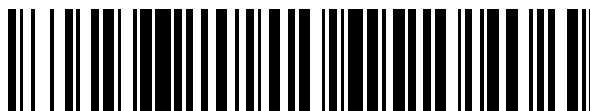


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 560**

51 Int. Cl.:

A61K 31/167 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2009** **E 14171395 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2796134**

54 Título: **Combinación del inhibidor del proteasoma de epoxicetona peptídica carfilzomib con melfalán para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple**

30 Prioridad:

21.10.2008 US 196945 P

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**ONYX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320, US**

72 Inventor/es:

**KIRK, CHRISTOPHER J.;
DEMO, SUSAN D. y
BENNETT, MARK K.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 617 560 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

Combinación del inhibidor del proteasoma de epoxicetona peptídica carfilzomib con melfalán para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple

5

Antecedentes de la invención

En eucariotas, la degradación de proteínas está mediada predominantemente a través de la ruta de ubiquitina en la que las proteínas seleccionadas como diana para destrucción se ligan al polipéptido de 76 aminoácidos ubiquitina. Una vez seleccionadas como diana, las proteínas ubiquitinadas sirven entonces como sustratos para el proteasoma 26S, una proteasa multicatalítica, que escinde proteínas en péptidos cortos a través de la acción de sus tres actividades proteolíticas principales. Aunque tiene una función general en el recambio proteico intracelular, la degradación mediada por el proteasoma también desempeña un papel clave en muchos procesos tales como la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, la apoptosis, la división celular y la activación de NF- κ B.

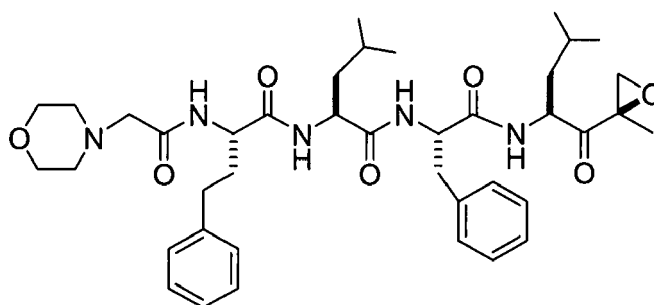
El proteasoma 20S es un complejo de proteasas multicatalíticas de forma cilíndrica de 700 kDa compuesto por 28 subunidades organizadas en cuatro anillos que desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, la apoptosis, la preparación del antígeno, la activación de NF- κ B y la transducción de señales proinflamatorias. En la levadura y otros eucariotas, 7 subunidades α diferentes forman los anillos exteriores y 7 subunidades β diferentes comprenden los anillos interiores. Las subunidades α sirven como sitios de unión para los complejos reguladores 19S (PA700) y 11S (PA28), así como una barrera física para la cámara proteolítica interna formada por los dos anillos de la subunidad β . Por tanto, *in vivo*, se cree que el proteasoma existe como una partícula 26S ("el proteasoma 26S"). Experimentos *in vivo* han demostrado que la inhibición de la forma 20S del proteasoma puede correlacionarse fácilmente con la inhibición del proteasoma 26S. La escisión de prosequencias amino terminales de las subunidades β durante la formación de partículas expone residuos de treonina amino terminal, que sirven como nucleófilos catalíticos. Las subunidades responsables de la actividad catalítica en el proteasoma poseen, por tanto, un residuo nucleofílico amino terminal, y estas subunidades pertenecen a la familia de las nucleófilo hidrolasas N-terminales (Ntn) (en las que el residuo nucleofílico N-terminal es, por ejemplo, Cys, Ser, Thr y otros restos nucleofílicos). Esta familia incluye, por ejemplo, penicilina G acilasa (PGA), penicilina V acilasa (PVA), glutamina PRPP amidotransferasa (GAT) y glicosilasparagmasa bacteriana. Además de las subunidades β expresadas de manera ubicua, los vertebrados superiores también poseen tres subunidades β inducibles por interferón γ (LMP7, LMP2 y MECL1), que reemplazan a sus homólogos normales, X, Y y Z, respectivamente, alterando así las actividades catalíticas del proteasoma. A través del uso de diferentes sustratos peptídicos, se han definido tres actividades proteolíticas principales para el proteasoma 20S de eucariotas: actividad de tipo quimotripsina (CT-L), que escinde después de grandes residuos hidrófobos; actividad de tipo tripsina (T-L), que escinde después de residuos básicos; y la actividad hidrolizante del péptido peptidilglutamilo (PGPH), que escinde después de residuos ácidos. También se han atribuido al proteasoma otras dos actividades adicionales menos caracterizadas: actividad BrAAP, que escinde después de aminoácidos de cadena ramificada; y actividad SNAAP, que escinde después de aminoácidos neutros pequeños. Las principales actividades proteolíticas del proteasoma parecen recibir la contribución de diferentes sitios catalíticos, puesto que inhibidores, mutaciones puntuales en las subunidades β y el intercambio de subunidades β que inducen el interferón- γ alteran estas actividades en diversos grados.

El inhibidor del proteasoma de epoxicetona peptídica de fórmula I mostrado a continuación se conoce *per se*. Por ejemplo, el documento de EE. UU. 2006/128611 describe el uso de dichos inhibidores de epoxicetona para su uso en el tratamiento del cáncer. Deborah Kuhn *et al.*, Blood, vol. 110, n.º 9, 3281-3290, noviembre de 2007, describe la actividad antineoplásica de este compuesto en modelos preclínicos de mieloma múltiple (MM). Douglas Ivancsits *et al.*, Blood, vol. 106, n.º 11, Part 1, noviembre de 2005, pág. 452A divulga que este compuesto puede mantener actividad sobre células que son resistentes al melfalán.

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un tratamiento combinado, concretamente un inhibidor del proteasoma de epoxicetona peptídica que tiene la estructura de:

55



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticos, para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple, en el que uno de uno o más agentes terapéuticos es melfalán. La combinación muestra una eficacia que es mayor que la eficacia de cualquier agente que se administra solo (por ejemplo, efecto antitumoral sinérgico o aditivo). Dicho tratamiento combinado puede conseguirse mediante la dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento.

En ciertos modos de realización, el agente o los agentes terapéuticos se seleccionan de un inhibidor de HDAC, un antibiótico, un taxano, un agente alquilante antiproliferativo/antimitótico, un complejo de coordinación de platino, un esteroide, un inmunomodulador, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de m-TOR e inhibidores de proteína cinasas.

Un modo adicional de realización es el inhibidor de epoxicetona para su uso de acuerdo con el modo de realización anterior, en el que el mieloma múltiple es resistente a fármacos.

Breve descripción de las la figuras

La figura 1 muestra un gráfico del volumen tumoral a lo largo del tiempo para ratones tratados con vehículo, compuesto 1, SAHA, o compuesto 1 en combinación con SAHA una vez que los tumores de células RL habían alcanzado aproximadamente 50 mm³ de tamaño.

La figura 2A muestra el programa de dosificación para el tratamiento combinado con Doxil y el compuesto 1.

La figura 2B muestra el estudio de toxicidad para el tratamiento combinado con Doxil y el compuesto 1, en la que Doxil se administra a 10 o 20 mg/kg y el compuesto 1 se administra a 5 mg/kg.

La figura 3 muestra el tamaño del tumor colorrectal HT29 a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, Doxil (3 mg/kg), compuesto 1 (5 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y Doxil.

La figura 4 muestra el tamaño del tumor de pulmón no microcítico A549a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, Doxil (3 mg/kg), compuesto 1 (5 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y Doxil.

La figura 5A muestra la pauta posológica para el tratamiento combinado con docetaxel y compuesto 1.

La figura 5B muestra el estudio de toxicidad para el tratamiento combinado con docetaxel y compuesto 1, donde docetaxel se administra a 10 mg/kg y el compuesto 1 se administra a 5 mg/kg.

La figura 6 muestra el tamaño del tumor de pulmón no microcítico A549 a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, compuesto 1 (5 mg/kg), docetaxel (5 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y docetaxel.

La figura 7 muestra el tamaño del tumor de pulmón de células no pequeñas A549 a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, compuesto 1 (3 mg/kg), docetaxel (3 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y docetaxel.

La figura 8A muestra el programa de dosificación para el tratamiento combinado con SAHA y compuesto 1.

La figura 8B muestra el estudio de toxicidad para el tratamiento combinado con vorinostat y compuesto 1, en el que SAHA se administra a 50 mg/kg y el compuesto 1 se administra a 3 o 5 mg/kg.

La figura 9 muestra el tamaño del tumor de linfoma RL a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, compuesto 1 (3 mg/kg), SAHA (50 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y SAHA.

La figura 10 muestra el tamaño del tumor de ovario ES2 a lo largo del tiempo para el tratamiento con vehículo, compuesto 1 (5 mg/kg), SAHA (50 mg/kg), y una combinación de compuesto 1 y SAHA.

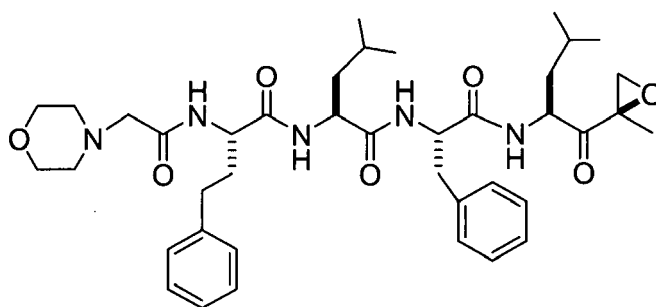
La figura 11 muestra el efecto de una combinación de compuesto 1 y melfalán sobre células MM1.S.

La figura 12A muestra resultados preliminares de un estudio de escalada de dosis de fase Ib de carfilzomib más lenalidomida y dexametasona en dosis bajas en pacientes con mieloma múltiple con recidiva. Dentro de las tres primeras cohortes, 17 pacientes fueron evaluables para respuesta y toxicidad. La dosis máxima tolerada (DMT) todavía no se había alcanzado y no se notificaron acontecimientos adversos graves de grado 3 o 4 relacionados con el fármaco.

La figura 12B muestra resultados preliminares de un estudio de escalada de dosis de fase Ib de carfilzomib más lenalidomida y dexametasona en dosis bajas en pacientes con mieloma múltiple con recidiva. Las respuestas fueron duraderas.

Descripción detallada de la invención

Un primer modo de realización de la presente invención es un inhibidor del proteasoma de epoxicetona peptídica que tiene la estructura de:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticos, para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple, en el que uno de uno o más agentes terapéuticos es melfalán. Un modo adicional de realización es el inhibidor de epoxicetona para su uso de acuerdo con el modo de realización 1, en el que el mieloma múltiple es resistente a fármacos.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la reversión, reducción o detención de síntomas, signos clínicos y patología subyacente de una afección para mejorar o estabilizar el estado de un sujeto.

Tratamiento combinado

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de HDAC (por ejemplo, trichostatina A, depsipéptido, apicidina, A-161906, scriptaid, PXD-101, CHAP, ácido butírico, depudecina, oxamflatina, butirato de fenilo, ácido valproico, SAHA (Vorinostat), MS275 (N-(2-aminofenil)-4-[N-(piridina-3-ilmetoxi-carbonil)aminometil]benzamida), LAQ824/LBH589, CI994 y MGCD0103). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente es SAHA (ácido suberoilánilida-hidroxiácido).

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un antibiótico (por ejemplo, dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina e idarubicina). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico comprende doxorubicina. En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico es Doxil.

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un taxano (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel).

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un agente alquilante antiproliferativo/antimitótico tal como una mostaza nitrogenada (por ejemplo, mecloretamina, ifosfamida, ciclofosfamida y análogos, melfalán y clorambucilo). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico es ciclofosfamida o melfalán.

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un complejo de coordinación de platino (por ejemplo, cisplatino y carboplatino). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico es carboplatino.

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un esteroide (por ejemplo, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona y prednisolona). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico es dexametasona.

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un inmunomodulador (por ejemplo, talidomida, CC-4047 (Actimid) y lenalidomida (Revlimid)). En algunos de dichos modos de realización, el otro agente terapéutico es lenalidomida.

En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecán, topotecán, camptotecina, lamellarina D y etopósido).

5 En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de m-TOR (por ejemplo, CC1-779, AP23573 y RAD-001).

10 En ciertos modos de realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de proteína cinasa (por ejemplo, sorafenib, imatinib, dasatinib, sunitinib, pazopanib y nilotinib). En algunos de dichos modos de realización, el inhibidor de proteína cinasa es sorafenib.

15 La administración de la epoxicetona peptídica puede preceder o seguir al otro agente terapéutico en intervalos que varían entre minutos y días. En algunos de dichos modos de realización, puede administrarse la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico en el plazo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, o incluso aproximadamente 48 horas o más entre uno y otro. Preferentemente, la administración de la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico será en el plazo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 30 minutos o incluso aproximadamente 60 minutos entre uno y otro.

20 En ciertos modos de realización, la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico pueden administrarse según diferentes pautas posológicas (por ejemplo, la epoxicetona peptídica por ejemplo puede administrarse una vez al día, mientras que el otro agente terapéutico puede administrarse solo una vez cada tres semanas), de tal manera que en algunos casos la administración de la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico estará en el plazo de aproximadamente 60 minutos entre uno y otro, mientras que en otros casos, la administración de la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico estará en el plazo de días o incluso semanas entre uno y otro.

25 Como se usa en el presente documento, el término "régimen" es una pauta predeterminada de uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un cáncer. En consecuencia, cuando un agente terapéutico se administra "solo," el régimen no incluye el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento del cáncer.

30 En ciertos modos de realización, las combinaciones como se describen en el presente documento pueden ser de naturaleza sinérgica, lo que significa que el efecto terapéutico de la combinación de la epoxicetona peptídica y el otro o los otros agentes terapéuticos es mayor que la suma de los efectos individuales.

35 En ciertos modos de realización, las combinaciones como se describen en el presente documento pueden ser de naturaleza aditiva, lo que significa que el efecto terapéutico de la combinación de la epoxicetona peptídica y el otro o los otros agentes terapéuticos es mayor que el efecto de cada agente individualmente (es decir, el efecto terapéutico es la suma de los efectos individuales).

40 Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse en diversas formas, dependiendo de la edad, el estado, y peso corporal del paciente, como es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando los compuestos deben administrarse por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes; o para la administración parenteral, pueden formularse como inyecciones (intravenosas, intramusculares o subcutáneas), o preparaciones para infusión por gotero. Estas formulaciones pueden prepararse por medios convencionales y, si se desea, el principio activo puede mezclarse con cualquier aditivo o excipiente convencional, tal como un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un correctivo, un agente solubilizante, un adyuvante de suspensión, un agente emulsionante, un agente de recubrimiento, una ciclodextrina y/o un tampón. La dosificación variará dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse, la vía de administración y la forma del fármaco. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un vehículo para producir una forma de dosificación individual será en general la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

45 En un modo de realización, la presente invención es una composición farmacéutica que incluye un inhibidor del proteasoma prácticamente insoluble, una ciclodextrina y opcionalmente un tampón. Dichas composiciones farmacéuticas típicamente incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz del inhibidor del proteasoma, por ejemplo, que mejora los efectos del cáncer, cuando se administra a un paciente.

50 En ciertos modos de realización, la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico pueden estar en la misma forma (por ejemplo, ambos pueden administrarse como comprimidos o ambos pueden administrarse por vía intravenosa) mientras que en ciertos modos alternativos de realización, la epoxicetona peptídica y el otro agente terapéutico pueden estar en diferente formas (por ejemplo uno puede administrarse como un comprimido mientras que el otro se administra por vía intravenosa).

55 El momento exacto de la administración y/o la cantidad exacta de la composición que producirán los resultados más

eficaces en cuanto a la eficacia de tratamiento en un paciente dado dependerán de la actividad, la farmacocinética, y la biodisponibilidad de un compuesto particular, el estado fisiológico del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada, y tipo de medicación), la vía de administración, etc. Sin embargo, las directrices anteriores pueden usarse como base para ajustar el tratamiento, por ejemplo, determinando el momento y/o la cantidad de administración óptimos, que solo requerirá experimentación de rutina que consista en el seguimiento del sujeto y el ajuste de la dosificación y/o el momento adecuado.

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

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz, almidón de patata y β -ciclodextrina sustituida o no sustituida; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa 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 para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, 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, en ciertos modos de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención no son pirógenas, es decir, no inducen elevaciones de temperatura significativas cuando se administran a un paciente.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas de los inhibidores. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los inhibidores, o haciendo reaccionar por separado uno o más inhibidores 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, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, laurilsulfonato, y sales de aminoácidos, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) “Pharmaceutical Sales”, *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19.)

En otros casos, los inhibidores útiles en los procedimientos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de uno o más inhibidores. Asimismo, estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los inhibidores, o haciendo reaccionar por separado los inhibidores purificados en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal 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.*, *supra*).

En las composiciones también pueden estar presentes 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 adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (que usan 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 una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (que usan una

matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de uno o más inhibidores como principio activo. Una composición también puede administrarse como bolo, electuario o pasta.

5 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, ciclodextrinas, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o 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 la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoesterato 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 tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura que usan excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

20 Puede fabricarse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos fabricados por compresión usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla de uno o más inhibidores en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

30 Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos usando, 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 de retención de bacterias, o mediante la incorporación de 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 liberan solo el principio o principios activos, o preferentemente, en una determinada porción del tubo digestivo, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de intercalado que pueden usarse incluyen ceras y sustancias poliméricas. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si resulta apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

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

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

55 Las suspensiones, además de uno o más inhibidores activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitano de polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto, y mezclas de los mismos.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más inhibidores en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse para dar disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que vuelven la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

65 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones

farmacéuticas de la invención 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.

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

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

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices de microcápsulas de uno más inhibidores en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción del fármaco con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones de depósito inyectables atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea e intrasternal, e infusión.

Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistemáticamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usan en el presente documento, significan la administración de un ligando, fármaco u otro material distinto de directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y por tanto, se somete a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La administración de las composiciones terapéuticas de la presente invención a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de agentes quimioterápicos, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hay. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse diversos tratamientos convencionales o tratamientos antineoplásicos complementarios, así como una intervención quirúrgica, en combinación con el agente de arsénico descrito.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, el inhibidor, que puede usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

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 sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar mejor los modos preferentes de realización de la invención.

Usos de los compuestos

La degradación ordenada de proteínas es crucial para el mantenimiento de funciones celulares normales y el proteasoma es parte integrante del proceso de degradación de proteínas. El proteasoma controla los niveles de proteínas que son importantes para la progresión del ciclo celular y la apoptosis en células normales y cancerosas; por ejemplo, ciclinas, caspasas, BCL2 y nF- κ B (Kumatori *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:7071-7075; Almond *et al*, Leukemia (2002) 16: 433-443). Por tanto, no es sorprendente que la inhibición de la actividad del proteasoma pueda traducirse en tratamientos para tratar diversos procesos patológicos, tales como enfermedades malignas, no malignas y autoinmunitarias, dependiendo de las células implicadas.

Los agentes quimioterápicos son fármacos que se usan en el tratamiento de enfermedades en las que está

justificada la destrucción de células anormales, tales como enfermedades autoinmunitarias, como esclerosis múltiple y artritis reumatoide, y cáncer. Aunque puede diferir el mecanismo de cada categoría de agente quimioterápico, funcionan generalmente alterando la capacidad de una célula para proliferar.

5 De acuerdo con la invención, el inhibidor de epoxicetona peptídica o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más agentes terapéuticos en los que uno de uno o más agentes terapéuticos es melfalán, puede usarse en el tratamiento del mieloma múltiple.

10 Esta invención también proporciona un procedimiento para el tratamiento de tumores resistentes a fármacos. En ciertos modos de realización, el tumor resistente a fármacos es mieloma múltiple.

15 Con el término "resistente a fármacos" se entiende un estado que demuestra resistencia intrínseca o resistencia adquirida. Con "resistencia intrínseca" se entiende el perfil de expresión característico en células cancerosas de genes clave en rutas relevantes, incluyendo pero no limitándose a apoptosis, progresión celular y reparación de ADN, lo que contribuye a la capacidad de crecimiento más rápido de células cancerosas en comparación con sus homólogos normales. Con "resistencia adquirida" se entiende un fenómeno multifactorial que se produce en la formación y progresión de tumores que puede influir en la sensibilidad de las células cancerosas a un fármaco. La resistencia adquirida puede deberse a varios mecanismos tales como, pero sin limitarse a, alteraciones de las dianas de fármacos, disminución de la acumulación de fármacos, alteración de la distribución intracelular de fármacos, reducción de la interacción fármaco-diana, aumento de la respuesta de detoxificación, desregulación del ciclo celular, aumento de la reparación del ADN dañado, y reducción de la respuesta apoptótica. Varios de dichos mecanismos pueden producirse simultáneamente y/o pueden interactuar entre sí. Su activación y/o inactivación puede deberse a acontecimientos genéticos o epigenéticos, o a la presencia de proteínas oncovirales. Puede producirse resistencia adquirida a fármacos individuales pero también puede producirse más ampliamente a muchos fármacos diferentes con diferentes estructuras químicas y diferentes mecanismos de acción. Esta forma de resistencia se denomina resistencia a múltiples fármacos.

Ejemplificación

30 *Ejemplo 1* (no de acuerdo con la invención)

Se expusieron ratones inmunocomprometidos (BNX, Charles River Laboratories) a administración subcutánea de células de linfoma humano RL (1×10^7 /ratón) en el costado derecho en un volumen total de 0,1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Cuando los tumores tenían un tamaño de aproximadamente 50 mm^3 (como se indica con la flecha en la figura 1), se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento (9 ratones/grupo). Se administró el compuesto 1 por vía intravenosa (i.v.) en una disolución de sulfobutil éter-beta-ciclodextrina al 10 % (p/v) en 10 mM de tampón citrato acuoso, pH 3,5. Se facilitó la administración los días 1 y 2 de cada semana. Se formuló SAHA en DMSO al 100 % y se administró por vía intraperitoneal (i.p.) en los días 1-5 de cada semana. *** = $p < 0,001$ (Compuesto 1 + SAHA frente a vehículo) mediante ANOVA de dos factores y comparaciones múltiples *a posteriori* de Bonferroni.

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención)

45 Líneas celulares y reactivos: Se adquirieron líneas celulares tumorales de linfoma humano (RL), de pulmón no microcítico (A549) y de colon (HT-29) de ATCC (Manassas, VA). Se adquirió el inhibidor de HDAC, vorinostat, de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Se adquirió docetaxel de Sigma Chemicals (Ann Arbor, MI). Se adquirió la receta de Doxil de una farmacia local.

50 Estudios de toxicidad: Se trataron ratones BNX hembra de 4-6 semanas de edad con agentes quimioterápicos de múltiples clases en monoterapia o en combinación con carfilzomib. Se realizaron estudios de toxicidad de dos semanas con dosis y pautas posológicas como se menciona en la leyenda de la figura. Se midió la toxicidad como pérdida de peso corporal tres veces a la semana.

55 Estudios de xenoinjertos: Se establecieron los tumores mediante inyección subcutánea (s.c.) de líneas celulares (número de pases < 9 y viabilidad > 95 % en el momento de la implantación) en el costado derecho de ratones BNX ($n = 8/9$ por grupo). Se inyectaron suspensiones celulares de RL (0,1 ml) que contenían 1×10^7 células y 5×10^6 células (0,1 ml), en el caso de células HT-29, ES2 y A549. Se aleatorizaron ratones a grupos de tratamiento y se inició la dosificación cuando el tamaño de los tumores era de aproximadamente 100 mm^3 . En todos los grupos de tratamiento, se midieron los tumores tres veces a la semana registrando los diámetros perpendiculares más largos y se calcularon los volúmenes tumorales usando la ecuación $V (\text{mm}^3) = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$.

60 Análisis estadístico: Para las comparaciones de los grupos de tratamiento, se realizó un ANOVA de dos factores seguido por un análisis múltiple *a posteriori* de Bonferroni usando el software GraphPad Prism (versión 4.01). La significación estadística se logró cuando $p < 0,05$.

El compuesto 1 se toleró bien en combinación con Doxil con un programa de dosis relevante clínicamente a MTD de

10 mg/kg de Doxil → c7d (i.v.) y DMT de 5 mg/kg de carfilzomib → c.d × 2 (i.v.). Como se muestra en la figura 2A, la pauta posológica fue Doxil día 1 (i.v.), después de una hora del compuesto 1 los días 1, 2 (i.v.). Como se muestra en la figura 2B, se realizó un estudio de toxicidad de dos semanas en ratones BNx y se evaluó la pérdida de peso corporal ($n = 5$), donde la dosis máxima tolerada (DMT) de Doxil como agente único en ratones BNx fue de 20 mg/kg mientras que la DMT de Doxil en combinación con el compuesto 1 (5 mg/kg) en la pauta posológica sometida a prueba fue de 10 mg/kg.

% de pérdida de peso corporal			
Doxil (i.v.) (2 semanas)			
Combinación	Dosis	Pauta	Pérdida de peso (%)
Ninguna	10 mg/kg	c7d	10
Compuesto 1 (5 mg/kg)	10 mg/kg	c7d	16
Ninguna	20 mg/kg	c7d	15

Como se muestra en la figura 3, el compuesto 1 a la DMT (5 mg/kg) y por debajo de la DMT de Doxil (3 mg/kg) ($n = 10$ /grupo) en el modelo de xenoinjerto colorrectal de HT29 establecido muestra una actividad antitumoral aumentada, (tratamiento combinado $***p < 0,001$ frente al control o carfilzomib solo; $**p < 0,01$ frente a Doxil solo) (la flecha indica el inicio del período de dosificación). Se observaron observaciones similares en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549 establecido. Como se muestra en la figura 4 (tratamiento combinado $***p < 0,001$ frente al control o Doxil solo; sin significación frente a carfilzomib solo) (la flecha indica el inicio del período de dosificación).

El compuesto 1 en combinación con docetaxel se toleró bien con una pauta posológica relevante clínicamente a la DMT de 10 mg/kg de docetaxel → c7d (i.v.) y la DMT de 5 mg/kg de compuesto 1 → cd × 2 (i.v.). Como se muestra en la figura 5A la pauta posológica fue docetaxel día 1 (i.v.), después de una hora del compuesto 1 los días 1, 2 (i.v.). Se realizó un estudio de toxicidad de dos semanas en ratones BNx y se evaluó la pérdida de peso corporal ($n = 5$), donde la DMT de docetaxel en combinación con carfilzomib en esta pauta posológica fue de 10 mg/kg.

% de pérdida de peso corporal			
Docetaxel (i.v.) (2 semanas)			
Combinación	Dosis	Pauta posológica	Pérdida de peso (%)
Ninguna	10 mg/kg	c7d	Ninguna
Compuesto 1	10 mg/kg	c7d	16

Como se muestra en la figura 6, una combinación de compuesto 1 a la DMT (5 mg/kg) y por debajo de la DMT de docetaxel (5 mg/kg) ($n = 10$ /grupo) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549 establecido, (tratamiento combinado $***p < 0,001$ frente al control; $**p < 0,05$ frente al carfilzomib solo, NS frente a docetaxel) (la flecha indica el inicio del período de dosificación). Se muestra en la figura 7 una combinación de compuesto 1 por debajo de la DMT (3 mg/kg) y por debajo de la DMT de docetaxel (5 mg/kg) ($n = 10$ /grupo) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico A549 establecido, (tratamiento combinado $***p < 0,001$ frente al control; $**p < 0,01$ frente a carfilzomib y docetaxel) (la flecha indica el inicio del período de dosificación).

Una combinación del compuesto 1 y vorinostat se toleró bien con una pauta posológica relevante clínicamente a 50 mg/kg → c5d, vorinostat (i.p.) y la DMT de 5 mg/kg de compuesto 1 → cd × 22(i.v.). Como se muestra en la figura 8A, no se determinó la DMT de vorinostat. Se administró vorinostat los días 1-5 (i.p.), después de una hora de compuesto 1 los días 1, 2 (i.v.). La toxicidad del tratamiento con vorinostat y el compuesto 1 en ratones BNx, como se mide por la pérdida de peso corporal (BWL), fue similar entre los grupos de tratamiento, lo que sugiere que se toleró bien la combinación en animales de experimentación (figura 8B).

Se muestra en la figura 9 el efecto de la combinación de compuesto 1 (3 mg/kg) y vorinostat (50 mg/kg) ($n = 8$ /grupo) en tumores RL establecidos (la flecha indica el inicio del período de dosificación). Se muestra en la figura 10 el efecto de la combinación de compuesto 1 (3 mg/kg) y vorinostat (50 mg/kg) ($n = 8$ /grupo) en tumores ES2 establecidos. $**p < 0,01$; y $***p < 0,001$ frente a monoterapia y vehículo (la flecha indica el inicio del período de dosificación).

El tratamiento con compuesto 1 se toleró bien en combinación con un inhibidor de histona desacetilasa (vorinostat), un agente de alteración de microtúbulos (docetaxel) y una antraciclina (Doxil) en las pautas posológicas relevantes clínicamente para cada agente individual. La combinación de compuesto 1 y vorinostat dio como resultado una reducción significativa del crecimiento tumoral del linfoma (RL) en comparación con controles con vehículo o tratamiento con un agente único ($p < 0,001$ frente al control; $p < 0,01$ frente a compuesto 1 o vorinostat solo). La combinación de compuesto 1 y docetaxel dio como resultado una reducción significativa del crecimiento tumoral de A549 en comparación con controles con vehículo o tratamiento con cualquier agente único ($p < 0,001$ frente al control; $p < 0,01$ frente a carfilzomib o docetaxel solo). Se advirtieron observaciones similares en el modelo de xenoinjerto de HT-29 donde una combinación de compuesto 1 y Doxil redujo significativamente la carga tumoral ($p < 0,001$ frente al control o carfilzomib solo; $p < 0,01$ frente a Doxil solo). El compuesto 1 y Doxil a dosis por debajo

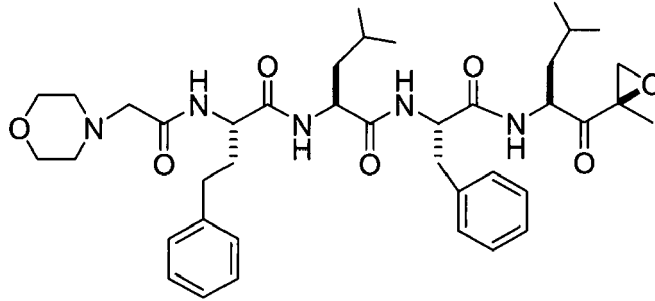
de la DMT muestra un efecto antitumoral sinérgico en el modelo de tumor sólido. De forma similar, el compuesto 1 en combinación con docetaxel a dosis por debajo de la DMT indujo un efecto antitumoral sinérgico en el modelo de cáncer de pulmón humano. El compuesto 1 en combinación con vorinostat indujo un efecto antitumoral sinérgico en el modelo linfoma. El compuesto 1 en combinación con vorinostat indicó una propiedad antitumoral eficaz en el modelo de cáncer de ovario.

Ejemplo 3

Se sometió a prueba el compuesto 1 a 6,58 nM en combinación con melfalán a cuatro dosis diferentes: 11,1, 7,4, 4,9 y 3,3 μ M. Se sembraron en placa células MM1.S (mieloma múltiple, sensible a dexametasona) a 200 000 células/ml en 45 μ l y luego se trataron previamente con melfalán durante 24 horas. A continuación se añadió el compuesto 1 y se incubaron las células durante 24 horas adicionales a 6,58 nM. A continuación, se añadió una proporción 1:1 de disolución CellTiter-Glo a las muestras de células y se leyó la viabilidad. Se calcularon los valores del índice de combinación usando el programa Calcsyn donde valores $<0,9$ = sinergia, $0,9-1,0$ = aditivo y $>1,1$ = antagonista. Como se muestra en la figura 11, los resultados indican que el compuesto 1 y melfalán muestran efectos sinérgicos y aditivos a estas concentraciones.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor del proteasoma de epoxiketona peptídica que tiene la estructura de:

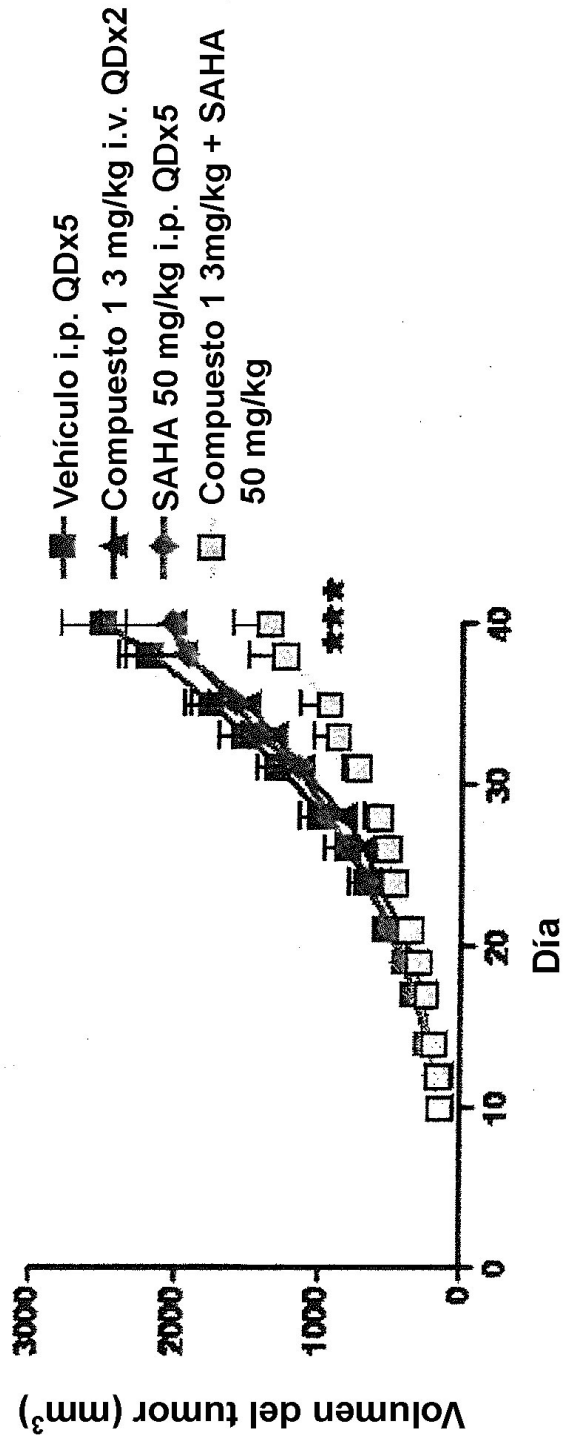


5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticos, para su uso en el tratamiento de mieloma múltiple, en el que uno de uno o más agentes terapéuticos es melfalán.

- 10 2. El inhibidor de epoxiketona peptídica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mieloma múltiple es resistente a fármacos.

Figura 1



p < 0,001, frente control n=9

Figura 2

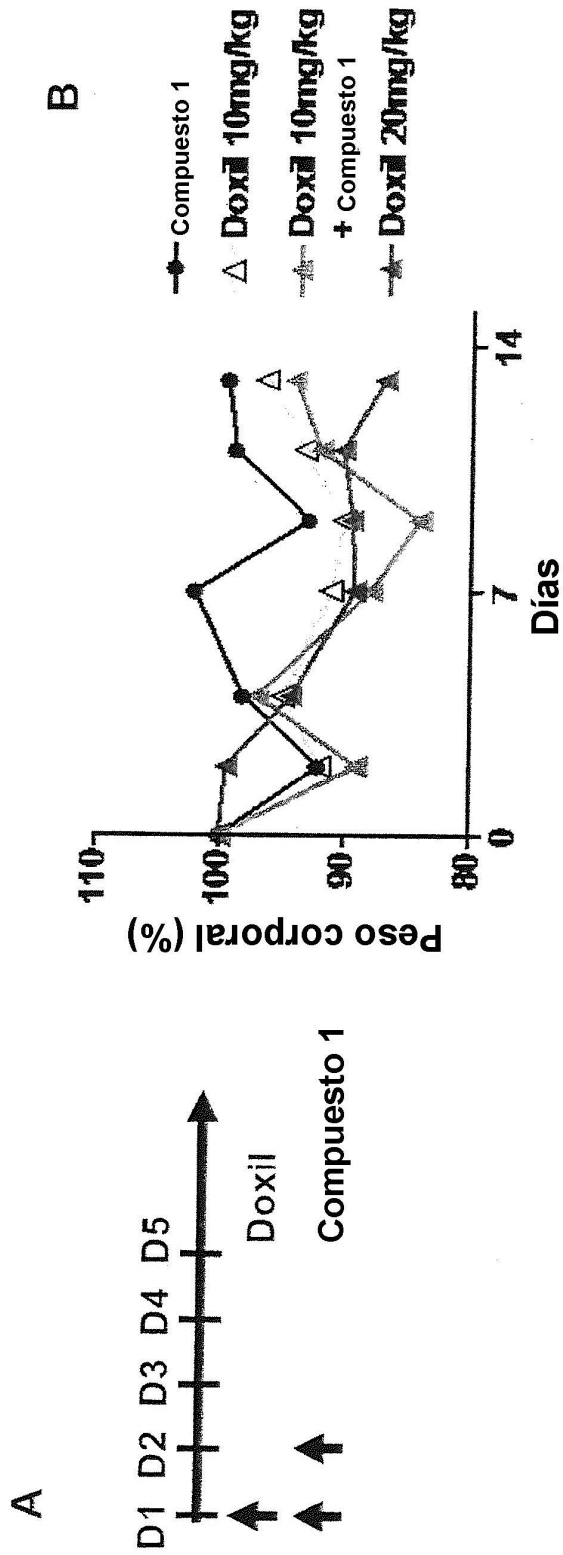


Figura 3

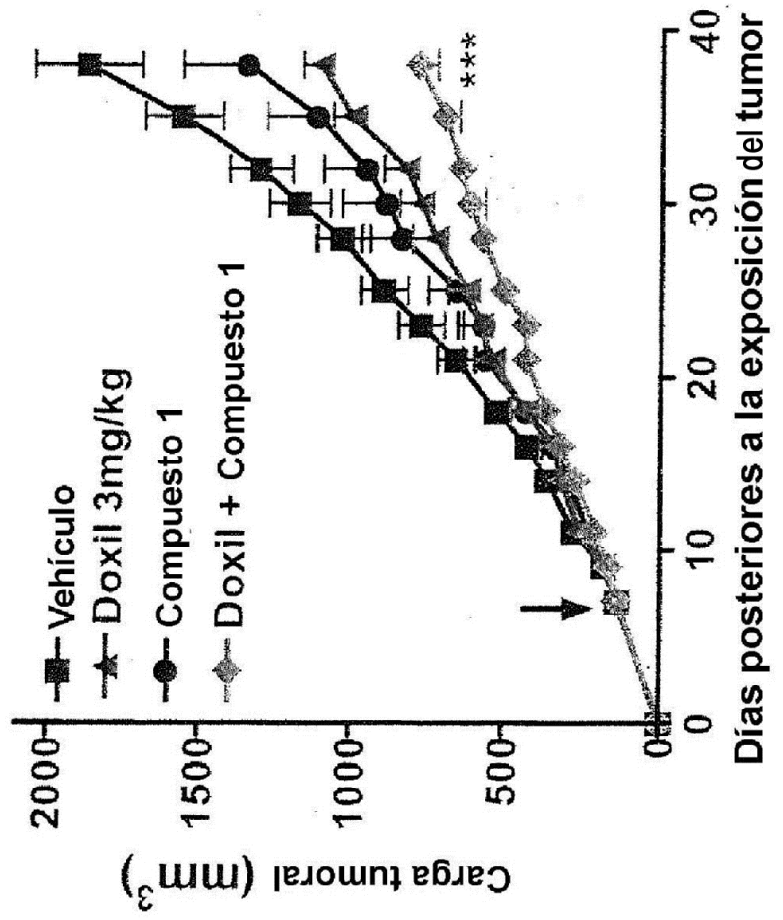


Figura 4

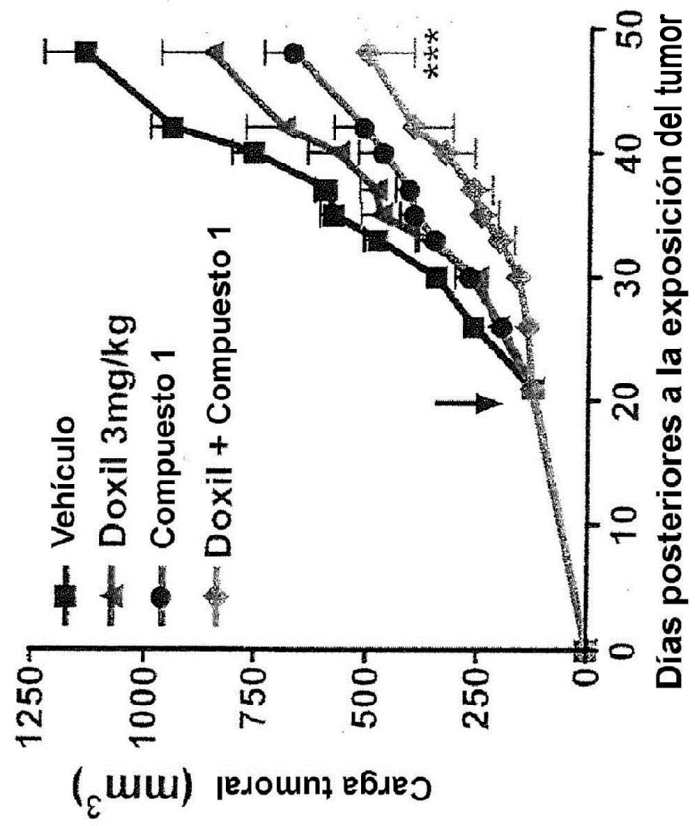


Figura 5

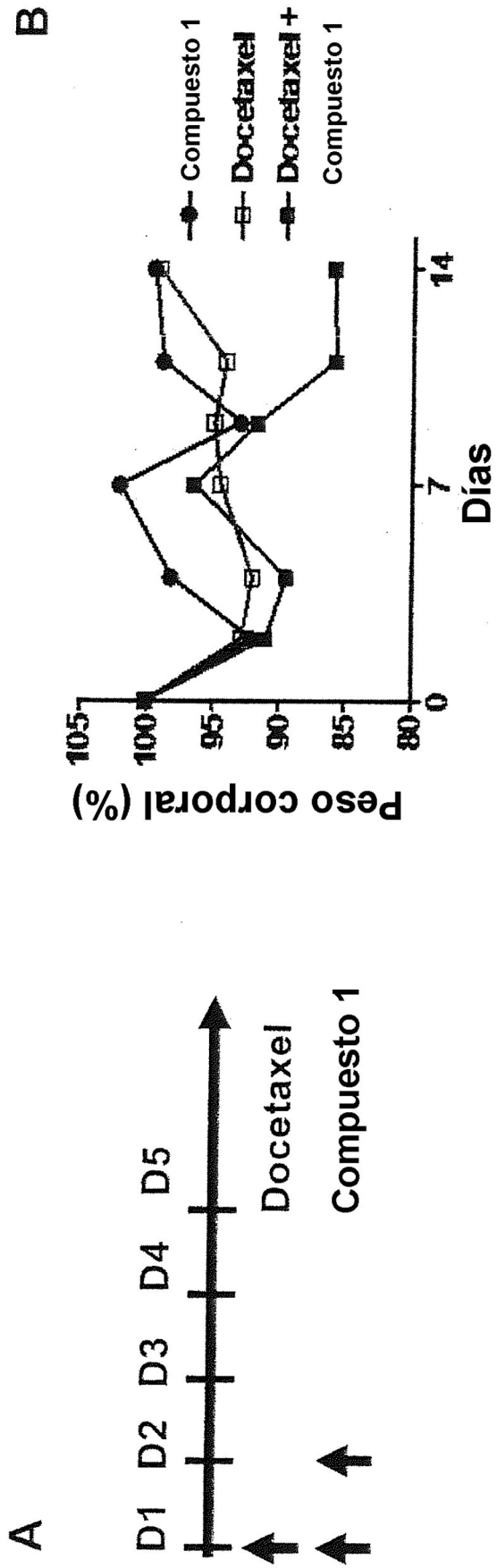


Figura 6

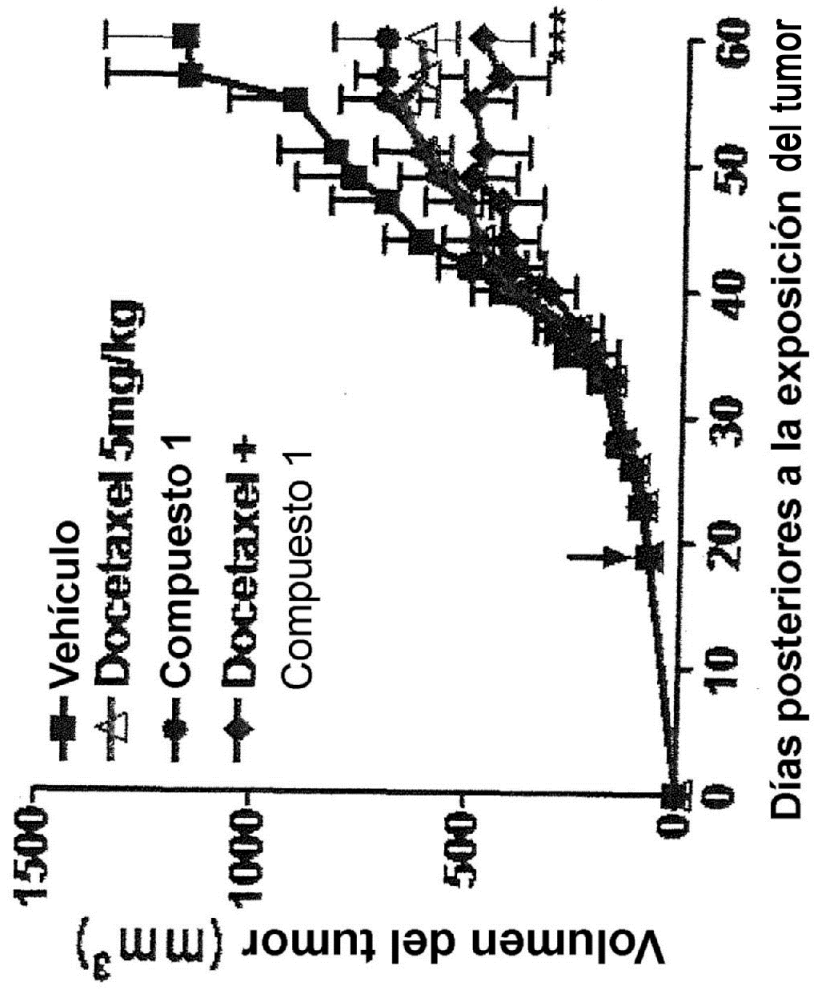


Figura 7

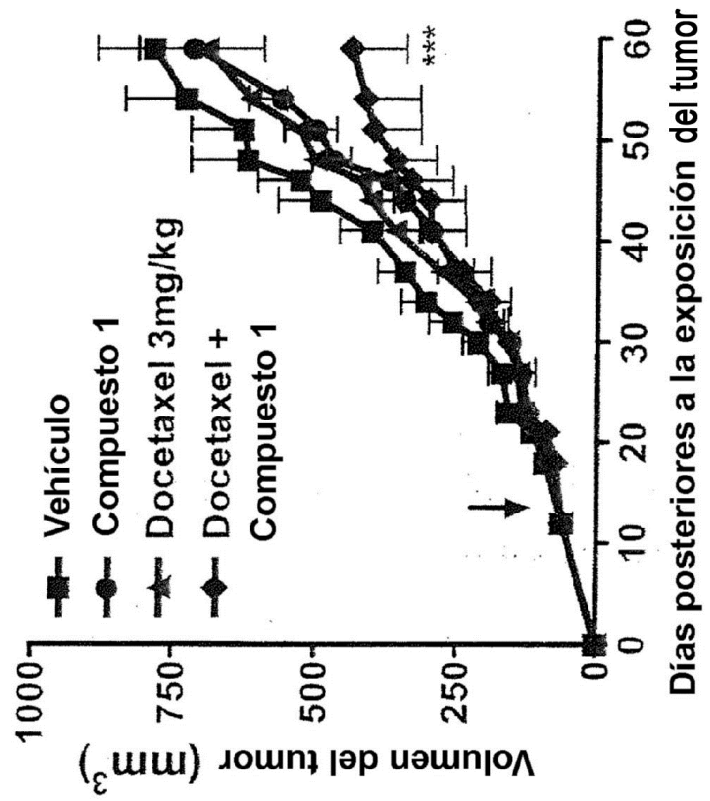


Figura 8

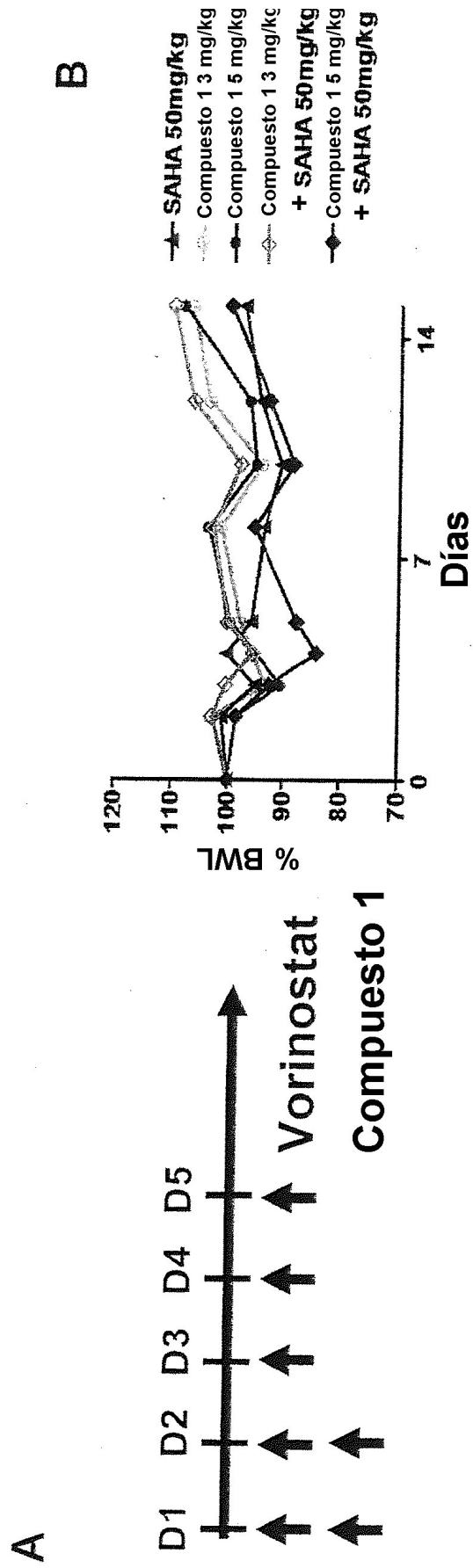


Figura 9

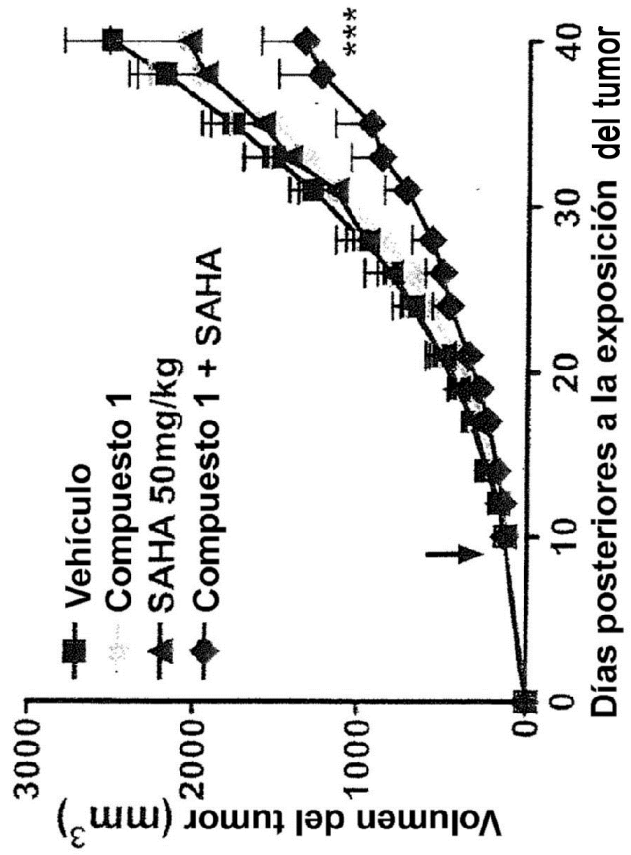


Figura 10

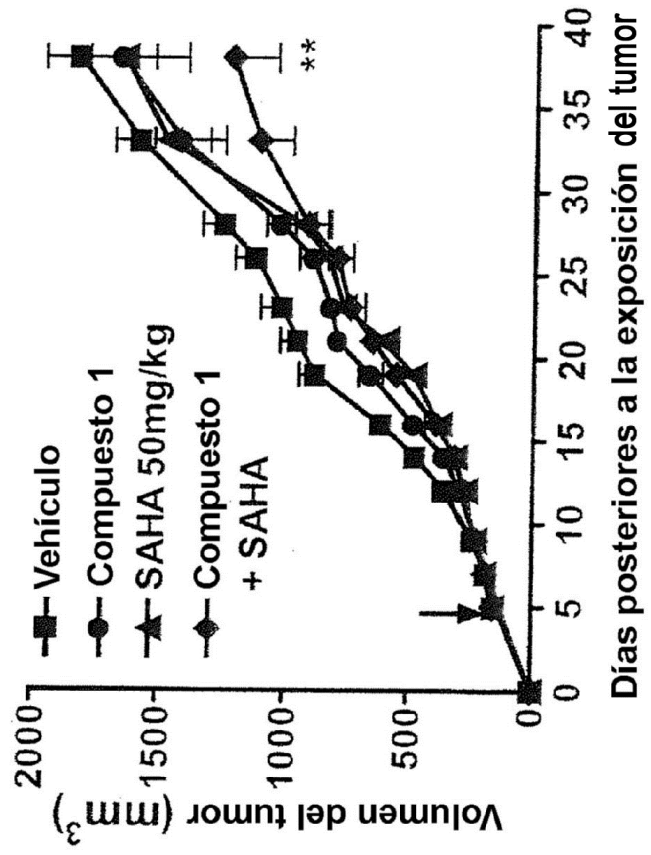


Figura 11

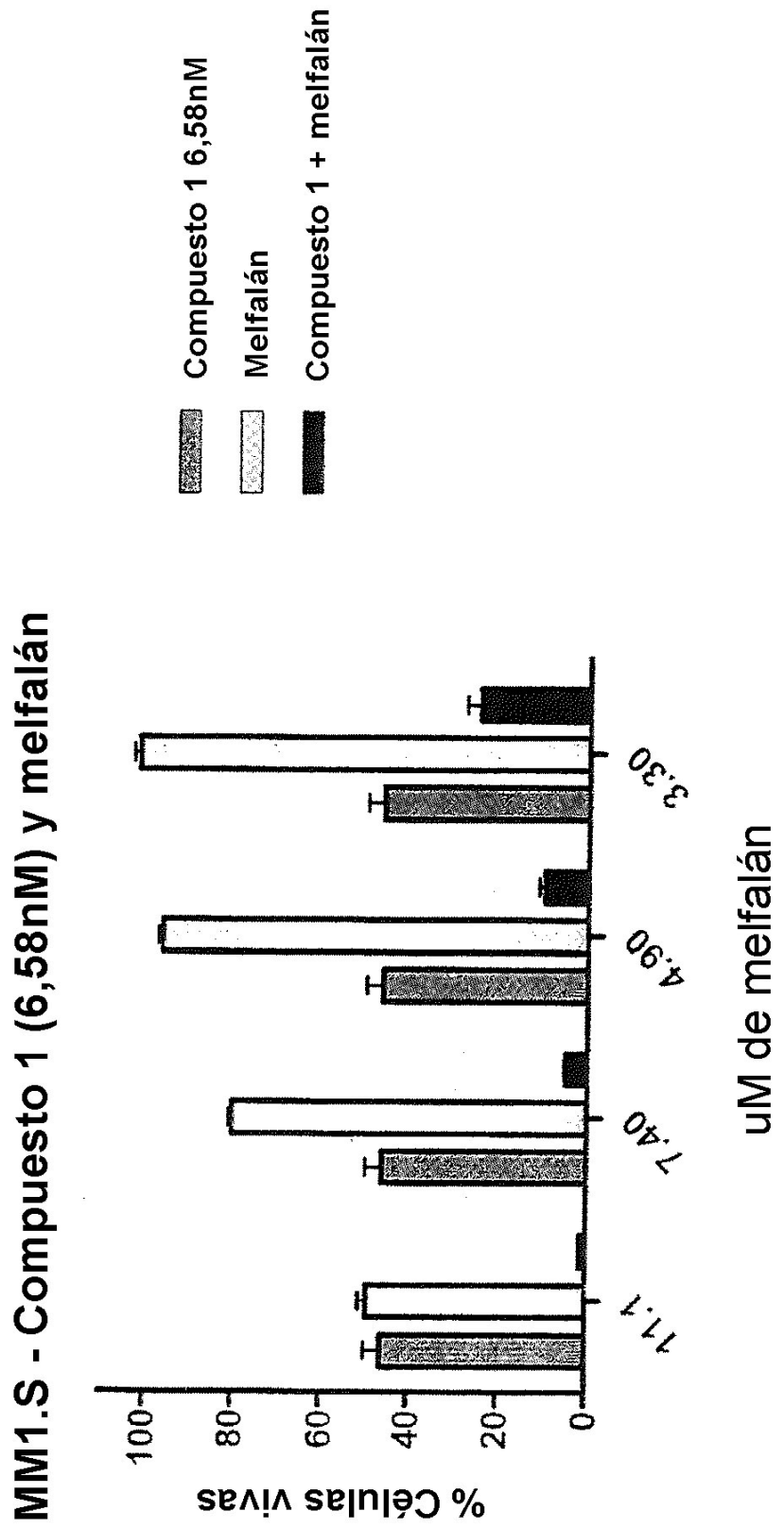


Figura 12

A.

Cohorte	CFZ / LEN (mg/m ² / mg)	N	VGPR	PR	MR	SD	PD
1	15 / 10	6	2	1		2	1
2	15 / 15	4	1	1	1	1	
3	15 / 20	7	2	3		2	

B.

