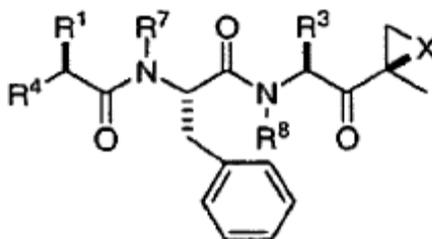
y

R⁷ y R⁸ son hidrógeno;

en la que la ciclodextrina está seleccionada de entre hidroxipropil beta-ciclodextrina (HPBCD) y sulfobutiléter beta-ciclodextrina (SBECD).

25 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la R⁶ es Ar-Y-.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el inhibidor del proteasoma está representado por la fórmula estructural (XV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(XV)

35

en la que:

R¹ y R³ están seleccionados, cada uno independientemente, de entre alquilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, alcoxialquilo C₁₋₆, arilo y aralquilo C₁₋₆.

4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un tampón.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la ciclodextrina es SBECD.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que el tampón es citrato de sodio/ácido cítrico.
- 5 7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende de 1 a 5 mg/ml del inhibidor del proteasoma, 5-25% (p/v) de la ciclodextrina y 5-20 mM del tampón para producir un pH en el intervalo de 3 a 6.
8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento de inflamación.
- 10 9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento para inhibir o reducir la infección por VIH, el tratamiento de la enfermedad de la infección crónica, o para afectar al nivel de expresión génica viral en un sujeto.
- 10 10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, denervación o lesión de nervios.
- 15 11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedad de pérdida muscular.
12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer.
13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento de fiebre.
- 20 14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una afección relacionada con el sistema inmunológico.
15. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en un procedimiento para alterar la diversidad de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma en un organismo.

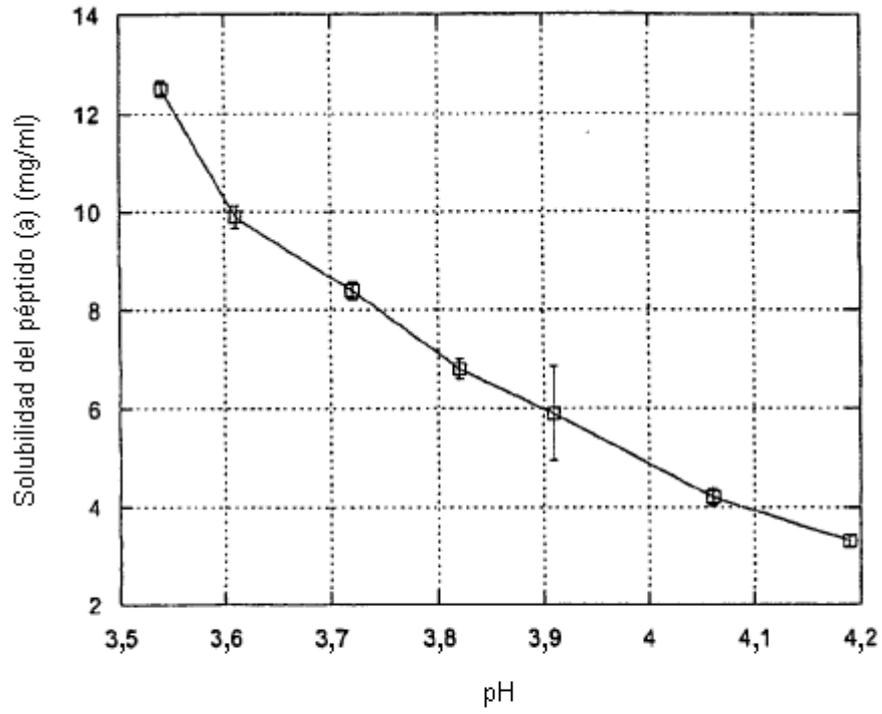


Figura 1

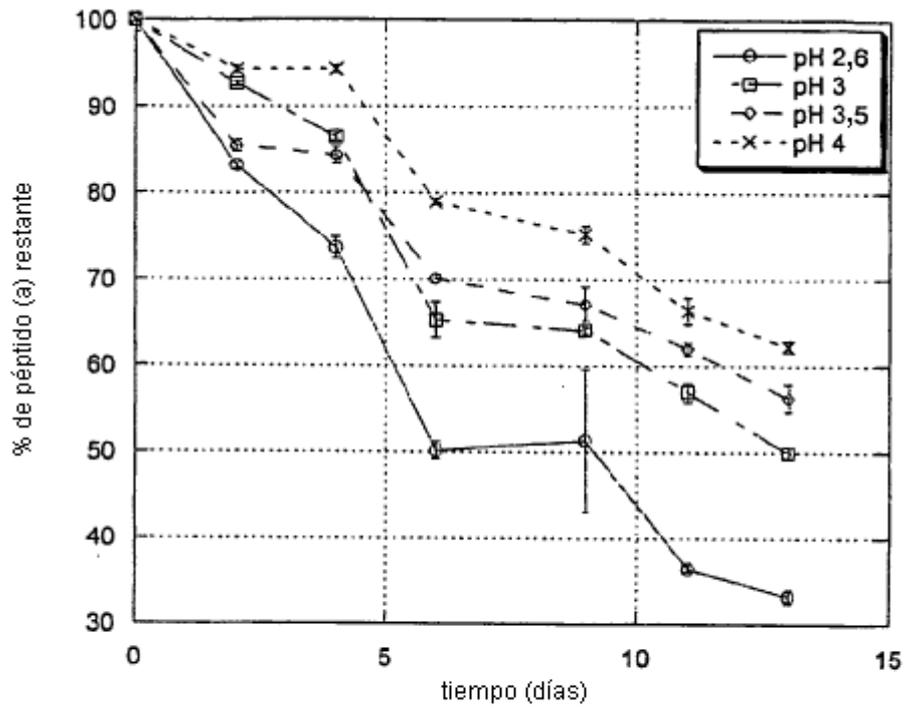


Figura 2