

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 516**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2003 E 03768749 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1565193**

54 Título: **Composiciones para tratar el cáncer usando el inhibidor de proteasomas PS-341**

30 Prioridad:

06.11.2002 US 424363 P

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

03.09.2013

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215 , US

72 Inventor/es:

ANDERSON, KENNETH, C.;
HIDESHIMA, TERU;
MITSIADES, CONSTANTINE, S. y
MITSIADES, NICHOLAS

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 421 516 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 para tratar el cáncer usando el inhibidor de proteasomas PS-341

5 **Apoyo del gobierno**

El trabajo relacionado con esta invención estuvo apoyado por los números de subvención de los Institutos Nacionales de la Salud RO-1 50947 y PO-1 78378.

10 **Antecedentes de la invención**

En todo el mundo, el cáncer es una causa principal de muerte. Los cánceres pueden considerarse como una ruptura en la comunicación entre células tumorales y su entorno, incluyendo sus células vecinas normales. Señales estimuladoras del crecimiento e inhibidoras del crecimiento se intercambian de manera rutinaria entre las células dentro de un tejido. Normalmente, las células no se dividen en ausencia de señales estimuladoras o en presencia de señales inhibidoras. En un estado canceroso o neoplásico, una célula adquiere la capacidad de "anular" estas señales y de proliferar en condiciones en que una célula normal no lo haría.

Actualmente, existen pocas curas para tratar los diversos tipos de cáncer. Entre las curas posibles que existen se incluyen la aplicación de compuestos inhibidores de tumores (quimioterapia), radioterapia y trasplantes de médula ósea. Los tratamientos de quimioterapia incluyen normalmente la aplicación de agentes quimioterápicos a un paciente en dosificaciones seleccionadas para lograr y mantener un nivel terapéuticamente eficaz de los agentes en el paciente. Sin embargo, los agentes quimioterápicos más conocidos que se usan para el tratamiento del cáncer presentan efectos secundarios significativos. Por tanto, una desventaja de los tratamientos de quimioterapia típicos es que los compuestos empleados no son específicos en su actividad y se acumulan hasta niveles tóxicos, y por tanto destruyen células normales que proliferan rápidamente, así como células tumorales. Además, a menudo un agente terapéutico que es inicialmente eficaz para un paciente dado se vuelve, a lo largo del tiempo, ineficaz o menos eficaz para ese paciente. Además, un agente terapéutico que es eficaz, al menos inicialmente, para algunos pacientes puede ser completamente ineficaz o incluso perjudicial para otros pacientes.

Hideshima *et al.* (Cancer Res. 2001. Vol. 61:3071-3076) dan a conocer el uso de PS-341 para inhibir el crecimiento de diversas líneas celulares de mieloma múltiple, siendo algunas de ellas resistentes a o bien Dex, o bien Dox, o bien Mit o bien Mel.

El documento EP1153612 describe el uso combinado de un inhibidor de proteasomas (lactacistina) y doxorubicina para combatir células de cáncer de colon.

El documento US 2002/0068690 da a conocer una combinación de un agente anticancerígeno e inhibidores de NF-kappaB, que pueden ser inhibidores de proteasomas.

Por consiguiente, sería útil identificar compuestos que sensibilicen las células cancerosas a quimioterapia convencional de manera que se maximice el efecto terapéutico de cualquier agente quimioterápico dado. Tales compuestos idealmente también reducirían la dosificación requerida del agente quimioterápico dando como resultado de ese modo menos efectos secundarios en el paciente.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el inhibidor de proteasomas PS-341 sensibiliza las células cancerosas a agentes quimioterápicos. La presente invención se basa además en el descubrimiento que el inhibidor de proteasomas PS-341 sensibiliza las células cancerosas, incluso de pacientes que experimentaron recidiva tras la monoterapia, con un inhibidor de proteasomas PS-341. La presente invención se basa también en el descubrimiento que el inhibidor de proteasomas PS-341 suprime la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular. Por tanto, la presente invención demuestra que el inhibidor de proteasomas PS-341 puede inducir y/o restaurar la sensibilidad de células cancerosas a agentes terapéuticos. Aunque sin querer restringirse a la teoría, se cree que el inhibidor de proteasomas PS-341 puede inducir y/o restaurar la sensibilidad de células cancerosas a agentes terapéuticos regulando por disminución la expresión de inhibidores de la apoptosis, así como inhibiendo rutas de respuesta a estrés genotóxico.

Por consiguiente, en una realización, la invención da a conocer composiciones terapéuticas para tratar el cáncer o prevenir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo, crecimiento tumoral, en un sujeto. En otra realización, la descripción se refiere a composiciones terapéuticas para tratar el cáncer o prevenir el crecimiento de células cancerosas en un sujeto que se ha vuelto resistente al tratamiento. Las composiciones de la presente descripción incluyen una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, por ejemplo, en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas es de desde aproximadamente 0,001 mg/m² de área de superficie

corporal/día hasta aproximadamente 4,0 mg/m² de área de superficie corporal/día.

5 Otros aspectos de la descripción incluyen agente(s) quimioterápicos e inhibidor(es) de proteasomas envasados. Los agentes y compuestos envasados también incluyen instrucciones para usar la combinación de agente quimioterápico/inhibidor de proteasomas para tratar el cáncer o prevenir el crecimiento de células cancerosas.

10 Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos para tratar el cáncer, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento tumoral, en un sujeto administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico. Los métodos de la presente descripción permiten una reducción en la cantidad del agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, requerida para ser eficaz, dando como resultado menos efectos secundarios en el sujeto que está tratándose.

15 Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos para la purga de médula ósea, es decir, la eliminación de células cancerosas de la médula ósea, exponiendo las células de médula ósea a un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico. La médula ósea purgada puede colocarse entonces de nuevo en el sujeto del que se extrajo la médula ósea, o colocarse en un sujeto diferente.

20 La presente invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de PS-341 para la preparación de un medicamento para aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa derivada de un sujeto que experimentó recidiva tras la monoterapia con PS-341 a un agente quimioterápico.

25 La presente invención se refiere además al uso de una cantidad eficaz de PS-341 y una cantidad eficaz de un agente quimioterápico para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas del sujeto se derivan de un sujeto que experimentó recidiva tras la monoterapia con PS-341.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El contenido que no está comprendido por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención.

30 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones. Pueden usarse materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o al someter a prueba la invención.

Breve descripción de las figuras

35 Las figuras 1A-1I demuestran que PS-341 sensibiliza células de mieloma múltiple (MM) a quimioterapia que daña el ADN. En la figura 1A, se pretrataron células MM.1S con doxorubicina (40 nM), melfalán (1 μM) o dexametasona (0,5 μM) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales (barras negras: sin PS-341, barras blancas: con PS-341).

40 La figura 1B ilustra un análisis de dosis-respuesta para determinar el efecto de doxorubicina sobre células MM.1S en presencia (cuadrados) o ausencia (rombos) de PS-341 (2 nM) y revela que PS341 disminuye la DL50 de doxorubicina desde 150 hasta 26 nM.

45 La figura 1C ilustra un estudio en el que se pretrataron células MM.1S con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales (a); o se pretrataron con PS-341 durante 24 h y luego con doxorubicina durante 24 h adicionales (b); o se trataron con PS-341 y doxorubicina juntos durante 24 h (c) (barras negras: control, barras blancas: doxorubicina sola, barras cuadrículadas: PS-341, barras grises: doxorubicina más PS-341).

50 La figura 1D ilustra un estudio en el que se pretrataron células RPMI-8226/S, ARP-1, S6B45, NCH-H929 e INA6 con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego con PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales (barras negras: control, barras blancas: doxorubicina sola, barras cuadrículadas: PS-341, barras grises: doxorubicina más PS-341).

55 La figura 1E ilustra un estudio en el que se pretrataron células de MM primarias de 4 pacientes sin tratamiento previo con PS-341 con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego con PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales (barras negras: control, barras blancas: doxorubicina sola, barras cuadrículadas: PS-341, barras grises: doxorubicina más PS-341).

60 La figura 1F ilustra un estudio en el que se pretrataron células RPMI-Dox40 resistentes a doxorubicina con (barras blancas) o sin (barras negras) doxorubicina (800 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2-10 nM) durante 24 h adicionales (barras negras: sin doxorubicina, barras blancas: con doxorubicina).

La figura 1G ilustra un estudio en el que se pretrataron células LR5 resistentes a melfalán con o sin melfalán (5 μM) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales.

65 La figura 1H ilustra un estudio en el que se pretrataron células de MM aisladas de un paciente que había

experimentado recidiva tras el tratamiento con PS-341 con (barras blancas) o sin (barras negras) doxorubicina (100 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-34 (5-20 nM) durante 24 h adicionales.

5 La figura 1I ilustra un estudio en el que se trataron células MM.1S durante 24 h con doxorubicina (100-200 ng/ml) en pocillos recubiertos con (barras blancas) o sin (barras negras) fibronectina (FN). Se añadió PS-341 (10 nM) durante 24 h adicionales. En todos los casos, el % de supervivencia celular (media \pm DE) se cuantifica mediante MTT.

10 Las figuras 2A-2D demuestran que PS-341 inhibe las rutas de respuesta a estrés genotóxico. La figura 2A ilustra un perfil transcripcional detectado mediante análisis de micromatriz de oligonucleótidos en células MM-1S tratadas con PS-341. Los cambios transcripcionales inducidos por PS-341 (100 nM, 1-8 h) incluyeron regulación por disminución de una agrupación funcional de moléculas implicadas en la respuesta al estrés genotóxico. La saturación de color es proporcional a la magnitud de la diferencia del control respectivo.

15 Las figuras 2B-2C ilustran un análisis proteómico del estado de señalización de células MM-1S tratadas con PS-341 que detecta regulación por disminución de análisis proteómico de DNAPK tras una incubación de 8 horas con PS-341 (tal como se representa mediante las flechas respectivas).

20 La figura 2D ilustra una inmunotransferencia que confirma que PS-341 disminuye la expresión de proteínas de Ku80 y Ku70.

Descripción detallada

25 La presente descripción se refiere al uso de un inhibidor de proteasomas en combinación con un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, para el tratamiento del cáncer. La presente descripción también se refiere a métodos para tratar el cáncer en un sujeto administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente terapéutico. La presente descripción se refiere además a la purga de médula ósea exponiendo las células de médula ósea a un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico, es decir, un agente quimioterápico.

30 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de toda la descripción detallada.

35 Tal como se da a conocer en el presente documento, el término "inhibidor de proteasomas" pretende incluir inhibidores de las peptidasas del proteasoma. Más específicamente, estos inhibidores de las peptidasas del proteasoma incluyen inhibidores de las proteasas de tipo quimiotripsina y de tipo tripsina, además de tiol y serina proteasas. Además de los inhibidores antibióticos aislados originalmente de actinomicetos, se han sintetizado una variedad de aldehídos peptídicos, tales como los inhibidores de proteasas de tipo quimiotripsina descritos por Siman *et al.* (documento WO91/13904). Se han notificado una variedad de inhibidores del complejo proteasoma, por ejemplo, Dick, *et al.*, *Biochem.* 30: 2725 (1991); Goldberg, *et al.*, *Nature* 357: 375 (1992); Goldberg, *Eur. J. Biochem.* 203: 9 (1992); Orłowski, *Biochem.* 29: 10289 (1989); Rivett, *et al.*, *Archs. Biochem. Biophys.* 218: 1 (1989); Rivett, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:12,215 (1989); Tanaka, *et al.*, *New Biol.* 4: 1 (1992). También se comentan inhibidores de proteasomas en la patente estadounidense n.º 5.693.617.

45 A modo de antecedente, los proteasomas son complejos multienzimáticos grandes que desempeñan un papel clave en la ruptura de proteínas. La célula humana promedio contiene aproximadamente 30.000 proteasomas, conteniendo cada una de ellas varias proteasas que digieren proteínas. Estos complejos ayudan a regular toda una serie de funciones incluyendo transcripción, infección viral, oncogénesis, ciclo celular, respuesta a estrés, biogénesis de ribosomas, catabolismo de proteínas anómalo, degeneración neuronal y muscular, procesamiento de antígenos, reparación de ADN y diferenciación celular. La actividad de los proteasomas está sumamente controlada; cuando se vuelven o bien excesivamente activos (degradando más proteínas de las que debe) o bien con rendimiento insuficiente (no degradando determinadas proteínas) puede desarrollarse enfermedad. Cuando la célula necesita destruir una proteína, habitualmente la marca con una cadena de polipéptidos pequeños denominada ubiquitina. Esta estructura actúa como una etiqueta en la cámara proteolítica encerrada de la proteosoma, y la célula señala con esta etiqueta usando tres actividades enzimáticas, E1, E2 y E3. La enzima E1 dependiente de ATP activa la ubiquitina y la une a la enzima conjugadora de ubiquitina, E2. La enzima E3, una ubiquitina ligasa, une entonces la molécula de ubiquitina a la proteína. Este proceso se repite por sí mismo hasta que el péptido condenado arrastra una cadena larga de restos de ubiquitina; el proteasoma finalmente degrada la proteína en pequeños fragmentos. La ruta ubiquitina-proteasoma degrada el 90% de todas las proteínas mal plegadas, anómalas y de todas las proteínas reguladoras, de vida corta en la célula. Estas proteínas de vida corta, cuyas semividas son inferiores a tres horas, constituyen del 10% al 20% de todas las proteínas celulares. La ruta también rompe la mayoría de las proteínas de vida larga. En resumen, la ruta ubiquitina-proteasoma es responsable de degradar del 80% al 90% de todas las proteínas de las células.

65 Además de los inhibidores de proteasomas conocidos, la presente descripción pretende abarcar otras moléculas que pueden someterse a prueba de manera rutinaria para determinar su capacidad para inhibir la actividad de

proteasomas. Diversas estrategias para la identificación de tales inhibidores se facilitan a modo de ejemplo en la técnica. Por ejemplo, pueden examinarse bibliotecas de moléculas pequeñas, que a menudo comprenden extractos de plantas u organismos más simples, por su capacidad para inhibir tipos de proteasas específicos. Alternativamente, puede aplicarse un enfoque de diseño racional usando, por ejemplo, compuestos peptídicos o peptidomiméticos diseñados específicamente para interactuar con el sitio activo de un componente de proteasomas (véanse por ejemplo, Siman, *et al.*, documento WO91/13904; Powers, *et al.*, en *Proteinase Inhibitors*, Barrett, *et al.* (eds.), Elsevier, págs. 55-152 (1986)). Los inhibidores pueden ser análogos estables de estados de transición catalítica tales como Z-Gly-Gly-Leu-H, que inhibe la actividad de tipo quimiotripsina del proteasoma (Orlowski, *Biochemistry* 29: 10289 (1990); véase también Kennedy y Schultz, *Biochem.* 18: 349 (1979)).

Además, la presente descripción pretende abarcar una variedad de inhibidores de proteasomas naturales y químicos notificados en la bibliografía, o análogos de los mismos, incluyendo péptidos que contienen un éster de alfa-dicetona o alfa-cetona, clorometil-cetona peptídica, isocumarinas, fluoruros de sulfonilo peptídicos, boronatos de peptidilo, epóxidos peptídicos y diazometanos de peptidilo. Angelastro, *et al.*, *J. Med Chem.* 33: 11 (1990); Bey, *et al.*, documento EPO 363.284; Bey, *et al.*, documento EPO 363.284; Bey, *et al.*, documento EPO 364,344; Grubb, *et al.*, documento WO 88/10266; Higuchi, *et al.*, documento EPO 393.457; Ewoldt, *et al.*, *Mol. Immunol.* 29(6): 713 (1992); Hernandez, *et al.*, *J. Med Chem.* 35(6): 1121 (1992); Vlasak, *et al.*, *J. Virol.* 63 (5): 2056 (1989); Hudig, *et al.*, *J. Immunol.* 147(4): 1360 (1991); Odakc, *et al.*, *Biochem.* 30(8): 2217 (1991); Vijayalakshmi, *et al.*, *Biochem.* 30(8): 2175 (1991); Kam, *et al.*, *Thrombosis and Haemostasis* 64(1): 133 (1990); Powers, *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 39(1): 33 (1989); Powers, *et al.*, *Proteinase Inhibitors*, Barrett *et al.*, Eds., Elsevier, págs. 55-152 (1986); Powers, *et al.*, *Biochem* 29(12): 3108 (1990); Oweida, *et al.*, *Thrombosis Res.* 58(2): 391 (1990); Hudig, *et al.*, *Mol. Immunol.* 26 (8): 793 (1989); Orlowski, *et al.*, *Arch. Biochem. and Biophys.* 269(1): 125 (1989); Zunino, *et al.*, *Biochem. et Biophys. Acta* 967(3): 331 (1988); Kam, *et al.*, *Biochem.* 27(7): 2547 (1988); Parkes, *et al.*, *Biochem. J.* 230: 509 (1985); Green, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 1923 (1981); Angliker, *et al.*, *Biochem. J.* 241: 871 (1987); Puri, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 27: 346 (1989); Hanada, *et al.*, *Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects*, Katunuma, *et al.*, Eds., Springer-Verlag págs. 25-36 (1983); Kajiwara, *et al.*, *Biochem. Int.* 15: 935 (1987); Rao, *et al.*, *Thromb. Res.* 47: 635 (1987); Tsujinaka, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1201 (1988)).

La presente descripción también pretende abarcar aldehídos peptídicos y alfa cetoésteres peptídicos que contienen un residuo hidrófobo en la posición P.sub.1 sometidos a prueba por Vinitsky, *et al.* (*Biochem.* 31: 9421 (1992), véase también Orlowski, *et al.*, *Biochem.* 32: 1563 (1993)) como posibles inhibidores de la actividad de tipo quimiotripsina del proteasoma. Otros tripéptidos que se han descrito en la bibliografía incluyen Ac-Leu-Leu-Leu-H, Ac-Leu-Leu-Met-OR, Ac-Leu-Leu-Nle-OR, Ac-Leu-Leu-Leu-OR, Ac-Leu-Leu-Arg-H, Z-Leu-Leu-Leu-H, Z-Arg-Leu-Phe-H y Z-Arg-Ile-Phe-H, en los que OR, junto con el carbonilo del residuo de aminoácido previo, representa un grupo éster, y la presente descripción pretende abarcarlos.

La presente descripción también pretende abarcar las proteasas de tipo quimiotripsina y sus inhibidores dados a conocer por Siman, *et al.* (documento WO 01/13904). Estos inhibidores tienen la fórmula R-A4-A3-A2-Y, en la que R es hidrógeno o un grupo de bloqueo del extremo N-terminal; A4 es un enlace covalente, un aminoácido o un péptido; A3 es un enlace covalente, un D-aminoácido, Phe, Tyr, Val o una sustitución de aminoácido conservativa de Val; A2 es un aminoácido hidrófobo o lisina o una sustitución de aminoácido conservativa de los mismos, o cuando A4 incluye al menos dos aminoácidos, A2 es cualquier aminoácido; e Y es un grupo reactivo con el sitio activo de dicha proteasa. La presente descripción también pretende abarcar los cetoésteres, cetoácidos y cetoamidas peptídicos y su uso en la inhibición de serina proteasas y cisteína proteasas dados a conocer por Powers (documento WO 92/12140) y los usos para compuestos inhibidores de calpaína y composiciones farmacéuticas que los contienen dados a conocer por Bartus, *et al.* (documento WO 92/1850).

En la presente descripción también se contempla usar los siguientes compuestos o análogos de los mismos como inhibidores de proteasomas: inhibidor de calpaína I, MG101, inhibidor de calpaína II, epoxomicina, fracción I (Frl, Hela), fracción II (Fll), clasto-lactacistina beta-lactona, lactacistina, MG-115, MG-132, antisuero frente a NEDD8, activador de PA28, proteasoma 20S, anticuerpo policlonal frente a la subunidad alfa de tipo 1 de proteasoma 20S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S10B de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S2 de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S4 de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S5A de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S6 de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S6' de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S7 de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a subunidad S8 de proteasoma 26S, anticuerpo policlonal frente a activador de proteasoma PA28 alfa, anticuerpo policlonal frente a activador de proteasoma PA28 gamma, anticuerpo policlonal frente a subunidad 10B de activador de proteasoma PA700, fracción de proteasoma 26S, inhibidor I de proteasomas, inhibidor II de proteasomas, sustrato I de proteasomas (fluorogénico), sustrato II de proteasomas (fluorogénico), sustrato III de proteasomas (fluorogénico), sustrato IV de proteasomas (fluorogénico), fracción S-100, SUMO-1/sentrina-1 (1-101), SUMO-1/sentrina-1 (1-97), antisuero frente a SUMO-1/sentrina-1, Ubc10, Ubc5b, Ubc5c, Ubc6, Ubc7, antisuero frente a Ubc9, Ubc9, UbcH2/E2-14K, UbcH3/Cdc34, UbcH5a, enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima activadora de ubiquitina (E1), aldehído de ubiquitina, fracciones de enzima conjugadora de ubiquitina, hidrolasa C-terminal de ubiquitina, ubiquitina K48R, ubiquitina metilada, GST-ubiquitina, (His)6-ubiquitina, ubiquitina-AMC, ubiquitina-Sepharose.

Una clase preferida de inhibidor de proteasomas es “PS-341” que se refiere a un inhibidor de proteasomas dipeptídico de ácido borónico. PS-341 inhibe la activación del factor de transcripción NF-κB. PS-341 también regula por disminución la expresión de varios inhibidores de la apoptosis, induce la apoptosis dependiente de caspasa de células de pacientes y líneas celulares de mieloma múltiple (MM) resistentes a fármacos, inhibe la unión de células de MM a células estromales de médula ósea (BMSC) e inhibe la producción de factores de supervivencia y crecimiento de MM en el medio de médula ósea. En un modelo de plasmacitoma murino, PS-341 inhibe el crecimiento tumoral de manera dependiente de la dosis y alarga la supervivencia del huésped. En un ensayo clínico multicéntrico de fase II de PS-341 en pacientes con MM que no responde al tratamiento, con recidiva, se observaron respuestas objetivo, incluyendo algunas respuestas completas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “agente” y “agente terapéutico” se definen ampliamente como cualquier cosa a la que células cancerosas, incluyendo células tumorales, pueden exponerse en un protocolo terapéutico. En el contexto de la presente descripción, tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterápicos, tales como agentes antimetabólicos, por ejemplo, Ara AC, 5-FU y metotrexato, agentes antimitóticos, por ejemplo, TAXOL, vinblastina y vincristina, agentes alquilantes, por ejemplo, melfalán, BCNU y mostaza nitrogenada, inhibidores de topoisomerasa II, por ejemplo, VW-26, topotecán y bleomicina, agentes de rotura de cadenas, por ejemplo, doxorubicina y DHAD, agentes de reticulación, por ejemplo, cisplatino y CBDCA, radiación y luz ultravioleta.

Tal como se usa en el presente documento, el término “agente quimioterápico” pretende incluir reactivos químicos que inhiben el crecimiento de tejidos o células en proliferación en los que no se desea el crecimiento de tales tejidos o células. Los agentes quimioterápicos se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, Gilman A.G., *et al.*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed., Sec 12:1202-1263 (1990)), y se usan normalmente para tratar enfermedades neoplásicas. Los agentes quimioterápicos empleados generalmente en tratamientos de quimioterapia se enumeran a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

CLASE	TIPO DE AGENTE	DENOMINACIONES COMUNES (Otros Nombres)
Alquilante	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina (HN ₂) Ciclofosfamida ifosfamida Melfalán (L-sarcolisina) Clorambucilo
	Etileniminas y metilmelaminas	Hexametilmelamina Tiotepa
	Alquilsulfonatos	Busulfano
Alquilante	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU) Lomustina (CCNU) Semustina (metil-CCNU) Estreptoizocina (estreptozotocina)
		Triacenos
	De alquilación	cis-diaminodicloroplatino II (CDDP)
	Análogos de ácido fólico	Metotrexato (ametopterina)
Antimetabolitos	Análogos de pirimidina	Fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU) Floxuridina (fluorodo-oxiuridina; FUdR) Citarabina (arabinósido de citosina)
		Análogos de purina e inhibidores relacionados
Productos naturales	Alcaloides de la vinca	Vinblastina (VLB) Vincristina
	Inhibidores de topoisomerasa	Etopósido Tenipósido Camptotecina Topotecán 9-amino-camptotecina CPT-11
	Antibióticos	Dactinomicina (actinomicina D) Adriamicina (Doxorubicina)

		Daunorubicina (daunomicina; rubindomicina)
		Doxorubicina
		Bleomicina
		Plicamicina (mitramicina)
		Mitomicina (mitomicina C)
		TAXOL
		Taxotere
	Enzimas	L-Asparaginasa
	Biológico	Interferón alfa
	Respuesta	
	Modificadores	interleucina 2
Agentes misceláneos	Complejos de coordinación de platino	cis-diaminodicloroplatino
		II (CDDP)
		Carboplatino
	Antracendiona	Mitoxantrona
	Urea sustituida	Hidroxiurea
	Derivado de metilhidrazina	Procarbazina (N-metilhidracina, (MIH))
Supresor suprarrenal	Mitotano (o,p'-DDD) Aminoglutetimida	
Hormonas y antagonistas	Adrenocorticosteroides	Prednisona, dexametasona
	Progestinas de hidroxiprogesterona	Caproato
		Medroxiprogesterona
		Acetato Acetato de megestrol
	Estrógenos	Dietilestilbestrol
		Etinilestradiol
	Antiestropeno	Tamoxifeno
	Andrógenos	Propionato de testosterona
Fluoximesterona		
Antiandrógeno	Flutamida	
Análogo de hormona de liberación de gonadotropina	Leuprolida	

Los agentes quimioterápicos usados en los presentes métodos pueden ser un único agente o una combinación de agentes. Las combinaciones preferidas incluirán agentes que tienen diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, el uso de un agente antimitótico en combinación con un agente alquilante. En una realización particularmente preferida, el agente quimioterápico usado en los métodos de la presente descripción es doxorubicina (adriamicina). En otra realización particularmente preferida, el agente quimioterápico usado en los métodos de la presente invención es melfalán.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer” pretende abarcar un tumor, incluyendo tumores tanto *in vitro* como *in vivo* que se forman en cualquier órgano o parte del cuerpo del sujeto. Los ejemplos de los tipos de tumores que se pretenden abarcar por la presente descripción incluyen los tumores asociados con cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de huesos, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de laringe, de vesícula biliar, de páncreas, de recto, de paratiroides, de tiroides, suprarrenal, de tejido neuronal, de cabeza y cuello, de colon, de estómago, de bronquios, de riñones. Específicamente, los tumores cuya tasa de crecimiento se inhibe por la presente invención incluyen carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas tanto de tipo ulceroso como papilar, carcinoma cutáneo metastásico, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma de células del retículo, mieloma, tumor de células gigantes, tumor de pulmón de células pequeñas, cálculos biliares, tumor de células de islote, tumor de cerebro primario, tumores linfocíticos y granulocíticos agudos y crónicos, tumor de células pilosas, adenoma, hiperplasia, carcinoma medular, feocromocitoma, neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinales, tumor de nervio de la córnea hiperplásico, tumor de hábito marfanoide, tumor de Wilm, seminoma, tumor de ovario, tumor de liomiomas, displasia cervical y carcinoma *in situ*, neuroblastoma, retinoblastoma, sarcoma de tejido blando, carcinoide maligno, lesión cutánea tópica, micosis fungoide, rabdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcomas osteogénicos y otros sarcomas, hipercalcemia maligna, tumor de células renales, policitemia vera, adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, leucemias, linfomas, melanomas malignos, carcinomas epidermoides y otros carcinomas y sarcomas.

En una realización preferida, el tumor es mieloma múltiple. Tal como se usa en el presente documento, el término “mieloma múltiple” se refiere a tumores malignos de la médula ósea en los que células plasmáticas cancerosas crecen fuera de control y crean un tumor. Cuando estos tumores crecen en múltiples sitios, se denominan mieloma

múltiple. Normalmente, las células plasmáticas constituyen menos del cinco por ciento de las células en la médula ósea, pero en personas con mieloma múltiple oscila entre el diez por ciento y más del noventa por ciento. El sobrecrecimiento de células plasmáticas malignas en médula ósea puede provocar varios problemas graves en todo el cuerpo. A lo largo del tiempo, las células anómalas pueden penetrar al interior del hueso y erosionar la corteza ósea (capa externa). Estos huesos debilitados son más susceptibles a fracturas óseas, especialmente en la columna vertebral, cráneo, costillas y pelvis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula cancerosa” pretende incluir células tumorales, y se refiere a células que se dividen a una tasa anómala (aumentada). Las células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, tales como carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, adenocarcinoma, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma no diferenciado, carcinoma broncogénico, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma de células hepáticas-hepatoma, carcinoma del conducto biliar, colangiocarcinoma, carcinoma papilar, carcinoma de células transicionales, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, carcinomas de mamas, carcinoma gastrointestinal, carcinomas colónicos, carcinomas de vejiga, carcinoma de próstata y carcinoma de células escamosas de la región del cuello y la cabeza; sarcomas, tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, sinoviosarcoma y mesoteliosarcoma; leucemias y linfomas tales como leucemia granulocítica, leucemia monocítica, leucemia linfocítica, linfoma maligno, plasmocitoma, sarcoma de células del retículo o enfermedad de Hodgkin; y tumores del sistema nervioso incluyendo glioma, meningioma, meduloblastoma, schwannoma o epindimoma.

Tal como se usa en el presente documento, el término “que inhibe el crecimiento de células cancerosas” pretende incluir la inhibición del crecimiento celular inapropiado o no deseado. La inhibición pretende incluir inhibición de proliferación incluyendo proliferación rápida. El término “que inhibe el crecimiento de células cancerosas” también pretende abarcar la inhibición del crecimiento tumoral que incluye la prevención del crecimiento de un tumor en un sujeto o una reducción en el crecimiento de un tumor preexistente en un sujeto. La inhibición también puede ser la inhibición de la metástasis de un tumor de un sitio hacia otro. Un cáncer se “inhibe” si al menos un síntoma del cáncer se alivia, termina, ralentiza o previene. Tal como se usa en el presente documento, el cáncer también se “inhibe” si la recidiva o metástasis del cáncer se reduce, ralentiza, retrasa o previene.

Una célula cancerosa es “sensible” a un agente terapéutico si su tasa de crecimiento se inhibe como resultado del contacto con un agente terapéutico, en comparación con su crecimiento en ausencia del contacto con el agente terapéutico. La calidad de ser sensible a un agente terapéutico es variable, presentando diferentes células cancerosas diferentes niveles de “sensibilidad” a un agente terapéutico dado, en diferentes condiciones.

Una célula cancerosa es “resistente” a un agente terapéutico si su tasa de crecimiento no se inhibe, o se inhibe a un grado muy bajo, como resultado del contacto con el agente terapéutico cuando se compara con su crecimiento en ausencia de contacto con el agente terapéutico. La calidad de ser resistente a un agente terapéutico es altamente variable, presentando diferentes células cancerosas diferentes niveles de “resistencia” a un agente terapéutico dado en diferentes condiciones.

La determinación de si un paciente es “sensible” o “resistente” a un protocolo y/o agente terapéutico puede realizarse fácilmente por el médico (el “médico que atiende”), como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas. Por ejemplo, el médico que atiende consideran varios factores, incluyendo, pero sin limitarse: el cáncer específico implicado; las características farmacodinámicas del agente terapéutico particular; el tamaño, la edad y la salud general del paciente; el grado de o la implicación de o la gravedad del cáncer; el compuesto particular administrado; el modo de administración; y otras circunstancias relevantes.

El término “administración” pretende incluir vías de administración que permiten al inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico llevar a cabo sus funciones deseadas de tratamiento de cáncer o de inhibición del crecimiento de células cancerosas. Ejemplos de vías de administración que pueden usarse incluyen inyección (subcutánea, intravenosa, por vía parenteral, por vía intraperitoneal, intratecal, etc.), vía oral, inhalación y vía transdérmica. La inyección puede ser inyecciones en bolo o puede ser infusión continua. Dependiendo de la vía de administración, el inhibidor de proteasomas o agente terapéutico puede recubrirse con o disponerse en un material seleccionado para protegerlo de condiciones naturales que pueden afectar de manera perjudicial a su capacidad de llevar a cabo su función deseada. El inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico puede administrarse solo, o conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. Además, el inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico puede administrarse como una mezcla de inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico, que también puede coadministrarse con un portador farmacéuticamente aceptable. El inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico también puede administrarse como un profármaco que se convierte en su forma activa *in vivo*.

La expresión “cantidad eficaz” de la combinación del inhibidor de proteasomas y el agente terapéutico es esa cantidad necesaria o suficiente para tratar el cáncer o inhibir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo prevenir el crecimiento celular no deseado, o reducir el tamaño de un tumor maligno o masa celular benigna

preexistente en el sujeto. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el tipo de crecimiento celular que está tratándose o inhibiéndose, el tipo de agente(s) terapéutico(s) empleado(s), el inhibidor particular de proteasomas, el tamaño del sujeto, o la gravedad del tumor o crecimiento de células cancerosas. Por ejemplo, la elección de cada uno de los agentes individuales (inhibidor de proteasomas o agente quimioterápico) que constituyen la combinación puede afectar a lo que constituye una "cantidad eficaz".

Por ejemplo, puede usarse un ensayo *in vitro* para determinar una "cantidad eficaz" de la combinación del inhibidor de proteasomas PS-341 y un agente quimioterápico. El experto habitual en la técnica seleccionaría una cantidad apropiada de cada agente individual en la combinación para su uso en el ensayo *in vitro* mencionado anteriormente. La fracción de supervivencia celular puede usarse para determinar si las cantidades seleccionadas fueron una "cantidad eficaz" para la combinación particular de agentes. Por ejemplo, las cantidades seleccionadas usadas dentro del ensayo deben dar como resultado preferiblemente una destrucción de al menos el 50% de las células, más preferiblemente el 75% y lo más preferiblemente al menos el 95%. En una realización preferida, la dosis eficaz del inhibidor de proteasomas PS-341 y el agente terapéutico es una dosis subtóxica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión dosis subtóxica se refiere a una dosis que da como resultado la destrucción de menos de aproximadamente el 10% de las células. En una realización, la dosis eficaz de un inhibidor de proteasomas PS-341 es de desde aproximadamente 0,001 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 4,0 mg/m² de área de superficie corporal/día. En otra realización, la dosis eficaz de un inhibidor de proteasomas PS-341 es de desde aproximadamente 0,001 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 0,01 mg/m² de área de superficie corporal/día. En otra realización, la dosis eficaz de un inhibidor de proteasomas PS-341 es de desde aproximadamente 0,01 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 0,1 mg/m² de área de superficie corporal/día. En una realización adicional, la dosis eficaz de un inhibidor de proteasomas PS-341 es de desde aproximadamente 0,1 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 2,0 mg/m² de área de superficie corporal/día. Aún en una realización adicional, la dosis eficaz de un inhibidor de proteasomas PS-341 es de desde aproximadamente 0,1 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 1,7 mg/m² de área de superficie corporal/día.

El régimen de administración también puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. El inhibidor de proteasomas PS-341 puede administrarse al sujeto antes de, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico. Además, pueden administrarse varias dosificaciones divididas, así como dosificaciones escalonadas, diaria o secuencialmente, o la dosis puede infundirse continuamente. Además, las dosificaciones pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

El término "régimen de administración" se refiere a la selección de los momentos de administración y la secuencia de administración del inhibidor de proteasomas y el agente terapéutico que permiten al inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico llevar a cabo sus funciones deseadas de tratamiento de cáncer o de inhibición del crecimiento de células cancerosas. El régimen de administración, por ejemplo, la selección de los momentos y/o secuencia de administración, del inhibidor de proteasomas y/o el agente terapéutico pueden variar dependiendo de factores tales como la farmacocinética del inhibidor de proteasomas empleado, la farmacocinética del agente terapéutico usado, el tipo de crecimiento celular que está tratándose o inhibiéndose, el tamaño del sujeto, la gravedad del tumor o crecimiento de células cancerosas, o la dosificación eficaz. La elección de cada uno de los agentes individuales (inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico) que constituyen la combinación puede afectar a lo que constituye un "régimen de administración". Por ejemplo, en descripciones en las que es deseable el contacto de una célula con un inhibidor de proteasomas después que la célula se pone en contacto con un agente terapéutico, puede administrarse un inhibidor de proteasomas con una farmacocinética más lenta antes de la administración del agente terapéutico de manera que el inhibidor de proteasomas se pone en contacto con la célula posterior al contacto con el agente terapéutico. Pueden administrarse inhibidores de proteasomas con una rápida farmacocinética después del agente terapéutico de manera que el inhibidor de proteasomas se pone en contacto con la célula posteriormente al contacto con el agente terapéutico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización incluso más preferida, el sujeto es un ser humano.

I. Métodos de la invención

Los métodos de la descripción se refieren a composiciones terapéuticas y profilácticas para tratar el cáncer o prevenir el crecimiento de células cancerosas, por ejemplo, crecimiento tumoral, en un sujeto. Las composiciones de la presente descripción incluyen una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, por ejemplo, en un portador farmacéuticamente aceptable. Otros aspectos de la descripción incluyen agente(s) quimioterápico(s) e inhibidor(es) de proteasomas envasados. Los agentes y compuestos envasados también incluyen instrucciones para usar la combinación de agente quimioterápico/inhibidor de proteasomas para tratar el cáncer o prevenir el crecimiento de células cancerosas.

En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos para tratar el cáncer, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento tumoral, en un sujeto administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico. Los métodos de la presente invención permiten una reducción en la cantidad del agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, requerida para ser eficaz, dando como resultado menos efectos secundarios en el sujeto que está tratándose.

Aún en otro aspecto, la descripción se refiere a métodos para la purga de médula ósea, es decir, la eliminación de células cancerosas de la médula ósea, exponiendo las células de médula ósea a un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico. La médula ósea purgada puede colocarse entonces de nuevo en el sujeto del que se extrajo la médula ósea, o colocarse en un sujeto diferente.

En general, los métodos de la descripción incluyen una etapa de poner en contacto células cancerosas con una combinación de un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, eficaz para promover la apoptosis o la muerte celular. En un aspecto, el inhibidor de proteasomas y el agente terapéutico están envasados. En otro aspecto, la cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas es de desde aproximadamente 0,001 mg/m² de área de superficie corporal/día hasta aproximadamente 4,0 mg/m² de área de superficie corporal/día.

Tal como se usa en el presente documento, el término "muerte celular" incluye los procesos por los que mueren células de mamífero o llegan a diferenciarse de manera terminal. Tales procesos incluyen la apoptosis (tanto reversible como irreversible) y procesos que se cree que implica la apoptosis (por ejemplo, senescencia celular), así como necrosis y diferenciación celular terminal. "Muerte celular" se usa en el presente documento para referirse a la muerte o la muerte inminente de células nucleadas (por ejemplo, neuronas, miocitos, hepatocitos y similares) así como a la muerte o la muerte inminente de células anucleadas (por ejemplo, glóbulos rojos, plaquetas y similares). La muerte celular se manifiesta normalmente mediante la exposición del fosfolípido fosfatidilserina (PS) de la membrana interna en la valva externa de la membrana plasmática y puede detectarse mediante métodos reconocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "apoptosis" incluye la muerte celular programada que también puede detectarse usando técnicas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, la muerte celular apoptótica puede caracterizarse, por ejemplo, por contracción celular, formación de vesículas en la membrana y condensación de cromatina que culmina en fragmentación celular. Las células que experimentan apoptosis también presentan un patrón característico de escisión de ADN internucleosómico. La apoptosis puede medirse en presencia o ausencia de señales mediadas por Fas. En una realización, puede detectarse la liberación del citocromo C de la mitocondria durante la apoptosis celular, por ejemplo, la apoptosis de células plasmáticas (tal como se describe en, por ejemplo, Bossy-Wetzel, E., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:235-42). Otros ensayos incluyen: cuantificación citofluorométrica de la apoptosis nuclear inducida en un sistema libre de células (tal como se describe en, por ejemplo, Lorenzo, H.K., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:198-201); ensayos de nucleasa apoptótica (tal como se describe en, por ejemplo, Hughes, F.M. (2000) *Methods in Enzymol.* 322:47-62); análisis de células apoptóticas, por ejemplo, células plasmáticas apoptóticas, mediante citometría de exploración por láser y flujo (tal como se describe en, por ejemplo, Darzynkiewicz, Z., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:18-39); detección de la apoptosis mediante marcaje con anexina V (tal como se describe en, por ejemplo, Bossy-Wetzel, E., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:15-18); ensayos de transfección transitoria para genes de muerte celular (tal como se describe en, por ejemplo, Miura, M., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:480-92); y ensayos que detectan la escisión del ADN en células apoptóticas, por ejemplo, células plasmáticas apoptóticas (tal como se describe en, por ejemplo, Kauffman, S.H., *et al.* (2000) *Methods in Enzymol.* 322:3-15). También puede medirse la apoptosis mediante tinción con yoduro de propidio o mediante ensayo TUNEL.

En otro aspecto, la descripción ofrece métodos para inhibir la proliferación de células cancerosas poniendo en contacto las células con un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico. En general, el método incluye una etapa de poner en contacto células cancerosas con un inhibidor de proteasomas y un agente terapéutico eficaz para reducir la proliferación de células cancerosas. La reducción de proliferación de células cancerosas puede detectarse mediante al menos una de las siguientes actividades biológicas: (1) una disminución en proliferación de células de tumores sólidos; (2) una disminución en la fracción de células en la fase de síntesis de ADN del ciclo celular (fase S); (3) un aumento en la expresión de marcadores asociados con diferenciación; (4) una disminución en la expresión de marcadores asociados con proliferación tales como Ki-67 (MIB-1), por ejemplo, una disminución en la expresión de Ki-67 en aproximadamente el 30-50%, usando técnicas que se conocen en la técnica. Pueden producirse cambios en la expresión en los niveles de proteína o ARNm.

El presente método puede llevarse a cabo en células en cultivo, por ejemplo, *ex vivo*, o puede llevarse a cabo en células presentes en un sujeto animal, por ejemplo, como parte de un protocolo terapéutico *in vivo*. El régimen terapéutico puede llevarse a cabo en un ser humano u otro sujeto animal.

Los métodos de la presente descripción permiten una reducción en la cantidad del agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, requerida para ser eficaz, dando como resultado menos efectos secundarios en el sujeto

que está tratándose.

En una realización, las células que van a tratarse son células de mieloma múltiple. Por ejemplo, el presente método puede llevarse a cabo para prevenir la proliferación de un tumor de células de mieloma múltiple. Tal como se usa en el presente documento, el término "mieloma múltiple" se refiere a tumores malignos de la médula ósea en los que células plasmáticas cancerosas crecen fuera de control y crean un tumor. Cuando estos tumores crecen en múltiples sitios, se denominan mieloma múltiple.

Los ejemplos particulares de agentes quimioterápicos incluyen sustancias antitumorales tales como: inhibidores mitóticos, tales como vinblastina; agentes alquilantes, tales como cisplatino, carboplatino y ciclofosfamida; antimetabolitos, tales como 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, hidroxiaurea o ácido N-[5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil]-L-glutámico; antibióticos intercalantes, tales como por ejemplo adriamicina y bleomicina; enzimas, tales como asparaginasa; inhibidores de topoisomerasa, tales como etopósido; modificadores de respuestas biológicas, por ejemplo, para potenciar respuestas antitumorales, tales como interferón; agentes apoptóticos, tales como actinomicina D; y antihormonas, por ejemplo antiandrógenos tales como tamoxifeno o, por ejemplo antiandrógenos tales como 4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil)propionanilida. Otros ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen los enumerados en la tabla 1.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, puede realizarse fácilmente por el médico (el "médico que atiende"), como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Las dosificaciones pueden variarse dependiendo de las necesidades del paciente según el criterio del médico que atiende, la gravedad del estado que está tratándose y el compuesto particular que está empleándose. En la determinación de la dosis o cantidad terapéuticamente eficaz, el médico que atiende considera varios factores, incluyendo, pero sin limitarse: la célula neoplásica/hiperplásica específica implicada; las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; el transcurso de tiempo deseado de tratamiento; la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de o la implicación de o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el tipo de tratamiento simultáneo; y otras circunstancias relevantes. La patente estadounidense 5.427.916, por ejemplo, describe un método para predecir la eficacia de la terapia antineoplásica en pacientes individuales e ilustra determinados métodos que pueden usarse conjuntamente con los protocolos de tratamiento de la presente invención.

El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después de eso, la dosis debe aumentarse en incrementos pequeños hasta alcanzarse el efecto óptimo según las circunstancias. Por conveniencia, si se desea, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día.

Se espera que una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de proteasomas sea desde aproximadamente 0,001 miligramos por metro cuadrado de área de superficie corporal por día (mg/m^2 de área de superficie corporal/día) hasta aproximadamente $4 \text{ mg}/\text{m}^2$ de área de superficie corporal/día. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterápico se determina y puede determinarse usando métodos reconocidos en la técnica.

La eficacia de cualquier combinación particular de un inhibidor de proteasomas con un agente quimioterápico para tratar el cáncer puede monitorizarse comparando dos o más muestras obtenidas de un paciente que se somete a tratamiento anticancerígeno. En general, es preferible obtener una primera muestra del paciente antes de comenzar la terapia y una o más muestras durante el tratamiento. En un uso de este tipo, se determina una referencia de la expresión de células cancerosas antes de la terapia y luego se monitorizan los cambios en el estado de referencia de la expresión de células cancerosas durante el transcurso de la terapia. Alternativamente, pueden usarse dos o más muestras sucesivas obtenidas durante el tratamiento sin necesidad de una muestra de referencia de pretratamiento. En un uso de este tipo, la primera muestra obtenida del sujeto se usa como referencia para determinar si la expresión de células cancerosas está aumentando o disminuyendo.

En general, cuando se monitoriza la eficacia de un tratamiento terapéutico, se examinan dos o más muestras del paciente. Preferiblemente, se usan tres o más muestras obtenidas sucesivamente, incluyendo al menos una muestra de pretratamiento.

II. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de proteasomas y/o agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterápico, formulado junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Tal como se describe en detalle a continuación, las composiciones farmacéuticas de la

presente descripción pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (suspensiones o disoluciones acuosas o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea tal como, por ejemplo, una suspensión o disolución estéril; (3) aplicación tópica, por ejemplo, tal como una crema, pomada o pulverización aplicada a la piel; (4) por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, tal como un óvulo vaginal, una crema o una espuma; o (5) aerosol, por ejemplo, tal como un aerosol acuoso, preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento, significa la cantidad de una combinación de un inhibidor de proteasomas y un agente quimioterápico, o composición que comprende una combinación de un inhibidor de proteasomas y un agente quimioterápico que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición de la proliferación y/o la inducción de la diferenciación de al menos una subpoblación de células en un animal a una razón beneficio/riesgo razonable que puede aplicarse a cualquier tratamiento médico.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en el presente documento para referirse a las combinaciones de un inhibidor de proteasomas y un agente quimioterápico, a los materiales, las composiciones, y/o las formas farmacéuticas que son adecuadas, dentro del alcance del criterio médico responsable, para su uso en contacto con tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas u otro problema o complicación, acorde con una razón beneficio/riesgo razonable.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento, significa un vehículo, una composición o un material farmacéuticamente aceptable, tal como material de encapsulación, disolvente, excipiente, diluyente, carga sólida o líquida, implicados en portar o transportar el producto químico del sujeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo, (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite 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 de tamponamiento, 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) disoluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales de adición de ácido inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de los inhibidores de proteasomas y/o los agentes quimioterápicos abarcados por la invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento final y la purificación y de los inhibidores de proteasomas o los agentes quimioterápicos, o haciendo reaccionar por separado los inhibidores de proteasomas o los agentes quimioterápicos purificados en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naptilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge, *et al.* (1977) “Pharmaceutical Salts”, J Pharm. Sci. 66:1-19)

En otros casos, los inhibidores de proteasomas o los agentes quimioterápicos útiles en los métodos de la presente descripción contienen uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de los inhibidores de proteasomas o los agentes quimioterápicos. Estas sales pueden prepararse asimismo *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los inhibidores de proteasomas o los agentes quimioterápicos, o haciendo reaccionar por separado el inhibidor de proteasomas o el agente quimioterápico purificado 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 primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. 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.*, citado anteriormente).

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 recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

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.

Las formulaciones útiles en los métodos de la presente descripción incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, en aerosol y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de portador para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del huésped que está tratándose y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de portador para producir una forma farmacéutica única será generalmente aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad oscilará desde aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente desde aproximadamente el 5 por ciento hasta aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferiblemente desde aproximadamente el 10 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento.

Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un inhibidor de proteasomas o un agente quimioterápico con el portador y, opcionalmente, uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme y estrecha un inhibidor de proteasomas o un agente quimioterápico con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dándole forma al producto.

Formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos para medicamentos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o goma tragacanto), polvos, gránulos, o como disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un inhibidor de proteasomas o un agente quimioterápico como principio activo. Un compuesto también puede administrarse como un bolo, un electuario o una pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados 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 acetílico 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 mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda o dura usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido también puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos fabricados por compresión pueden prepararse usando un agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del peptidomimético o péptido en polvo o humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden estar opcionalmente ranurados o pueden prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos que se conocen bien en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo usando en los mismos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro que retiene 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 también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libera el/los principio(s) activo(s) sólo, o preferiblemente, en una

determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones embebidas que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

5 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes de solubilización 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, salvado, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

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

15 Las suspensiones, además del inhibidor de proteasomas activo y/o los agentes quimioterápicos pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isostearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitano de polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto y mezclas de los mismos.

20 Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más inhibidores de proteasomas y/o agentes quimioterápicos con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o la cavidad vaginal y liberará el principio activo.

25 Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen portadores tal como se conoce que es apropiado en la técnica.

30 Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un inhibidor de proteasomas y/o un agente quimioterápico incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches y inhalaciones. El componente activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que puede requerirse.

35 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un inhibidor de proteasomas y/o un agente quimioterápico, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de los mismos.

40 Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un inhibidor de proteasomas y/o un agente quimioterápico, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamidas, o mixtures de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

45 El inhibidor de proteasomas y/o agente quimioterápico pueden administrarse alternativamente en aerosol. Esto se lleva a cabo preparando un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Puede usarse una suspensión no acuosa (por ejemplo, propelente de fluorocarbono). Se prefieren nebulizadores sónicos porque minimizan la exposición del agente a cizalladura, que puede dar como resultado la degradación del compuesto.

50 De manera ordinaria, un aerosol acuoso se prepara formulando una suspensión o disolución acuosa del agente junto con estabilizadores y portadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Los estabilizadores y portadores varían con las necesidades del compuesto particular, pero normalmente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina sérica, ésteres de sorbitano, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan generalmente a partir de disoluciones isotónicas.

55 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un inhibidor de proteasomas y/o un agente quimioterápico al cuerpo. Tales formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispersando el agente en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del peptidomimético a través de la piel. La tasa de tal flujo puede controlarse o bien proporcionando

una membrana de control de la tasa o bien dispersando el peptidomimético en un gel o matriz de polímero.

También se contemplan formulaciones oftálmicas, pomadas oftálmicas, polvos, disoluciones y similares, como dentro del alcance de esta invención.

5 Las composiciones farmacéuticas de esta descripción adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más inhibidores de proteasomas y uno o más agentes quimioterápicos en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en dispersiones o disoluciones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor o agentes de suspensión o espesantes deseados.

15 Ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

20 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco de la inyección intramuscular o subcutánea. Esto puede llevarse a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, se lleva a cabo una absorción retardada de una forma farmacológica administrada por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

35 Se preparan formas de absorción lenta inyectables formando matrices de microcápsulas de un inhibidor de proteasomas y un agente quimioterápico en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la razón de fármaco con respecto a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación de fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de absorción lenta atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

40 Cuando los inhibidores de proteasomas y el agente quimioterápico de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden administrarse *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,1 al 99,5% (más preferiblemente, del 0,5 al 90%) de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

45 Pueden variarse los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente.

50 EJEMPLOS

La siguiente metodología descrita en la sección de Materiales y métodos se usó en todos los ejemplos *in vitro* y/o *in vivo* ejemplos expuestos a continuación.

55 Materiales y métodos

Cultivo tisular

60 Las líneas celulares de MM humanas incluyeron MM.1S, RPMI-8226/S y sus sublíneas resistentes a doxorubicina (Dox40) y melfalán (LR5), ARP-1, S6B45, NCI-H929 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) e INA6 (un obsequio de Renate Burger, University of Erlangen-Nuernberg, Alemania). Se aislaron recientemente células tumorales de la médula ósea de pacientes con MM.

65 *Caso clínico*

Una mujer de 58 años de edad, con MM con IgG lambda que no responde al tratamiento con recidiva, ha recibido terapia previa con melfalán y prednisona; vincristina, adriamicina (doxorubicina), dexametasona (VAD) más ciclofosfamida; melfalán en altas dosis y trasplante de células madre autólogas; interferón alfa; y talidomida. Tras el consentimiento informado, recibió PS-341 cíclico, 1,3 mg/m² i.v. dos veces por semana durante 2 semanas con una semana de descanso, según el protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB). Aunque la paraproteína sérica disminuyó desde 5,1 gm/dl hasta 3,3 gm/dl tras de 3 ciclos de PS-341, desarrolló fatiga y agravamiento de una neuropatía periférica preexistente. Por tanto, se redujo la dosis de PS-341 a 1 mg/m² y completó 4 ciclos de terapia. Debido a la enfermedad progresiva demostrada por el aumento de paraproteína (5,0 gm/dl) y células plasmáticas circulantes, se añadió dexametasona (40 mg dos veces por semana durante 2 semanas cada ciclo). Aunque disminuyó ligeramente a 4,7 gm/dl su carga tumoral, tal como se evaluó mediante las mediciones de los niveles en sangre periférica de la proteína monoclonal producida por el tumor (componente M), y se eliminaron transitoriamente células plasmáticas circulantes, desarrolló rápidamente enfermedad progresiva, con el 48% de células plasmáticas circulantes después del 6º ciclo; se interrumpió el protocolo de tratamiento con PS-341. La terapia posterior con ciclofosfamida i.v.; talidomida; talidomida sola, dexametasona y bixina; así como Doxil (doxorubicina liposómica) con talidomida y dexametasona, fue ineficaz. En ese momento, se aislaron células de MM mediante aspiración de médula ósea (MO) y se purificaron tal como se describió anteriormente (Mitsiades, C.S., *et al.* Blood 98:795, 2001).

20 *Materiales*

Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA) proporcionó PS-341. Se obtuvieron MTT, dexametasona, doxorubicina y melfalán de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

25 Se adquirieron los anticuerpos frente a Ku 70 y 80 de Lab Vision Corporation (Fremont, CA).

Métodos

Se llevaron a cabo el aislamiento de ARN, la obtención del perfil de expresión génica y el análisis de datos tal como se describió anteriormente. Se llevó a cabo el análisis proteómico global de alto rendimiento del estado de señalización de células de MM tratadas con PS-341 mediante matrices de inmunotransferencia múltiple usando, por ejemplo, las plataformas KPKS-1.0 y KPSS-1.0, tal como se describió anteriormente (Mitsiades, N., *et al.* Blood. 15 de marzo de 2003; 101(6):2377-80 y Mitsiades, C.S., *et al.* Semin Oncol. Abril de 2003; 30(2):156-60). Se llevaron a cabo análisis de inmunotransferencia y cuantificación de la supervivencia celular con el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) tal como se describió anteriormente.

Se repitieron todos los experimentos al menos tres veces y se repitió cada condición experimental al menos en pocillos por cuadruplicado. Se muestran los resultados de los experimentos representativos. Se calcularon los valores de DL50 usando el paquete estadístico SPSS-11.0. Se examinó la significación estadística mediante un análisis de varianza de 2 vías, seguido por prueba a posteriori de Duncan. En todos los análisis, p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo de referencia 1: concentraciones subtóxicas de PS-341 potencian la sensibilidad de células cancerosas a agentes quimioterápicos

Se pretrataron células MM.1S con doxorubicina (40 nM), melfalán (1 µM) o dexametasona (0,5 µM) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 horas adicionales. Tal como se muestra en la figura 1A, PS-341, a una concentración subtóxica, mejora notablemente la sensibilidad de las células MM.1S a concentraciones subtóxicas de doxorubicina y de melfalán (P<0,001 en ambos casos) (barras negras: sin PS-341, barras blancas: con PS-341). Por tanto, PS-341 sensibiliza células MM.1S a quimioterapia que daña el ADN.

Sin embargo, la concentración subtóxica de PS-341 no aumentó el efecto anti-MM de dexametasona (P>0,05). Por tanto, sólo existe citotoxicidad aditiva entre PS-341 y dexametasona.

Ejemplo de referencia 2: PS-341 disminuye la DL50 de doxorubicina

Se llevó a cabo un análisis de dosis-respuesta para determinar el efecto de doxorubicina sobre células MM.1S en presencia o ausencia de PS-341 (2 nM). Tal como se muestra en la figura 1B, la DL50 para doxorubicina en células MM.1S era de 150 nM en ausencia y de 26 nM en presencia de PS-341 (2 nM). Por tanto, PS-341 disminuye la DL50 de doxorubicina desde 150 hasta 26 nM. La concentración de PS-341 es de 10-30 nM en suero de pacientes, con picos de 100 nM, que es suficiente para lograr este efecto sinérgico *in vivo*.

Ejemplo de referencia 3: La secuencia de administración de doxorubicina y PS-341 repercute en su efecto anti-MM sinérgico

Se estudió si la secuencia de administración de doxorubicina y PS-341 repercute en su efecto anti-MM sinérgico. Se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Las células MM.1S (a) se pretrataron con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales; o (b) se pretrataron con PS-341 durante 24 h y luego con doxorubicina durante 24 h adicionales; o (c) se trataron con PS-341 y doxorubicina juntos durante 24 h. Tal como se muestra en la figura 1C, aunque la combinación de PS-341 y doxorubicina era más potente que cualquier fármaco solo en cualquiera de estas condiciones ($P < 0,05$ en todos los casos), se observó la sinergia más pronunciada cuando se pretrataron células de MM con doxorubicina seguido por PS-341. Por tanto, en todos los casos se encontró un efecto sinérgico, pero se observó la sinergia más fuerte cuando se pretrataron las células con doxorubicina seguido por tratamiento con PS-341.

Ejemplo de referencia 4: PS-341 sensibiliza todas las líneas celulares de MM a quimioterapia

Se estudió si PS-341 sensibiliza todas las líneas celulares de MM a quimioterapia. Se pretrataron células RPMI-8226/S, ARP-1, S6B45, NCI-H929 e INA6 con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego con PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales. Tal como se muestra en la figura 1D, PS-341 sensibiliza todas las líneas celulares de MM a quimioterapia.

Ejemplo de referencia 5: PS-341 sensibiliza células de MM primarias de pacientes a doxorubicina

Se estudió si PS-341 sensibiliza células de MM primarias de pacientes sin tratamiento previo con PS-341. Se pretrataron células de MM primarias de pacientes sin tratamiento previo con PS-341 con doxorubicina (50 ng/ml) durante 24 h y luego con PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales. Tal como se muestra en la figura 1E, PS-341 sensibiliza células de MM primarias de pacientes a doxorubicina.

Ejemplo de referencia 6: PS-341 aumenta la quimiosensibilidad en células de MM tanto sensibles a fármaco de doxorubicina como resistentes a fármaco de doxorubicina

Se estudió si PS-341 sensibiliza células que se han seleccionado por su resistencia a doxorubicina. Se pretrataron células RPMI-Dox40 resistentes a doxorubicina con o sin doxorubicina (800 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2-10 nM) durante 24 h adicionales. Tal como se muestra en la figura 1F, PS-341 sensibiliza células RPMI-Dox40 a doxorubicina. Por tanto, de manera importante, se observa el mismo efecto sensibilizador en células que se han seleccionado por su resistencia a doxorubicina lo que indica que PS-341 aumenta la quimiosensibilidad en células de MM tanto sensibles a fármacos como resistentes a fármacos.

Ejemplo de referencia 7: PS-341 aumenta la quimiosensibilidad en células de MM tanto sensibles a fármaco de melfalán como resistentes a fármaco de melfalán

Se estudió si PS-341 sensibiliza células que se han seleccionado por su resistencia a melfalán. Se pretrataron células LR5 resistentes a melfalán con o sin melfalán (5 μ M) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (2 nM) durante 24 h adicionales. Tal como se muestra en la figura 1G, PS-341 sensibiliza células LR5 a melfalán. Por tanto, de manera importante, se observa el mismo efecto sensibilizador en células que se han seleccionado por su resistencia a melfalán, lo que indica además que PS-341 aumenta la quimiosensibilidad en células de MM tanto sensibles a fármacos como resistentes a fármacos.

Ejemplo 8: La sinergia entre PS-341 y quimioterapia puede invertir la resistencia a agentes quimioterápicos

Se estudió el efecto de PS-341 sobre la quimiosensibilidad de células de MM primarias aisladas de un paciente que había experimentado recidiva tras quimioterapia convencional y de alta dosis, incluyendo, terapia con interferón- γ , talidomida sola o en combinación con esteroides o fármacos citotóxicos, doxorubicina liposómica y PS-341 solo o en combinación con dexametasona. Se pretrataron células de MM aisladas de un paciente que había experimentado recidiva tras el tratamiento con PS-341 con o sin doxorubicina (100 ng/ml) durante 24 h y luego se añadió PS-341 (5-20 nM) durante 24 h adicionales. Las células de MM de estos pacientes tienen una sensibilidad baja a monoterapia o bien de PS-341 (CI_{50} de >50 nM en comparación con $CI_{50} < 5$ nM en células de MM de pacientes sensibles a PS-341) o bien de doxorubicina *in vitro*. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 1H, el pretratamiento con doxorubicina supera la resistencia de las células a PS-341 y la combinación de doxorubicina y PS-341 dio como resultado la muerte de células de MM significativa. Por tanto, puede invertirse la sinergia entre PS-341 y quimioterapia para cualquier agente solo.

Ejemplo de referencia 9: PS-341 suprime la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR).

Se estudió si PS-341 suprime la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR). Se trataron células MM.1S durante 24 h con doxorubicina (100-200 ng/ml) en pocillos recubiertos con o sin fibronectina (FN). Se añadió PS-341 (10 nM) durante 24 h adicionales. En todos los casos, el % de supervivencia celular (media \pm DE) se cuantifica mediante MTT. Se repitieron todos los experimentos al menos tres veces y se repitió cada condición experimental al menos en pocillos por cuadruplicado en cada experimento.

Se disminuye la sensibilidad de células de MM a doxorubicina tras la unión de células tumorales a componentes de la matriz extracelular, en particular fibronectina. Esta resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR) está asociada con un aumento de disponibilidad del inhibidor de caspasa, FLIP, para la unión al receptor de muerte Fas y la disminución de la activación de caspasa-8. PS-341 disminuye la expresión de FLIP y facilita la activación de caspasa-8 dependiente de Fas. Tal como se muestra en la figura 11, las células MM.1S son menos sensibles a doxorubicina en presencia que en ausencia de fibronectina, pero PS-341 supera completamente este efecto anti-apoptótico ($P < 0,05$). Por tanto, PS-341 suprime la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR).

10 **Ejemplo 10: El mecanismo de quimiosensibilización por PS-341**

PS-341 disminuye la expresión de Bcl-2, A1, cIAP-2, XIAP y FLIP. Estos efectos pueden deberse, al menos en parte, a la inhibición de la activación de NF- κ B por PS-341, puesto que la inhibición específica de NF- κ B regula por disminución estos inhibidores de la apoptosis y sensibiliza las células de MM a doxorubicina. Para estudiar adicionalmente el mecanismo de quimiosensibilización por PS-341, se detectaron perfiles transcripcionales de células MM-1S tratadas con PS-341 frente a células control usando un análisis de micromatriz de oligonucleótidos (figura 2A). PS-341 induce cambios en transcritos implicados en la regulación de la apoptosis, crecimiento celular, función de proteasomas y respuesta de choque térmico. Se estudió específicamente el efecto de PS-341 sobre transcritos en respuesta a quimioterapia. Los resultados mostraron que los cambios transcripcionales inducidos por PS-341 (100 nM, 1-8 h) incluyen regulación por disminución de una agrupación funcional de moléculas implicadas en la respuesta al estrés genotóxico. Específicamente, PS-341 regulaba por disminución los transcritos para varios efectores de la respuesta celular protectora a estrés genotóxico: topoisomerasa II beta, que relaja la torsión del ADN tras la replicación, transcripción y división celular y se inhibe por mitoxantrona, doxorubicina y etopósido (Hazlehurst, L.A., *et al.* Blood 98:1897, 2001); el producto génico del síndrome de Bloom, implicado en el mantenimiento de la estabilidad e integridad del genoma a través de su cooperación con p53; 8-oxoguanina ADN glicosilasa y uracilo-ADN glicosilasa, implicadas en la reparación de la escisión de bases y en la protección del daño del ADN oxidativo (Rosenquist, TA, *et al.* Proc Natl Acad Sci, EE.UU. 94:7429, 1997); los homólogos de mutS 2 y 6, que están implicados en la reparación de apareamientos erróneos (Sixma, T.K. Curr Opin Struct Biol 11:47, 2001); la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de ADN y el autoantígeno Ku que funcionan en la reparación de rupturas en la doble cadena del ADN provocadas por reacciones de oxidación fisiológicas, recombinación de V(D)J, radiación por ionización y fármacos quimioterápicos (Featherstone, C. y Jackson, S.P. Curr Biol 9:R759, 1999); la proteína de unión a ADN de específica de daño 2; y el homólogo de RAD1, que está implicado en la reparación de la escisión de nucleótidos y la reparación por recombinación.

Se confirmaron además cambios seleccionados a nivel de proteínas. El análisis proteómico del estado de señalización de células MM-1S tratadas con PS-341 que detecta el análisis proteómico confirmó la regulación por disminución de la proteína cinasa dependiente de ADN tras una incubación de 8 horas con PS-341 (figuras 2B-2C). Además, la inmunotransferencia convencional confirmó que la regulación por disminución dependiente del tiempo de las subunidades de Ku (80 y 70 kDa) se desencadenó por PS-341 (figura 2D).

En un ensayo clínico multicéntrico de fase II del tratamiento con PS-341 de pacientes con MM que no responde al tratamiento, con recidiva, se ha demostrado una actividad antitumoral notable, incluyendo algunas respuestas completas. También se ha demostrado una sensibilización significativa a terapias contra el cáncer por los inhibidores de proteasomas sin un aumento de toxicidad, en otros modelos de animales, independiente del estado de p53 funcional.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cantidad eficaz de PS-341, para la preparación de un medicamento para aumentar la sensibilidad de una célula cancerosa derivada de un sujeto que experimentó recidiva tras la monoterapia con PS-341, un agente quimioterápico.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la célula cancerosa es resistente al agente quimioterápico.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, melfalán y combinaciones de los mismos.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula cancerosa es una célula de mieloma múltiple.
- 15 5. Uso de una cantidad eficaz de PS-341 y una cantidad eficaz de un agente quimioterápico, para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas del sujeto se derivan de un sujeto que experimentó recidiva tras la monoterapia con PS-341.
- 20 6. Uso de una cantidad eficaz de un inhibidor de proteasomas y una cantidad eficaz de un agente quimioterápico, para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, en el que las células cancerosas del sujeto se derivan de un sujeto que experimentó recidiva tras la monoterapia con PS-341 y en el que el PS-341 se usa a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/m² de área de superficie corporal/día a aproximadamente 4,0 mg/m² de área de superficie corporal/día.
- 25 7. Uso según la reivindicación 5 ó 6, en el que el cáncer es mieloma múltiple.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el tratamiento del cáncer se debe a la inhibición del crecimiento tumoral.
- 30 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, melfalán o combinaciones de los mismos.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el agente quimioterápico es doxorubicina.
- 35 11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en el que además se usa al menos un agente quimioterápico adicional.
- 40 12. Uso según una cualquiera de la reivindicaciones 5-11, en el que la cantidad eficaz de PS-341 y la cantidad eficaz del agente quimioterápico da como resultado la muerte de células cancerosas o la apoptosis de células cancerosas o la modulación de la respuesta al estrés genotóxico.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en el que el medicamento es para administración intravenosa, intraperitoneal u oral.
- 45 14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el inhibidor de proteasomas se usa antes del uso del agente quimioterápico.
15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el inhibidor de proteasomas se usa simultáneamente con el uso del agente quimioterápico.
- 50 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el inhibidor de proteasomas se usa tras el uso del agente quimioterápico.

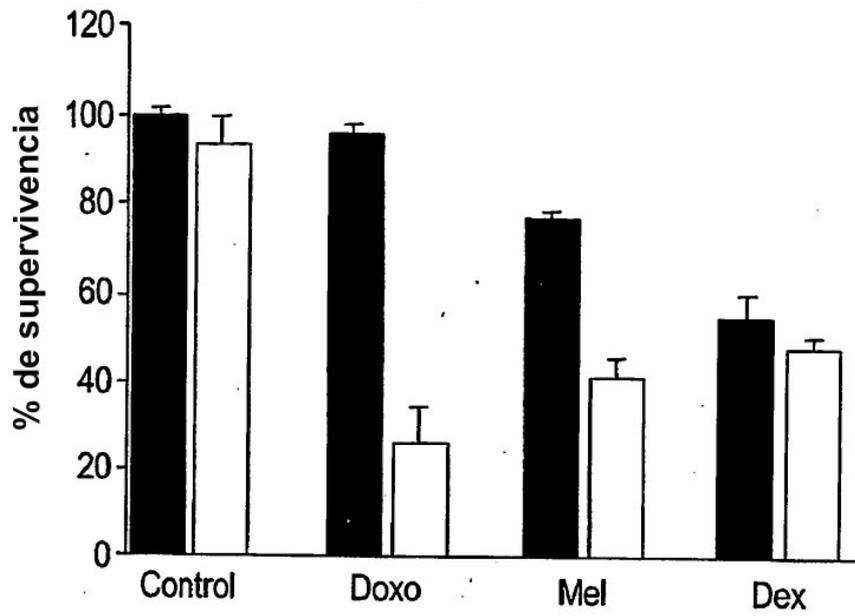


Fig. 1A

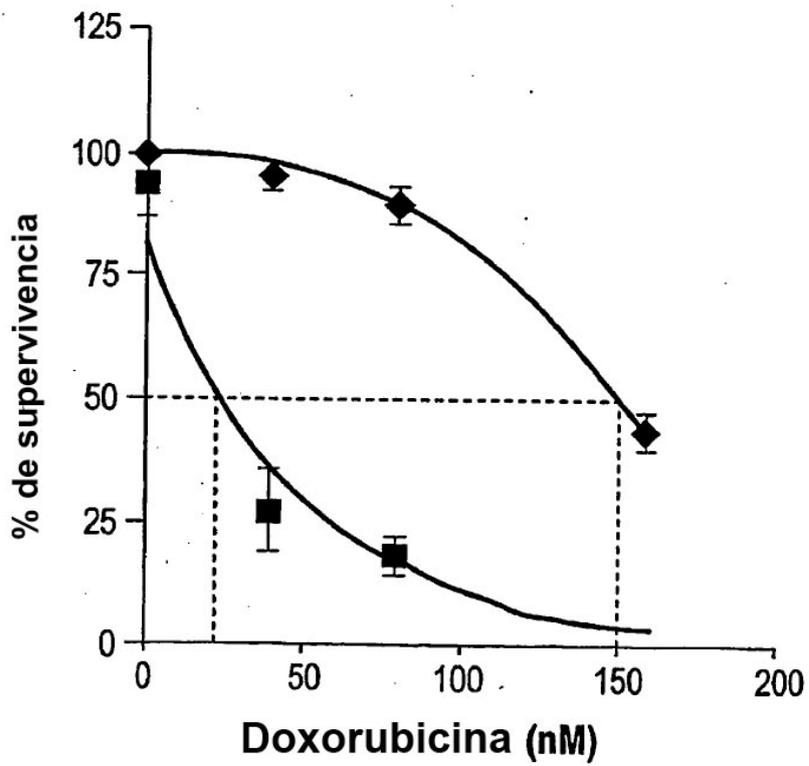


Fig. 1B

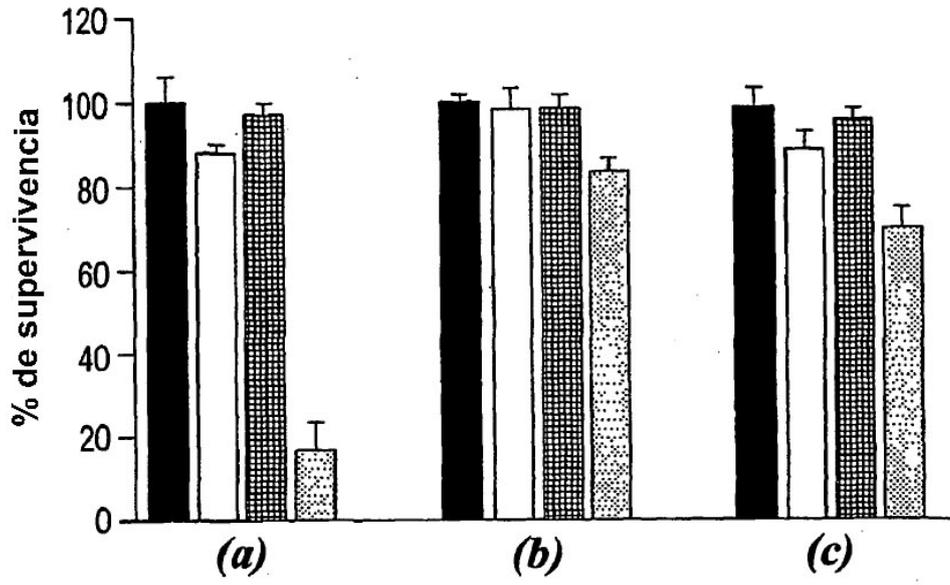


Fig. 1C

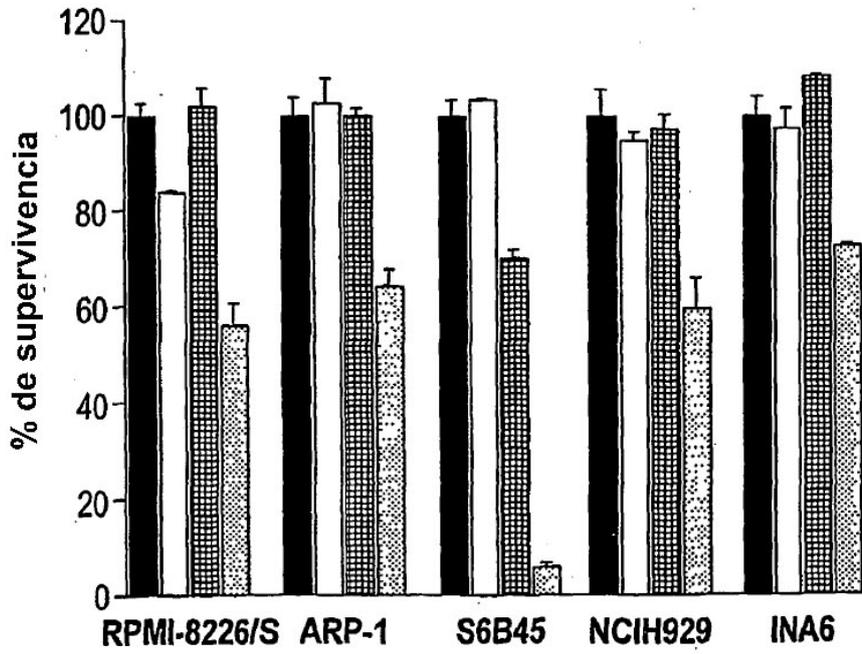


Fig. 1D

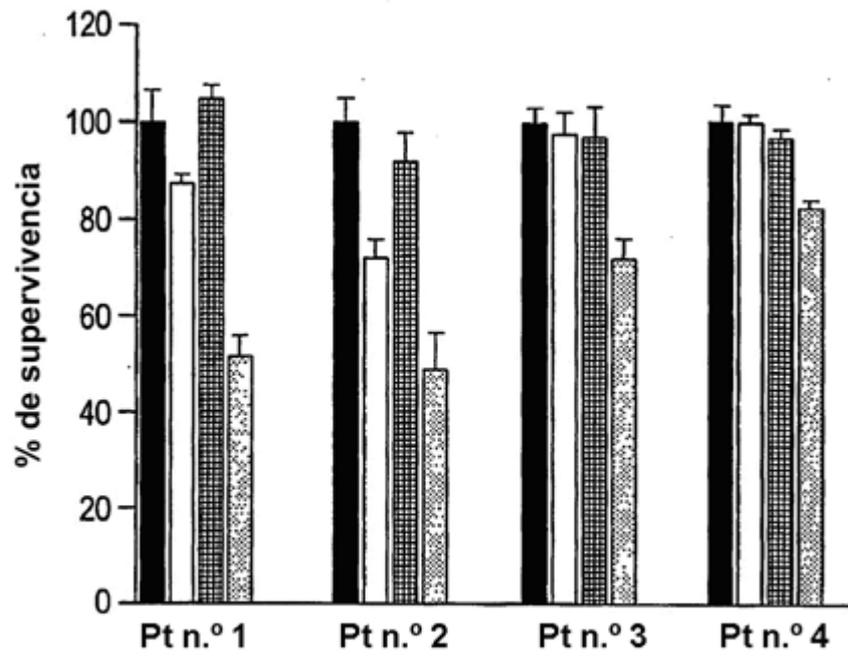


Fig. 1E

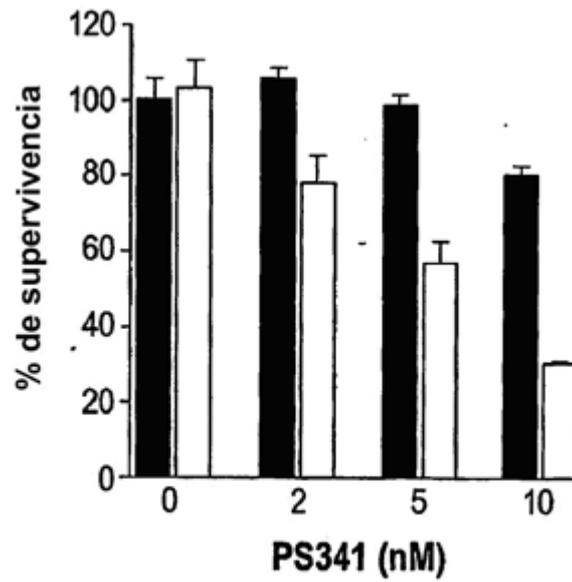


Fig. 1F

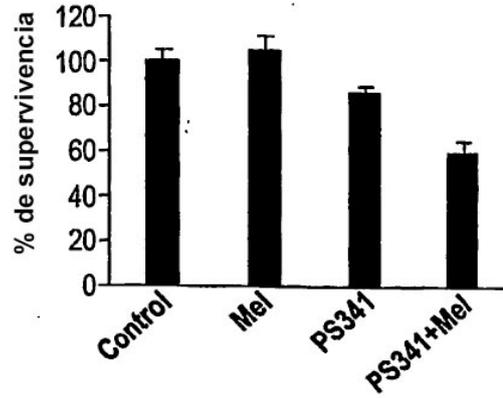


Fig. 1G

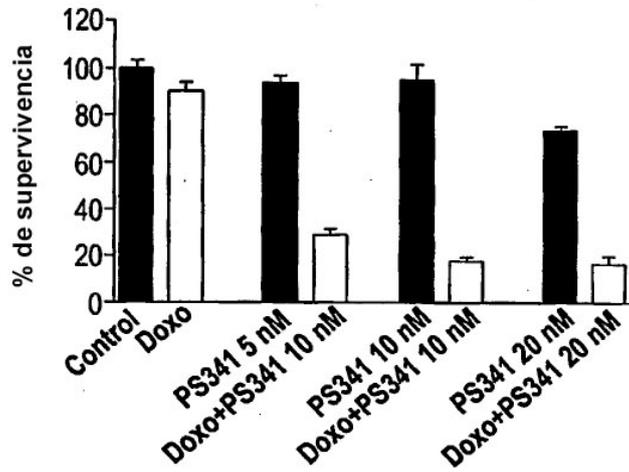


Fig. 1H

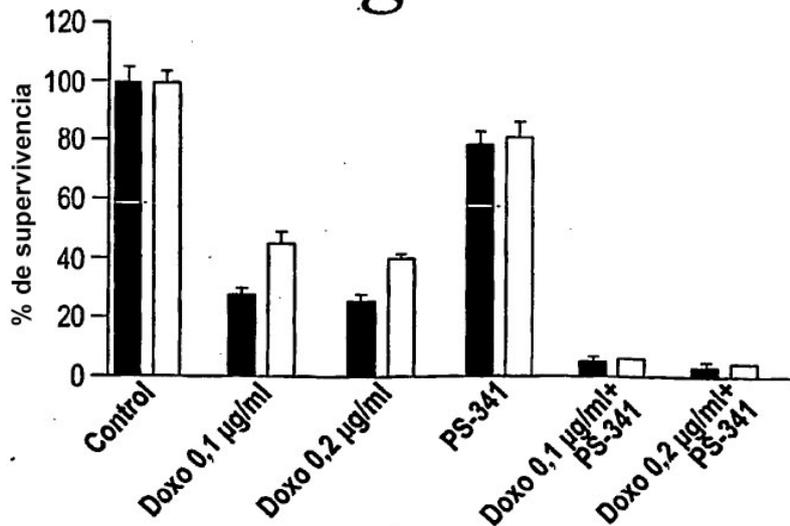


Fig. 1I

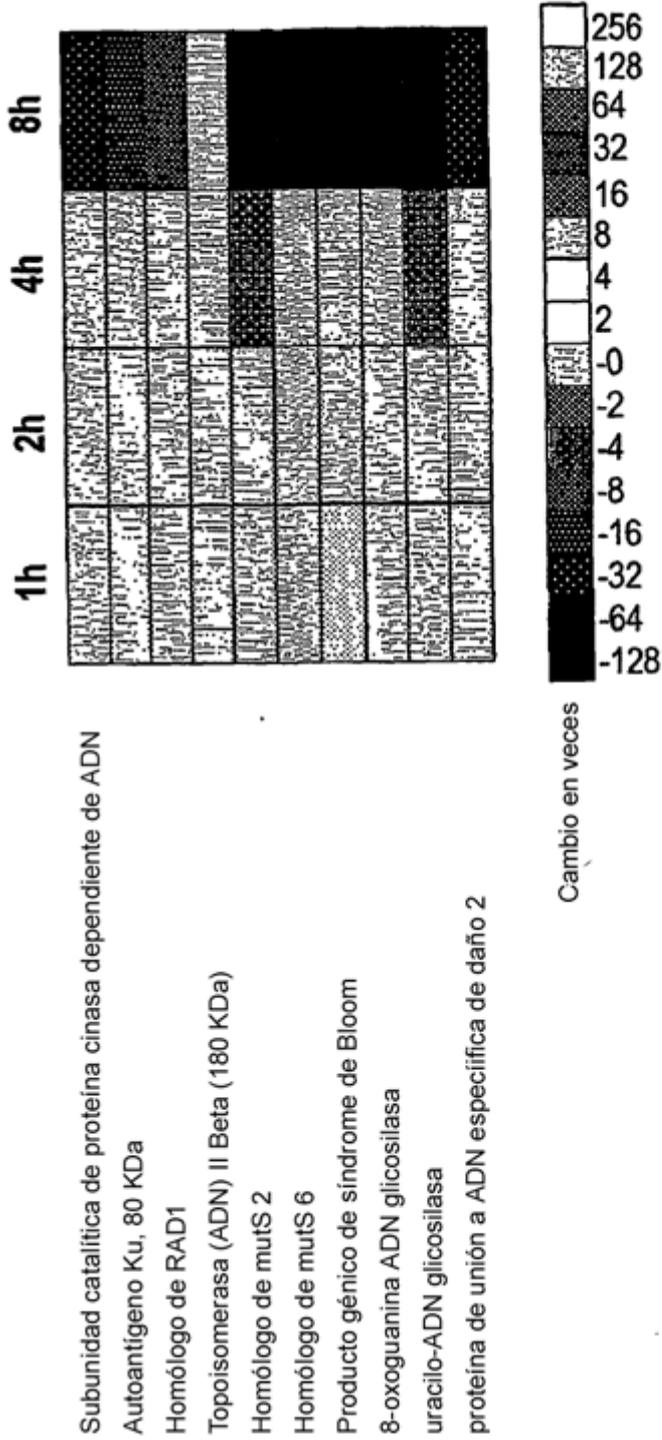


Fig. 2A

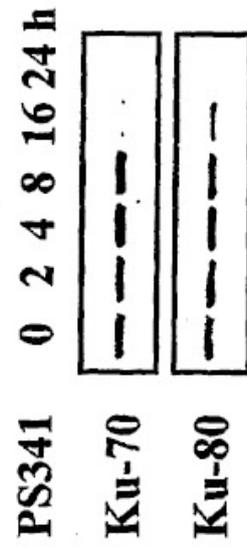
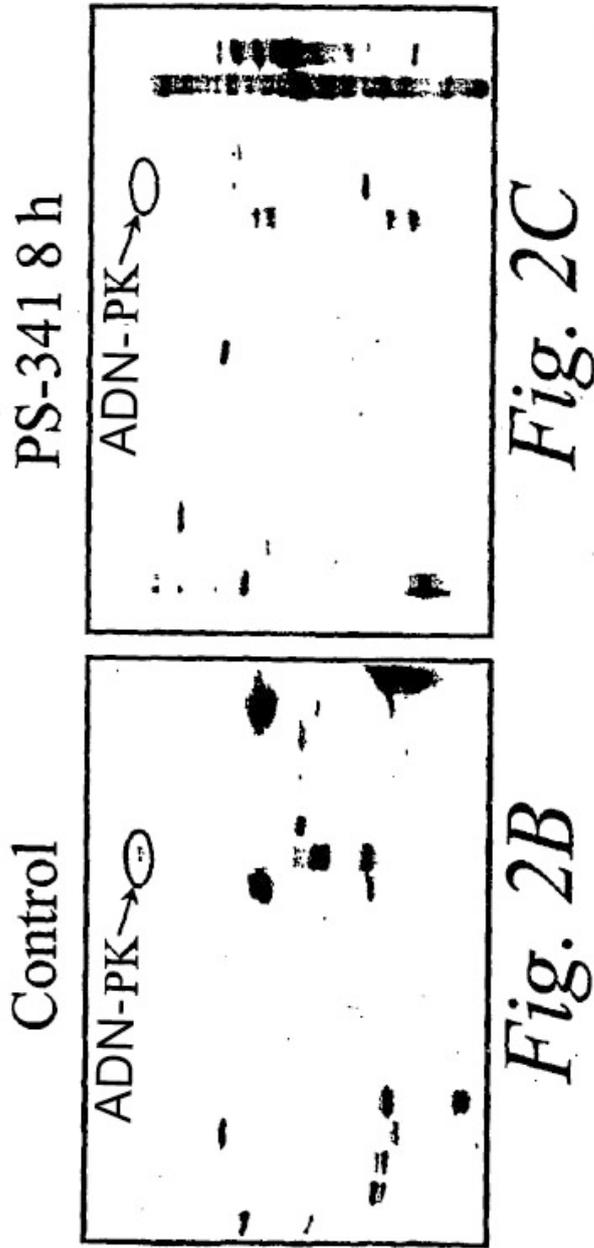


Fig. 2D