

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 642**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5375 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2012** **PCT/EP2012/059160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12156463**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012** **E 12724105 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017** **EP 2709629**

54 Título: **Terapias contra el cáncer novedosas y métodos**

30 Prioridad:

16.05.2011 GB 201108085

21.02.2012 GB 201202945

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

21.02.2018

73 Titular/es:

NUBER, ULRIKE (100.0%)

Köpenhamnsvägen 13B

217 43 Malmö, SE

72 Inventor/es:

NUBER, ULRIKE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 655 642 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

Terapias contra el cáncer novedosas y métodos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere terapias novedosas y métodos para el tratamiento de cáncer en un paciente. En particular, se proporcionan agentes y métodos para su uso en el tratamiento de cáncer en los que se usa el nivel de actividad funcional de SMARCB1 en las células cancerosas para determinar si el paciente se beneficiaría del tratamiento con un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma.

Antecedentes

Los tumores rabdoide son cánceres mortales que atacan predominantemente a los niños pequeños. La gran mayoría de los tumores rabdoide contienen mutaciones inactivantes bialélicas en el gen *SMARCB1* (véase Roberts & Biegel, 2009, Cancer Biol. Ther. 8(5), 412-416).

Los tumores rabdoide son neoplasias altamente malignas que surgen normalmente en la lactancia y niñez temprana. Los tumores se desarrollan en el cerebro y la médula espinal [denominados tumor teratoide/rabdoide atípico (AT/RT)], riñón y/o tejidos blandos (denominados tumor rabdoide maligno o tumor rabdoide extra-renal). El aspecto histológico de estos tumores malignos puede ser bastante variable. La mayoría de los tumores contienen al menos algunos campos con células rabdoide clásicas, con núcleos grandes que contienen un único nucleolo prominente, y citoplasma con inclusiones eosinófilas pálidas diferenciadas. Los tumores que manifiestan sólo células rabdoide clásicas son poco comunes, en su lugar, tienen a menudo áreas compuestas por células indiferenciadas pleomórficas o fusiformes sin un fenotipo rabdoide. Puede estar completamente ausente un componente rabdoide clásico. Los AT/RT del sistema nervioso central manifiestan normalmente una variedad de células neuroectodérmicas, epiteliales o mesenquimatosas primitivas, lo que subraya la dificultad de distinguir estos tumores de otros carcinomas del plexo coroideo o tumores neuroectodérmicos primitivos. Se usa a menudo inmunohistoquímica en el diagnóstico diferencial, basándose en la expresión típica de actina de músculo liso, antígeno de membrana epitelial y vimentina. La falta de expresión de la proteína SMARCB1 también se emplea como medio específico para distinguir tumores rabdoide de otros tumores malignos con características histológicas similares, especialmente para el diagnóstico de AT/RT frente a tumores neuroectodérmicos primitivos.

Individuos con alteraciones en la línea germinal de *SMARCB1* están predispuestos a tumores rabdoide del cerebro, el riñón y los tejidos blandos y pueden presentar más de un tumor primario. A estos niños se les diagnostica lo más a menudo en el plazo del primer año de vida y tienden a tener un peor pronóstico. No se sabe si el mal pronóstico está relacionado con la presencia de una mutación en la línea germinal en todas sus células, o el hecho de que desarrollen tumores primarios progresivos y múltiples que son resistentes a la terapia.

El nombre *SMARCB1* (relacionado con SWI/SNF, asociado a la matriz, regulador de cromatina dependiente de actina, subfamilia B, miembro 1) se deriva de su papel como miembro central del complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF. SMARCB1 es una subunidad central presente en todas las variantes del complejo SWI/SNF. La proteína está altamente conservada, tal como se evidencia por una secuencia de aminoácidos idéntica en ratones y seres humanos. Sin embargo, la función de SMARCB1 se entiende mal. No existen parálogos de *SMARCB1* y la proteína carece de motivos de proteína particularmente informativos.

Esteller (British Journal of Cancer, vol. 94, n.º 2, enero de 2006, páginas 179-183), Kohashi *et al.* (Human Pathology, vol. 40, n.º 3, marzo de 2009, páginas 349-355) y Hironori *et al.* (Journal of Neurooncology, vol. 73, n.º 3, junio de 2005, páginas 117-124) dan a conocer cada uno la identificación de subtipos tumorales. Sin embargo, no existe ninguna divulgación de la asociación de algún tratamiento con un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma con una reducción en la actividad funcional de SMARCB1.

Los documentos US 2006/084691, US 2010/113392 y WO 2010/039762 dan a conocer cada uno que inhibidores del sistema de ubiquitina-proteosoma pueden ser terapéuticamente eficaces en el tratamiento de cáncer. Sin embargo, no existe ninguna divulgación de la identificación de formas particulares de cáncer para su tratamiento, en las que la actividad funcional de SMARCB1 se reduzca.

La presente invención busca proporcionar terapias novedosas para el tratamiento de cánceres tales como tumores rabdoide, así como métodos de selección de un régimen de tratamiento eficaz en pacientes con cáncer.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el paciente se ha evaluado para establecer que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente. El paciente es un mamífero, en particular un ser humano.

Por “inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma” quiere decirse un agente, tal como una entidad química pequeña, polipéptido o similar, que puede inhibir (al menos, en parte) una función del sistema de ubiquitina-proteosoma (preferiblemente *in vivo* en seres humanos). Un inhibidor de este tipo puede actuar en cualquier punto a lo largo de la ruta de degradación de proteínas de ubiquitina-proteosoma, por ejemplo inhibiendo (al menos, en parte) el marcaje de proteínas para su degradación modulando la ubiquitinación o desubiquitinación, inhibiendo la capacidad del proteosoma para reconocer o unirse a proteínas que van a degradarse, y/o inhibiendo la capacidad del proteosoma para degradar proteínas.

El sistema de ubiquitina-proteosoma, y componentes del mismo, se describen en detalle en la bibliografía científica, por ejemplo véanse Ciechanover, 1998, *The EMBO Journal* 17, 7151-7160 (véanse las figuras 1 y 2 en el mismo) y Bedford *et al.*, 2011, *Nat Rev Drug Discov* 10, 29-46.

El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma es un inhibidor del proteosoma que actúa directamente sobre el proteosoma inhibiendo su función. Por ejemplo, el inhibidor del proteosoma puede inhibir (al menos, en parte) la capacidad del proteosoma humano para degradar proteínas.

Se conocen bien en la técnica ejemplos de inhibidores del proteosoma (por ejemplo, véanse de Bettignies & Coux, 2010, *Biochimie*. 92(11):1530-45, Kling *et al.*, 2010, *Nature Biotechnology*, 28(12):1236-1238). Los ejemplos incluyen el inhibidor del proteosoma 20S, inhibidor del proteosoma 26S, inhibidor del proteosoma 26S del virus de la hepatitis C (VHC), inhibidor del proteosoma 26S del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e inhibidor del proteosoma.

El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma también puede ser un inhibidor de ubiquitina. Se conocen bien ejemplos en la técnica e incluyen inhibidor de ubiquitina ligasa, inhibidor de peptidasa específica de ubiquitina 8 (USP8), inhibidor de enzima activante modificadora de tipo ubiquitina 3 (UBA3), inhibidor de proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7).

Por “SMARCB1” quiere decirse proteína de miembro 1 de subfamilia B de regulador de cromatina dependiente de actina asociado a la matriz relacionado con SWI/SNF. La proteína SMARCB1 humana y las secuencias de ARNm se detallan en los n.ºs de registro de la base de datos Q12824, NP_003064 y NP_001007469.

SMARCB1 también se conoce en la bibliografía científica como BAF47, INI1, RDT, RTPS1, SNF5, SNF5L1, Sfh1p, Snr1 y/o hSNFS.

Por un cáncer “asociado con células” en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente, se incluye que la expresión de SMARCB1 en las células cancerosas del paciente es baja o está ausente al nivel de proteína y/o ARNm. Alternativamente, las células cancerosas pueden expresar una forma mutada de una proteína SMARCB1 que tiene actividad reducida o ausente (es decir, las mutaciones conducen a pérdida de función de la proteína SMARCB1).

El paciente puede tener, o se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en sarcomas epitelioides, sarcomas sinoviales, sarcomas indiferenciados sin características rabdoideas, condrosarcomas mixoides extraesqueléticos, carcinomas mucinosos del páncreas, tumores malignos de la vaina de nervios periféricos, schwannomas, schwannomatosis familiar y esporádica, tumores neuroepiteliales cribiformes, tumores embrionarios del sistema nervioso central sin características rabdoideas, carcinomas del plexo coroideo, teratoma, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), cordomas escasamente diferenciados, linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide crónica, meningioma, glioblastoma, carcinoma mioepitelial, carcinoma del conducto colector.

Por ejemplo, el paciente puede tener, o puede sospecharse que tiene, cáncer de mama.

El paciente puede tener, o puede sospecharse que tiene un tumor teratoide-rabdoide atípico (AT/RT) y/o un tumor rabdoide maligno (MRT), un sarcoma indiferenciado con características rabdoideas, un carcinoma medular renal, un tumor embrionario del sistema nervioso central con características rabdoideas.

La invención proporciona un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma para su uso en el tratamiento de una leucemia asociada con una translocación del gen HRX. Las proteínas de fusión de HRX leucémicas se asocian con SMARCB1 e inhiben la apoptosis inducida por la proteína GADD34 unida a SMARCB1 (Adler *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(10):7050-60).

Un rasgo característico de la invención es la evaluación del paciente para establecer que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente.

Por “actividad funcional” baja o ausente, en este contexto, quiere decirse expresión reducida o ausente de SMARCB1 en células tumorales (por ejemplo, en relación con controles positivos internos en muestras de tejido, tales como células de vasos normales, células inflamatorias, tejido normal circundante) tal como se evalúa al nivel de proteína y/o ARNm (por ejemplo, Kohashi K *et al.*, *Modern Pathology* 2010, 23, 981-990), así como la presencia

de aberraciones cromosómicas o mutaciones en el ADN (por ejemplo deleciones, mutaciones de cambio de sentido, sin sentido, y similares) o alteraciones epigenéticas (por ejemplo metilación del ADN) que conducen a una actividad de SMARCB1 reducida o perdida.

Por tanto, la actividad funcional baja o ausente puede manifestarse por sí misma al nivel del ADN genómico, ARNm, proteína y/o actividad (es decir, función) de SMARCB1. En general, se contempla que el término “actividad funcional baja” debe entenderse como una actividad que es menor del 50% de los niveles detectados en células normales no cancerosas. Se apreciará que la etapa de evaluación puede realizarse en cualquier momento antes o incluso durante el tratamiento del paciente. Preferiblemente, sin embargo, el paciente se evalúa antes del comienzo del tratamiento con el inhibidor. La evaluación del paciente comprende proporcionar una muestra de células del paciente y medir la cantidad de proteína SMARCB1, y/o ARNm que codifica para la misma, en las células. Por ejemplo, la evaluación del paciente puede comprender medir la cantidad de proteína SMARCB1 en las células, por ejemplo mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, un ensayo inmunológico (por ejemplo, un ELISA u otro inmunoensayo basado en fase sólida tal como SPRIA o ELISA amplificado denominado IMRAMP), un ensayo de chip de proteínas, desorción/ionización por láser potenciada por superficie (SELDI), cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrometría de masas, quimioluminiscencia, nefelometría/turbometría, electroforesis o fluorescencia polarizada o pura o de flujo lateral.

Se apreciará que la muestra de células del paciente pueden ser células cancerosas o pueden ser normales (células no cancerosas). Por ejemplo, estas últimas pueden ser útiles para detectar la presencia de mutaciones en la línea germinal asociadas con actividad funcional baja o ausente de SMARCB1.

Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además medir la cantidad de ARNm de SMARCB1, por ejemplo mediante PCR cuantitativa, análisis de transferencia de tipo Northern, secuenciación profunda, SAGE o tecnologías de alineamientos.

Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además determinar el nivel de actividad de SMARCB1 (o bien directa o bien indirectamente). Tal actividad puede someterse a ensayo indirectamente, por ejemplo determinando la secuencia de ADN genómico, ARN o ADNc secuencia, por ejemplo mediante hibridación *in situ* por fluorescencia, hibridación genómica comparativa (CGH), CGH de alineamientos, otras tecnologías de alineamientos, o técnicas de secuenciación. La información de secuencia puede usarse entonces para identificar aberraciones cromosómicas o mutaciones en el ADN que conducen a una actividad de SMARCB1 reducida o perdida.

Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además determinar alteraciones epigenéticas (por ejemplo metilación del ADN, modificaciones de histonas), que conducen a expresión génica de *SMARCB1* baja o ausente, por ejemplo, mediante análisis de metilación del ADN, técnicas basadas en inmunoprecipitación de cromatina, espectrometría de masas, reacciones químicas (por ejemplo tratamiento con bisulfito).

La fosforilación de eIF2alfa y/o actividad de PP1 pueden usarse como marcadores indirectos de la actividad de SMARCB1. Sin embargo, resultaría evidente para un experto en la técnica que esta lista de técnicas no está completa y estas técnicas no son los únicos métodos adecuados que pueden usarse en la presente invención para medir la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1.

La evaluación puede comprender además medir la cantidad de proteína SMARCB1, ARNm que codifica para la misma y/u otra medida de la actividad funcional (secuencia) en una o más muestras control de células. Tales muestras control pueden incluir muestras control negativo (en las que se sabe que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente) y/o muestras control positivo (en la que se sabe que la actividad funcional de SMARCB1 está a niveles sustanciales).

Por tanto, la evaluación puede comprender realizar una biopsia para extraer una muestra de células cancerosas del paciente, células que luego pueden someterse a prueba (o bien directa o bien indirectamente como un cultivo celular primario) para determinar la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 en las mismas.

Alternativamente, o además, pueden usarse tejido normal o células del paciente para determinar la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 en las mismas ya que se han encontrado mutaciones en la línea germinal en pacientes con tumores familiares o esporádicos (véanse por ejemplo Sevenet *et al.*, 1999, Am J Human Genet 65, 1342-8; Eaton *et al.*, 2011; Pediatr Blood Cancer 56, 7-15).

Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 puede determinarse indirectamente.

Por tanto, la evaluación del paciente puede comprender diagnosticar el tipo de cáncer que padece el paciente (usando métodos convencionales bien conocidos en la técnica para el diagnóstico de cáncer). Este diagnóstico puede usarse entonces para determinar la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 en las células

cancerosas (o bien a través del conocimiento empírico del médico o bien consultando una base de datos de expresión génica y función génica en tipos de cáncer conocidos (tales como las bases de datos Gene expression omnibus, ArrayExpress, SAGEmap, RefExA, caArrayData Portal, GeneX, HuGEIndex, TCGA, RCGDB, las bases de datos del Consorcio internacional del genoma del cáncer, la base de datos Mitelman de aberraciones cromosómicas y fusiones génicas en cáncer, la base de datos SKY/M-FISH&CGH, COSMIC, TmaDB, YMD, dbEST, TMAD, GXA, SMD, la base de datos de expresión génica de Novartis, OncoMine y bases de datos similares). Tras la determinación de que el cáncer que padece el paciente está asociado con células (cancerosas) en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente, puede administrarse al paciente un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma como agente terapéutico para tratar el cáncer.

El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede ser un inhibidor seleccionado de la tabla a continuación.

Nombre del producto	Otros nombres	Indicación declarada	Principio activo	Vía de administración	Fase de desarr.	Descripción del producto	Fuente de búsqueda
CEP28331		Mieloma múltiple	No disponible	Oral	Pre-clínica	CEP-28331 es un inhibidor del proteosoma que bloquea la acción de proteosomas, complejos celulares que descomponen proteínas, como la proteína p53. CEP-28331 está desarrollándose como formulación oral para el tratamiento de mieloma múltiple.	Inhibidor del proteosoma
ONX0914	Inhibidor del inmuno-proteosoma, ONX 0914, PR 957, PR957	Enfermedades autoinmunitarias	No disponible	No disponible	Pre-clínica	ONX-0914 es un inhibidor selectivo del inmunoproteosoma que selecciona como diana la función del proteosoma y bloquea la producción de mediadores inflamatorios clave tales como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 (IL-6). ONX-0914 está desarrollándose para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y lupus.	Inhibidor del proteosoma
Inhibidor del proteosoma		Cáncer	No disponible	Oral	Pre-clínica	Inhibidor del proteosoma, un inhibidor de molécula pequeña del sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS) es un candidato no basado en boro, no peptídico, activo por vía oral que conduce a la inhibición de la actividad del proteosoma. El proteosoma es una estructura celular importante necesaria para el crecimiento y la función de células cancerosas y se ha mostrado que la inhibición del proteosoma promueve la detención del ciclo celular y la muerte o apoptosis de células cancerosas. El inhibidor del proteosoma está desarrollándose usando tecnología TRAP para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor del proteosoma
VL01		Hepatitis C	No disponible	No disponible	Pre-clínica	VL01 es un inhibidor del proteosoma que inhibe la replicación del VHC inhibiendo estructuras celulares específicas, tales como el proteosoma 26S, y por tanto impidiendo que el virus desarrolle resistencia.	Inhibidor del proteosoma

						VL01 está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VHC.	
E18770		Cancer	No disponible	Intravenosa; oral	Fase I	E-18770 es un inhibidor de ácido borónico-treonina P2 activo por vía oral reversible de la actividad quimotripsina del proteosoma de mamíferos. Actúa inhibiendo la activación del factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la degradación de IκB e induce la apoptosis en células cancerosas. E-18770 está desarrollándose como formulación intravenosa para el tratamiento de tumores sólidos o linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, metástasis óseas y mieloma múltiple.	Inhibidor del proteosoma
MLN9708	MLN2238	Tumores malignos hematológicos	citrate de ixazomib	Intravenosa; oral	Fase I	MLN9708 contiene citrate de ixazomib, inhibidor del proteosoma de segunda generación como principio activo. Ixazomib bloquea la acción del proteosoma, complejos celulares que descomponen proteínas, como la proteína p53. MLN9708 está desarrollándose como una formulación intravenosa y oral para el tratamiento de tumores malignos hematológicos, tumores malignos no hematológicos avanzados, tumores sólidos, mieloma múltiple y amiloidosis de cadena ligera resistente o con recidiva.	Inhibidor del proteosoma
NPI0052	Salinosporamida A	Linfoma	marizomib	No disponible	Fase I	NPI-0052 contiene marizomib (salinosporamida A), un inhibidor del proteosoma derivado de un actinomiceto marino obligado novedoso. Actúa inhibiendo la actividad del proteosoma impidiendo de ese modo la activación inducida por TNF-alfa de NF-kappa B. Además, esta inhibición del proteosoma da como resultado la acumulación de los inhibidores de Cdk, p21 y p27, que sensibilizan las células a la apoptosis. NPI-0052 está desarrollándose para el tratamiento de mieloma múltiple y linfomas.	Inhibidor del proteosoma
CEP18770	CT18770, E18770, E/CEP 18770, NP47098	Mieloma múltiple	No disponible	Intravenosa; oral	Fase II	CEP-18770 es un inhibidor de ácido borónico-treonina P2 reversible de la actividad quimotripsina del proteosoma de mamíferos. Actúa inhibiendo la activación del factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la degradación de IκB e induce la apoptosis en células cancerosas. CEP-18770 está desarrollándose en fase II como formulación oral e	Inhibidor del proteosoma

						intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple. CEP-18770 estuvo previamente en desarrollo como formulación oral e intravenosa para el tratamiento de tumores sólidos o linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, metástasis óseas y mieloma múltiple.	
ONX0912	PR047, inhibidor del proteosoma oral	Tumores malignos hematológicos	No disponible	No disponible	Fase II	ONX0912 es un inhibidor del proteosoma 20S oral y un análogo de PR-171 que ofrece mayor flexibilidad en el programa de dosificación y logra una inhibición prolongada del proteosoma que puede aumentar la eficacia. ONX0912 está desarrollándose como formulación oral para el tratamiento de tumores malignos hematológicos. Este producto se añade tras la adquisición de Proteolix, Inc.	Inhibidor del proteosoma
PR171		Tumores sólidos	carfilzomib	Intravenosa	Fase II	PR171 contiene carfilzomib, un análogo sintético de epoxomicina. Es un inhibidor del proteosoma novedoso que tiene alta selectividad por los sitios activos de treonina N-terminal dentro del proteosoma. PR171 está desarrollándose usando tecnología CyDex Captisol como formulación intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple resistente y con recidiva, tumores sólidos avanzados y linfoma no Hodgkin.	Inhibidor del proteosoma
Velcade	C68 22, LBH589, LDP 341, MLN 341, PS 341, LDP341, MG 341, MLN341, PS341, SB1, Sch60936, TNK tPA	Mieloma múltiple	bortezomib	Intravenosa; oral; subcutánea	Comercializado	Velcade contiene bortezomib, que es un inhibidor del proteosoma. Los proteosomas son complejos enzimáticos que están presentes en todas las células que descomponen proteínas intracelulares de una manera regulada tanto en células sanas como cancerosas. La inhibición del proteosoma por Velcade impide la descomposición regulada de estas proteínas intracelulares, interfiriendo de ese modo con muchas de estas funciones variadas. Esta alteración de rutas esenciales en células cancerosas puede conducir a muerte celular e inhibir el crecimiento tumoral. Velcade está indicado para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple y para el tratamiento de pacientes con linfoma de células del manto que han recibido al menos una terapia previa. Está desarrollándose también	Inhibidor del proteosoma

						para el tratamiento de tumores sólidos, trastorno linfoproliferativo de células B, enfermedad de injerto contra huésped crónica y leucemia prolinfocítica de células T con recidiva/resistente. Las indicaciones identificadas en el pasado pero interrumpidas incluyen leucemia linfocítica crónica, carcinoma bronquioalveolar, cáncer de pulmón de células no pequeñas y amiloidosis.	
Inhibidor del proteosoma de VHC		Hepatitis C	No disponible	No disponible	No disponible	El inhibidor del proteosoma de VHC inhibe la replicación del VHC inhibiendo estructuras celulares específicas, tales como el proteosoma 26S, y por tanto impidiendo que el virus desarrolle resistencia. El inhibidor de proteasa de VHC está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VHC.	Inhibidor del proteosoma
Inhibidor del proteosoma de VIH		SIDA/VIH	No disponible	No disponible	No disponible	El inhibidor de proteasa de VIH inhibe dianas celulares específicas esenciales para la replicación del VIH, tales como el proteosoma 26S, e impidiendo que el virus desarrolle resistencia a esta clase de fármacos experimentando mutaciones rápidas. El inhibidor del proteosoma de VIH está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VIH.	Inhibidor del proteosoma
KRX0401	266, D21266, KRX0401, NSC639966	Mieloma múltiple	perifosina	Intravenosa; oral	No disponible	KRX-0401 contiene perifosina, una alquilfosfolina con similitud estructural a fosfolípidos que son constituyentes principales de membranas celulares. Es un agente anticancerígeno novedoso, posiblemente el primero de su clase, oral que modula Akt, una proteína en el cuerpo asociada con crecimiento y supervivencia tumorales. También modula varias de otras rutas de transducción de señales clave, incluyendo las rutas de JNK y MAPK, que son rutas asociadas con muerte celular programada, crecimiento celular, diferenciación celular y supervivencia celular. KRX-0401 está desarrollándose para el tratamiento de mieloma múltiple resistente o con recidiva.	Inhibidor del proteosoma
Inhibidor del proteosoma		Cáncer	No disponible	No disponible	No disponible	El inhibidor del proteosoma está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor del proteosoma

Inhibidor específico del inmuno-proteosoma		Tumores malignos hematológicos	No disponible	No disponible	Inte-rumpido	El inhibidor específico del inmuno-proteosoma actúa inhibiendo el inmuno-proteosoma que es una forma única del proteosoma, en este tres subunidades catalíticas son diferentes de las del proteosoma convencional. No reacciona de manera cruzada con el proteosoma constitutivo y tiene actividad citotóxica contra líneas celulares de tumores hematológicos. El inhibidor específico del inmuno-proteosoma está desarrollándose para el tratamiento de cánceres hematológicos. Este producto se añadió a Onyx tras la adquisición de Proteolix, Inc.	Inhibidor del proteo-soma
MLN273		Inflamación	No disponible	No disponible	Inte-rumpido	MLN-273 es un inhibidor del proteosoma de molécula pequeña novedoso. MLN-273 estaba en desarrollo para el tratamiento de inflamación.	Inhibidor del proteo-soma
MLN519	LDP-519	Isquemia cerebral	No disponible	Parenteral	Inte-rumpido	MLN-519 (anteriormente conocido como LDP-519) es un candidato a fármaco de molécula pequeña que actúa a través de la inhibición del proteosoma. Está diseñado para actuar sobre un mecanismo intracelular clave que controla la activación de moléculas inflamatorias. MLN-519 estaba bajo desarrollo como formulación parenteral para el tratamiento de isquemia cerebral.	Inhibidor del proteo-soma
Tetra-acridinas		Cáncer	No disponible	No disponible	Inte-rumpido	Las tetra-acridinas son inhibidores dobles de topoisomerasa II y proteosoma que actúan bloqueando del crecimiento tumoral. Las tetra-acridinas estaban bajo desarrollo para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor del proteo-soma
MLN4924		Tumores malignos hematológicos	No disponible	Intravenosa	Fase I	MLN4924 es una nueva molécula pequeña que actúa como inhibidor de la enzima de activación de NEDD8 (regulada por disminución en el desarrollo expresada por células precursoras neurales 8) (NAE). NAE controla un subconjunto de proteínas en la ruta de ubiquitina-proteosoma (UPP) que regulan la supervivencia de células cancerosas. MLN4924 está desarrollándose como formulación intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple, tumores malignos hematológicos y tumores sólidos.	Inhibidor de ubiquitina

HBX19818		Leucemia linfocítica crónica	No disponible	No disponible	No disponible	HBX19818 es un inhibidor específico de proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7), que puede sensibilizar tumores con defectos de ATM y TP53. HBX19818 está desarrollándose para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL).	Inhibidor de ubiquitina
HBX41108	Inhibidores de USP7	Cáncer	No disponible	No disponible	No disponible	HBX41108 es un inhibidor de proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7) que actúa bloqueando USP7. Esto da como resultado la activación de p53 funcional y la inhibición del crecimiento de células cancerosas dependientes de p53. HBX41108 está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor de ubiquitina
Inhibidores de ubiquitina ligasa		Cáncer	No disponible	No disponible	No disponible	Los inhibidores de ubiquitina ligasa son novedosos y regulan la mitosis o división celular para detener el crecimiento e inducir apoptosis en células cancerosas. Las ubiquitina ligasas son enzimas implicadas en muchas funciones celulares importantes, incluyendo división celular y la progresión de determinados cánceres. Los inhibidores de ubiquitina ligasa están desarrollándose para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor de ubiquitina
Inhibidores de USP8		Cáncer	No disponible	No disponible	No disponible	Los inhibidores de USP8 inhiben proteasas específicas de ubiquitina 8 (USP8), que pertenecen a una familia de cisteína-proteasas implicadas en la regulación de la degradación de proteínas. Elimina ubiquitina de sustratos proteicos específicos, lo que permite el salvamento de proteínas de la degradación en el proteosoma, la regulación de la localización o activación de proteínas. Los inhibidores de USP8 están desarrollándose para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor de ubiquitina
CC12507		Cáncer	No disponible	No disponible	Interrumpido	CC12507 es un modulador de ubiquitina ligasa que regula una amplia gama de procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación y supervivencia o muerte celulares. También modula proteínas de señalización celular clave. CC12507 estaba bajo desarrollo para el tratamiento de cáncer pero se interrumpió probablemente a comienzo de la década de 2000.	Inhibidor de ubiquitina

HBX99200		Cáncer	No disponible	No disponible	Interrumpido	HBX 99.200 es un inhibidor de proteasas específicas de ubiquitina 8 (USP8), que pertenecen a una familia de cisteína-proteasas implicadas en la regulación de la degradación de proteínas. Elimina ubiquitina de sustratos proteicos específicos, lo que permite el salvamento de proteínas de la degradación en el proteosoma, la regulación de la localización o activación de proteínas. HBX 99.200 está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.	Inhibidor de ubiquitina
P5091	P005091	Mieloma múltiple	No disponible	No disponible	Pre-clínica	P5091 es un inhibidor de USP7 que está desarrollándose usando la plataforma de tecnología DUB para el tratamiento de mieloma múltiple.	Inhibidor de ubiquitina ligasa

Más específicamente, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede ser un inhibidor del proteosoma seleccionado del grupo que consiste en bortezomib (PS-341, MG-341, *Velcade*®), PI-083, MLN 9708, MLN 4924, MLN 519, carfilzomib, ONX 0912, CEP-1877, NPI-0047, NPI-0052, BU-32 (NSC D750499-S), PR-171, IPSI-001, y productos naturales con efectos inhibidores del proteosoma, tales como el polifenol de té verde 3-galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), genisteína de isoflavona de soja y el compuesto de la especia cúrcuma, curcumina.

Por ejemplo, el inhibidor del proteosoma puede ser bortezomib (nombre registrado = *Velcade*®, nombre de la IUPAC = ácido [(1R)-3-metil-1-((2S)-3-fenil-2-[(pirazin-2-ilcarbonil)-amino]propanoil)amino)butil]borónico, número CAS = 179324-69-7).

El inhibidor puede ser también un inhibidor del proteosoma o de ubiquitina seleccionado de la tabla a continuación.

Producto	Otros nombres	Fase	Principio activo	Descripción
CEP28331		PC		CEP-28331 es un inhibidor del proteosoma que bloquea la acción de proteosomas, complejos celulares que descomponen proteínas, como la proteína p53. CEP-28331 está desarrollándose como formulación oral para el tratamiento de mieloma múltiple.
ONX0914	Inhibidor del inmunoproteosoma, ONX 0914, PR 957, PR957	PC		ONX-0914 es un inhibidor selectivo del inmunoproteosoma que selecciona como diana la función del proteosoma y bloquea la producción de mediadores inflamatorios clave tales como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 (IL-6). ONX-0914 está desarrollándose para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y lupus.
P5091	P005091	PC		P5091 es un inhibidor de USP7 que está desarrollándose usando la plataforma de tecnología DUB para el tratamiento de mieloma múltiple.
Inhibidor del proteosoma		PC		Inhibidor del proteosoma, un inhibidor de molécula pequeña del sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS) es un candidato no basado en boro, no peptídico, activo por vía oral que conduce a la inhibición de la actividad del proteosoma. El proteosoma es una estructura celular importante necesaria para el crecimiento y la función de células cancerosas y se ha mostrado que la inhibición del proteosoma promueve la detención del ciclo celular y la muerte o apoptosis de células cancerosas. El inhibidor del proteosoma está desarrollándose usando tecnología TRAP para el tratamiento de cáncer.

VL01		PC		VL01 es un inhibidor del proteosoma que inhibe la replicación del VHC inhibiendo estructuras celulares específicas, tales como el proteosoma 26S, y por tanto impidiendo que el virus desarrolle resistencia. VL01 está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VHC.
E18770		I		E-18770 es un inhibidor de ácido borónico-treonina P2 activo por vía oral y reversible de la actividad quimotripsina del proteosoma de mamíferos. Actúa inhibiendo la activación del factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la degradación de IκB e induce la apoptosis en células cancerosas. E-18770 está desarrollándose como formulación intravenosa para el tratamiento de tumores sólidos o linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, metástasis óseas y mieloma múltiple.
MLN4924		I		MLN4924 es una nueva molécula pequeña que actúa como inhibidor de la enzima de activación de NEDD8 (regulada por disminución en el desarrollo expresada por células precursoras neurales 8) (NAE). NAE controla un subconjunto de proteínas en la ruta de ubiquitina-proteosoma (UPP) que regulan la supervivencia de células cancerosas. MLN4924 está desarrollándose como formulación intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple, tumores malignos hematológicos y tumores sólidos.
MLN9708	MLN2238	I	citrato de ixazomib	MLN9708 contiene citrato de ixazomib, inhibidor del proteosoma de segunda generación como principio activo. Ixazomib bloquea la acción del proteosoma, complejos celulares que descomponen proteínas, como la proteína p53. MLN9708 está desarrollándose como una formulación intravenosa y oral para el tratamiento de tumores malignos hematológicos, tumores malignos no hematológicos avanzados, tumores sólidos, mieloma múltiple y amiloidosis de cadena ligera resistente o con recidiva.
NPI0052	Salinosporamida A	I	marizomib	NPI-0052 contiene marizomib (salinosporamida A), un inhibidor del proteosoma derivado de un actinomiceto marino obligado novedoso. Actúa inhibiendo la actividad del proteosoma impidiendo de ese modo la activación inducida por TNF-alfa de NF-kappa B. Además, esta inhibición del proteosoma da como resultado la acumulación de los inhibidores de Cdk, p21 y p27, que sensibilizan las células a la apoptosis. NPI-0052 está desarrollándose para el tratamiento de mieloma múltiple y linfomas.
CEP18770	CT18770, E18770, E/CEP 18770, NP47098	II		CEP-18770 es un inhibidor de ácido borónico-treonina P2 reversible de la actividad quimotripsina del proteosoma de mamíferos. Actúa inhibiendo la activación del factor nuclear-kappa B (NF-kB) y la degradación de IκB e induce la apoptosis en células cancerosas. CEP-18770 está desarrollándose en fase II como formulación oral e intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple. CEP-18770 estuvo previamente en desarrollo como formulación oral e intravenosa para el tratamiento de tumores sólidos o linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, metástasis óseas y mieloma múltiple.
ONX0912	PR047, inhibidor del proteosoma oral	II		ONX0912 es un inhibidor del proteosoma 20S oral y un análogo de PR-171 que ofrece mayor flexibilidad en el programa de dosificación y logra

				una inhibición prolongada del proteosoma que puede aumentar la eficacia. ONX0912 está desarrollándose como formulación oral para el tratamiento de tumores malignos hematológicos.
PR171		II	carfilzomib	PR171 contiene carfilzomib, un análogo sintético de epoxomicina. Es un inhibidor del proteosoma novedoso que tiene alta selectividad por los sitios activos de treonina N-terminal dentro del proteosoma. PR171 está desarrollándose usando tecnología CyDex Captisol como formulación intravenosa para el tratamiento de mieloma múltiple resistente y con recidiva, tumores sólidos avanzados y linfoma no Hodgkin.
Velcade	C68 22, LBH589, LDP 341, MLN 341, PS 341, LDP341, MG 341, MLN341, PS341, SB1, Sch60936, TNK tPA	M	bortezomib	Velcade contiene bortezomib, que es un inhibidor del proteosoma. Los proteosomas son complejos enzimáticos que están presentes en todas las células que descomponen proteínas intracelulares de una manera regulada tanto en células sanas como cancerosas. La inhibición del proteosoma por Velcade impide la descomposición regulada de estas proteínas intracelulares, interfiriendo de ese modo con muchas de estas funciones variadas. Esta alteración de rutas esenciales en células cancerosas puede conducir a muerte celular e inhibir el crecimiento tumoral. Velcade está indicado para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple y para el tratamiento de pacientes con linfoma de células del manto que han recibido al menos una terapia previa. Está desarrollándose también para el tratamiento de tumores sólidos, trastorno linfoproliferativo de células B, enfermedad de injerto contra huésped crónica y leucemia prolinfocítica de células T con recidiva/resistente. Las indicaciones identificadas en el pasado pero interrumpidas incluyen leucemia linfocítica crónica, carcinoma bronquioalveolar, cáncer de pulmón de células no pequeñas y amiloidosis.
HBX19818		NA		HBX19818 es un inhibidor específico de proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7), que puede sensibilizar tumores con defectos de ATM y TP53. HBX19818 está desarrollándose para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL).
HBX41108	Inhibidores de USP7	NA		HBX41108 es un inhibidor de proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7) que actúa bloqueando USP7. Esto da como resultado la activación de p53 funcional y la inhibición del crecimiento de células cancerosas dependientes de p53. HBX41108 está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.
Inhibidor del proteosoma de VHC		NA		El inhibidor del proteosoma de VHC inhibe la replicación del VHC inhibiendo estructuras celulares específicas, tales como el proteosoma 26S, y por tanto impidiendo que el virus desarrolle resistencia. El inhibidor de proteasa de VHC está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VHC.
Inhibidor del proteosoma de VIH		NA		El inhibidor de proteasa de VIH inhibe dianas celulares específicas esenciales para la replicación del VIH, tales como el proteosoma 26S, e impidiendo que el virus desarrolle resistencia a esta clase de fármacos experimentando mutaciones rápidas. El inhibidor del proteosoma de VIH está desarrollándose para el tratamiento de infecciones por VIH.
KRX0401	266, D21266, KRX0401,	NA	perifosina	KRX-0401 contiene perifosina, una alquilfosfolina con similitud estructural a fosfolípidos que son

	NSC639966			constituyentes principales de membranas celulares. Es un agente anticancerígeno novedoso, posiblemente el primero de su clase, oral que modula Akt, una proteína en el cuerpo asociada con crecimiento y supervivencia tumorales. También modula varias de otras rutas de transducción de señales clave, incluyendo las rutas de JNK y MAPK, que son rutas asociadas con muerte celular programada, crecimiento celular, diferenciación celular y supervivencia celular. KRX-0401 está desarrollándose para el tratamiento de mieloma múltiple resistente o con recidiva.
Inhibidor del proteosoma		NA		El inhibidor del proteosoma está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.
Inhibidores de ubiquitina ligasa		NA		Los inhibidores de ubiquitina ligasa son novedosos y regulan la mitosis o división celular para detener el crecimiento e inducir apoptosis en células cancerosas. Las ubiquitina ligasas son enzimas implicadas en muchas funciones celulares importantes, incluyendo división celular y la progresión de determinados cánceres. Los inhibidores de ubiquitina ligasa están desarrollándose para el tratamiento de cáncer.
Inhibidores de USP8		NA		Los inhibidores de USP8 inhiben proteasas específicas de ubiquitina 8 (USP8), que pertenecen a una familia de cisteína-proteasas implicadas en la regulación de la degradación de proteínas. Elimina ubiquitina de sustratos proteicos específicos, lo que permite el salvamento de proteínas de la degradación en el proteosoma, la regulación de la localización o activación de proteínas. Los inhibidores de USP8 están desarrollándose para el tratamiento de cáncer.
CC12507		D		CC12507 es un modulador de ubiquitina ligasa que regula una amplia gama de procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación y supervivencia o muerte celulares. También modula proteínas de señalización celular clave. CC12507 estaba bajo desarrollo para el tratamiento de cáncer pero se interrumpió probablemente a comienzo de la década de 2000.
HBX99200		D		HBX 99.200 es un inhibidor de proteasas específicas de ubiquitina 8 (USP8), que pertenecen a una familia de cisteína-proteasas implicadas en la regulación de la degradación de proteínas. Elimina ubiquitina de sustratos proteicos específicos, lo que permite el salvamento de proteínas de la degradación en el proteosoma, la regulación de la localización o activación de proteínas. HBX 99.200 está desarrollándose para el tratamiento de cáncer.
Inhibidor específico del inmunoproteosoma		D		El inhibidor específico del inmunoproteosoma actúa inhibiendo el inmunoproteosoma que es una forma única del proteosoma, en este tres subunidades catalíticas son diferentes de las del proteosoma convencional. No reacciona de manera cruzada con el proteosoma constitutivo y tiene actividad citotóxica contra líneas celulares de tumores hematológicos. El inhibidor específico del inmunoproteosoma está desarrollándose para el tratamiento de cánceres hematológicos.
MLN273		D		MLN-273 es un inhibidor del proteosoma de molécula pequeña novedoso. MLN-273 estaba en desarrollo para el tratamiento de inflamación.
MLN519	LDP-519	D		MLN-519 (anteriormente conocido como LDP-519)

				es un candidato a fármaco de molécula pequeña que actúa a través de la inhibición del proteosoma. Está diseñado para actuar sobre un mecanismo intracelular clave que controla la activación de moléculas inflamatorias. MLN-519 estaba bajo desarrollo como formulación parenteral para el tratamiento de isquemia cerebral.
Tetra-acridinas		D		Las tetra-acridinas son inhibidores dobles de topoisomerasa II y proteosoma que actúan bloqueando del crecimiento tumoral. Las tetra-acridinas estaban bajo desarrollo para el tratamiento de cáncer.
<i>Candidatos enumerados en el borrador de solicitud de patente pero no identificados durante la revisión de candidatos a inhibidores de ubiquitina-proteosoma:</i>				
PI-083				Confirmado en publicaciones
BU-32				Confirmado en publicaciones
IPSI-001				Confirmado en publicaciones

Los expertos en la técnica apreciarán adicionalmente que el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede formularse a diversas concentraciones, dependiendo de varios factores incluyendo la eficacia/toxicidad del inhibidor que está usándose y la indicación para la que está usándose. Por supuesto, la concentración máxima en cualquier formulación farmacéutica dada estará limitada por la solubilidad máxima del inhibidor en la misma. Sin embargo, las formulaciones deben contener una cantidad del inhibidor suficiente para proporcionar una concentración *in vivo* en o cerca de las células cancerosas diana que es suficiente para inducir su muerte celular (por ejemplo por medio de apoptosis). La concentración o cantidad necesaria para proporcionar el efecto deseado depende de la potencia del inhibidor en cuestión y puede establecerse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica o puede ser información ya disponible. Lo mismo se aplica a la dosis diaria y el régimen de dosificación para los inhibidores individuales.

En general, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma se formula a una concentración de entre 1 nM y 1 M. Por ejemplo, la formulación farmacéutica puede comprender un inhibidor del proteosoma a una concentración de entre 1 μ M y 1 mM, por ejemplo entre 1 μ M y 100 μ M, entre 5 μ M y 50 μ M, entre 10 μ M y 50 μ M, entre 20 μ M y 40 μ M o aproximadamente 30 μ M.

Los inhibidores del sistema de ubiquitina-proteosoma se administrarán generalmente en mezcla con un excipiente farmacéutico, diluyente o portador adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional (por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pensilvania, EE.UU.). Se comentan a continuación vías de administración adecuadas, e incluyen administración intravenosa, oral, pulmonar, intranasal, tópica, aural, ocular, en la vejiga y el SNC.

Por ejemplo, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos en este sentido incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las formulaciones pueden administrarse alternativamente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intratumoral, por vía peritumoral, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea (incluyendo por medio de una serie de agujas fijas o usando la tecnología *Powderject*® sin agujas), o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se usan de la mejor manera en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa como para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de

desde 3 hasta 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de comprimidos, gránulos y polvos estériles del tipo previamente descrito.

Los inhibidores del sistema de ubiquitina-proteosoma también pueden administrarse por vía intranasal o mediante inhalación y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol a partir de un recipiente a presión, bomba, pulverización o nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetra-fluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A³ o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. El recipiente a presión, bomba, pulverización o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del inhibidor del proteosoma activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propelente como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador para que contengan una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Se disponen preferiblemente formulaciones de aerosol o de polvo seco de modo que cada dosis medida o "ráfaga" contenta al menos 1 mg de un compuesto para su administración al paciente. Se apreciará que la dosis global con un aerosol variará de paciente a paciente y de indicación a indicación, y puede administrarse en una única dosis o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo de todo el día.

Alternativamente, también pueden emplearse otras vías de administración convencionales en la técnica; por ejemplo la formulación de la invención puede administrarse por vía oral, por vía bucal o por vía sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. La formulación puede administrarse también por vía intraocular, por vía intraaural o por medio de inyección intracavernosa (véase más adelante).

Para aplicación por vía tópica, por ejemplo a la piel, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede administrarse en forma de una loción, disolución, crema, gel, pomada o polvo para uso externo (por ejemplo, véase *Remington*, citado anteriormente, páginas 1586 a 1597). Por tanto, los inhibidores del proteosoma pueden formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden formularse como una crema o loción adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, sulfato de e-laurilo, un alcohol (por ejemplo etanol, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico) y agua.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen además pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

La formulación puede administrarse también por la vía ocular, particularmente para tratar enfermedades del ojo. Para uso oftálmico, los compuestos pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril o, preferiblemente, como disoluciones en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de bencilalconio. Alternativamente, pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

Para uso veterinario, se administra un compuesto como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal, y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será la más apropiada para una animal particular.

En una realización particular, la formulación es adecuada para administración sistémica a un paciente (por ejemplo, por medio de una vía de administración oral o parenteral).

La formulación que comprende el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede almacenarse en cualquier

contenedor o recipiente adecuado conocido en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que el recipiente o contenedor debe ser preferiblemente hermético y/o estar esterilizado. Ventajosamente, el recipiente o contenedor está hecho de un material plástico, tal como polietileno.

5 El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma se administrará a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, o “cantidad eficaz”, o “terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente y aditivo requeridos, es decir un portador o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para reducir y lo más preferiblemente impedir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en un estado clínicamente significativo en un huésped. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y el uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarla el trabajador veterinario o médico experto habitual basándose en las características del paciente, tales como la edad, el peso, el sexo, el estado, las complicaciones, otras enfermedades, etc., tal como se conoce bien en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente eficaz puede llevarse a cabo mediante una única administración en forma de una unidad de dosis individual o si no varias unidades de dosis más pequeñas y también mediante administraciones múltiples de dosis subdivididas a intervalos específicos. Alternativamente, la dosis puede proporcionarse como una infusión continua a lo largo de un periodo prolongado.

25 El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma se administra a una dosis suficiente para inducir muerte celular (por ejemplo apoptosis) de células cancerosas en el paciente que está tratándose. Por tanto, la dosis del inhibidor del proteosoma puede elegirse con el fin de inhibir el crecimiento y/o número de células cancerosas en el paciente.

30 Se apreciará que la dosis de inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede cambiarse durante el transcurso del tratamiento del paciente. Por ejemplo, puede usarse una dosis superior durante una fase de tratamiento terapéutico inicial de un cáncer existente, seguido por una dosis de “mantenimiento” inferior tras completarse el tratamiento inicial para prevenir la recaída del cáncer.

35 El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma (por ejemplo un inhibidor del proteosoma tal como bortezomib) se administra normalmente a una dosis de entre 0,5 y 1,3 mg/m² por dosis, que puede repetirse a intervalos regulares (por ejemplo diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, etc.).

40 Los expertos en la técnica apreciarán que el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede ser para su uso como un único tratamiento para cáncer en un paciente o como parte de un tratamiento de combinación (tratamiento adicional que puede ser un agente farmacéutico, radioterapia y/o cirugía).

Por tanto, el paciente puede recibir también uno o más tratamientos adicionales para cáncer, por ejemplo agentes farmacéuticos (tales como agentes quimioterápicos), radioterapia y/o cirugía.

45 El uno o más tratamientos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en agentes quimioterápicos convencionales (tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales y terpenoides, inhibidores de topoisomerasa y antineoplásicos), agentes radioterápicos, agentes terapéuticos basados en anticuerpos (tales como gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, cetuximab, bevacizumab) y esteroides.

50 La invención también proporciona el uso de un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma en la preparación de un medicamento para tratar cáncer en un paciente, en el que el paciente se evalúa antes del tratamiento con el inhibidor para establecer que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente.

55 Se describieron características preferidas de esto y aspectos adicionales de la invención anteriormente en relación con los inhibidores del proteosoma de la invención.

La invención proporciona:

60 (a) un método para seleccionar un agente farmacéutico para tratar cáncer en un paciente, comprendiendo el método:

(i) determinar si el cáncer presente en un paciente está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente; y

65 (ii) cuando se encuentra en la etapa (a) que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional

(por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente, seleccionar un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma como agente farmacéutico para tratar cáncer en el paciente.

La etapa (i) comprende (a) obtener una muestra biológica de un paciente, (b) medir *in vitro* la actividad funcional de SMARCB1 en la muestra y (c) comparar la actividad encontrada con un valor umbral. El valor umbral se determina por ejemplo a partir de muestras biológicas de sujetos con actividad funcional normal de SMARCB1. La muestra biológica del paciente puede ser, por ejemplo, de biopsias del tumor primario, metástasis locales o distantes o células cancerosas en fluidos corporales (por ejemplo sangre, líquido cefalorraquídeo).

La etapa ii) comprende seleccionar un inhibidor tal como se describe en el presente documento.

Siempre que sea relevante, la descripción anterior de la etapa (i) y (ii) es también válida para otros aspectos de la invención, es decir ésta es también relevante para las siguientes (b), (c) y (d).

(b) Un método para identificar un paciente con cáncer o una subpoblación de pacientes con cáncer para los que la administración de un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma sería terapéuticamente beneficiosa, comprendiendo el método:

(i) determinar si el cáncer presente en un paciente está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente; y

(ii) cuando se encuentra en la etapa (a) que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente, identificar el paciente como paciente con cáncer para el que la administración de un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma sería terapéuticamente beneficiosa.

(c) Un método para tratar cáncer en un paciente, comprendiendo el método:

(i) determinar si el cáncer presente en un paciente está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente; y

(ii) cuando se encuentra en la etapa (a) que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente, administrar al paciente un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma.

(d) Un método para identificar si un paciente que padece cáncer, que se trata normalmente con un inhibidor del sistema de proteosoma-ubiquitina, se beneficiaría de tal tratamiento, comprendiendo el método:

(i) determinar si el cáncer presente en un paciente está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente; y

(ii) cuando se encuentra en la etapa (a) que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional (por ejemplo expresión) de SMARCB1 es baja o está ausente, administrar al paciente un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma.

El paciente puede tener, o se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en sarcomas epitelioides, sarcomas sinoviales, sarcomas indiferenciados sin características rabdoideas, condrosarcomas mixoides extraesqueléticos, carcinomas mucinosos del páncreas, tumores malignos de la vaina de nervios periféricos, schwannomas, schwannomatosis familiar y esporádica, tumores neuroepiteliales cribiformes, tumores embrionarios del sistema nervioso central sin características rabdoideas, carcinomas del plexo coroideo, teratoma, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), cordomas escasamente diferenciados, linfoma no Hodgkin y leucemia mieloide crónica, meningioma, glioblastoma, carcinoma mioepitelial, carcinoma del conducto colector.

Por ejemplo, el paciente puede tener, o puede sospecharse que tiene, cáncer de mama.

El paciente puede tener, o sospecharse que tiene, tumores rabdoideos malignos, tumores teratoides/rabdoideos atípicos, sarcomas indiferenciados con características rabdoideas, carcinomas medulares renales, tumores embrionarios del sistema nervioso central con características rabdoideas, un tumor teratoide-rabdoide atípico (AT/RT) y/o un tumor rabdoide maligno (MRT).

Los aspectos anteriores del método de la invención, la etapa (i) comprende proporcionar una muestra de células (por ejemplo células cancerosas) de un paciente y evaluar la actividad funcional de SMARCB1 en la misma (tal como se describió anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención. Por ejemplo, la evaluación del paciente puede comprender medir la cantidad de proteína SMARCB1 en las células, por ejemplo mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, un ensayo inmunológico (por ejemplo, un ELISA u otro inmunoensayo basado en fase sólida tal como SPRIA o ELISA amplificado

denominado IMRAMP), un ensayo de chip de proteínas, desorción/ionización por láser potenciada por superficie (SELDI), cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrometría de masas, quimioluminiscencia, nefelometría/turbometría, electroforesis o fluorescencia polarizada o pura o de flujo lateral.

5 Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además medir la cantidad de ARNm de SMARCB1, por ejemplo mediante PCR cuantitativa, análisis de transferencia de tipo Northern, secuenciación profunda, SAGE o tecnologías de alineamientos.

10 Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además determinar el nivel de actividad de SMARCB1 (o bien directa o bien indirectamente). Tal actividad puede evaluarse indirectamente, por ejemplo determinando la secuencia de ADN genómico, ARN o ADNc, por ejemplo mediante hibridación *in situ* por fluorescencia, hibridación genómica comparativa (CGH), CGH de alineamientos, otras tecnologías de alineamientos, o técnicas de secuenciación. La información de secuencia puede usarse entonces para identificar aberraciones cromosómicas o mutaciones en el ADN que conducen a una actividad de SMARCB1 reducida o perdida.
15 Alternativamente, puede usarse la fosforilación de eIF2alpha y/o actividad de PP1 como marcadores indirectos de la actividad de SMARCB1.

20 Alternativamente, o además, la evaluación del paciente puede comprender además determinar alteraciones epigenéticas (por ejemplo metilación del ADN, modificaciones de histonas), que conducen a expresión génica de *SMARCB1* baja o ausente por ejemplo mediante análisis de metilación del ADN, técnicas basadas en inmunoprecipitación de cromatina, espectrometría de masas, reacciones químicas (por ejemplo tratamiento con bisulfito).

25 La etapa (i) puede comprender además evaluar la actividad funcional de SMARCB1 en una o más muestras control de células (que pueden incluir controles negativo y/o positivo; véase anteriormente).

30 La etapa (i) puede comprender evaluar la actividad funcional de SMARCB1 en tejido normal o células del paciente ya que se han encontrado mutaciones en la línea germinal en pacientes con tumores familiares o esporádicos (véase por ejemplo Sevenet *et al.*, 1999, Am J Human Genet 65, 1342-8; Eaton *et al.*, 2011; Pediatr Blood Cancer 56, 7-15).

La etapa (i) puede comprender también diagnosticar el tipo de cáncer que padece el paciente.

35 El inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma es un inhibidor del proteosoma seleccionado del grupo que consiste en bortezomib (PS-341, MG-341, *Velcade*®), PI-083, MLN 9708, MLN 4924, MLN 519, carfilzomib, ONX 0912, CEP-1877, NPI-0052, BU-32 (NSC D750499-S), PR-171, IPSI-001, y productos naturales con efectos inhibidores del proteosoma, tales como el polifenol de té verde 3-galato de (-)-epigallocatequina (EGCG), genisteína de isoflavona de soja y el compuesto de la especia cúrcuma, curcumina.

40 Por ejemplo, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede ser bortezomib.

Se detallaron anteriormente regímenes de administración preferidos para el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma en relación con el primer aspecto de la invención.

45 Los inhibidores mencionados en las tablas en el presente documento así como otros detalles referentes a los inhibidores también son relevantes para el método y otros aspectos de la presente invención.

50 Por ejemplo, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede ser para su administración mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en vías parenteral, intratumoral, oral, intravenosa, transdérmica e intramuscular.

55 Asimismo, el inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma puede administrarse a una dosis de entre 0,5 y 1,3 mg/m² por dosis, que puede repetirse a intervalos regulares (por ejemplo diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, etc.).

El paciente también puede recibir uno o más tratamientos adicionales para el tratamiento de cáncer, tal como un agente farmacéutico adicional (tal como un agente quimioterápico), radioterapia y/o cirugía (véase anteriormente).

60 Ahora se describirán ejemplos preferidos, no limitativos que encarnan determinados aspectos de la invención, con referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Implicación de SMARCB1 en la respuesta de proteína desplegada (UPR)

65 A, la desactivación de SMARCB1 mediada por shRNA en células MCF7 (inducidas con tetraciclina) conduce a un aumento de la fosforilación de eIF2alpha tal como se determina mediante inmunotransferencias. Se indujo estrés de ER mediante tratamiento con DTT y taspigargina (TG) durante tres horas. Se muestra el corte y empalme no

convencional de XBP1 mediante RT-PCR como indicador de otra rama de UPR activada. XBP1s, XBP1u, XBP1h: ADNc de XBP1 cortado y empalmado, no cortado ni empalmado e híbrido (representando este último heterodímeros de XBP1s/XBP1u).

5 B, resumen esquemático que muestra la conexión entre SMARCB1 y la fosforilación de eIF2alpha.

10 C, se detectan niveles de fosforilación de eIF2alpha aumentados tras tres horas de exposición a TG en la línea de celular de AT/RT humano CHLA2 y las líneas celulares de MRT humano LM (origen de hígado), A-204 (origen de músculo) y G401 (origen de riñón), todas las cuales carecen de SMARCB1, en comparación con líneas celulares de tumor cerebral positivo para SMARCB1 (DAOY, SW1783, Hs683), carcinoma de células renales (786-O, A-498) y carcinoma hepatocelular (HepG2) humanos. Cambio en veces de las intensidades de la señal de eIF2alpha fosforilada normalizada a β -actina entre células tratadas y no tratadas con TSG: CHLA2: 5,89; LM: 1,27; A- 204: 1,39; G401: 2,49; DAOY: 0,77; SW1783: 0,75; Hs683: 0,81; 786-O: 0,60; A-498: 1,12; HepG2: 0,56.

15 D, SMARCB1 está presente en el núcleo de células 786-O y se localiza conjuntamente con el marcador de ER calnexina en el citoplasma.

20 E, el tratamiento de células MCF7 con 10 nM del inhibidor del proteosoma bortezomib (BTZ) durante 12 horas conduce a un aumento de la apoptosis en células con desactivación (kd) de SMARCB1 inducidas con tetraciclina (Tet). Se muestran los porcentajes de células apoptóticas positivas para anexina V y negativas para 7AAD de tres experimentos independientes. Barras de error: error estándar de la media. Valores de p de pruebas de la t para datos independientes que comparan células inducidas con Tet con células no inducidas.

25 F, el tratamiento de células de carcinoma de células renales (786-O, A-498) y de tumor cerebral (SW1783, DAOY), una línea celular de MRT de riñón (G401) y de AT/RT de cerebro (BT12) positivas para SMARCB1 con BTZ 10 nM durante 24 horas conduce a la mayor apoptosis en las células de tumor rabdoide G401 y BT12 en comparación con células tratadas con DMSO (vehículo). Las líneas celulares de tumor cerebral y de riñón se mantuvieron en condiciones de cultivo adherente comparables, respectivamente. Se muestran los porcentajes de células apoptóticas positivas para anexina V y negativas para 7AAD de tres experimentos independientes. Barras de error: error estándar de la media. Valores de p de pruebas de la t para datos independientes que comparan células tratadas con BTZ con células tratadas con DMSO.

Figura 2: Tratamiento con otro inhibidor del proteosoma (carfilzomib)

35 El tratamiento de células de carcinoma de células renales (786-O, A-498) y de tumor cerebral (SW1783), una línea celular de MRT de riñón (G401) y de AT/RT de cerebro (BT12) positivas para SMARCB1 con carfilzomib (CFZ) 30 nM durante 24 horas conduce a la mayor apoptosis en las células de tumor rabdoide G401 y BT12 en comparación con células tratadas con DMSO (vehículo). Las líneas celulares de tumor cerebral y de riñón se mantuvieron en condiciones de cultivo adherente comparables, respectivamente. Se muestran los porcentajes de células apoptóticas positivas para anexina V y negativas para 7AAD de tres experimentos independientes. Barras de error: error estándar de la media. Valores de p de pruebas de la t para datos independientes que comparan células tratadas con BTZ con células tratadas con DMSO.

Ejemplos

Introducción

50 SMARCB1 es un supresor de tumores cuya función se pierde en diversos tipos de tumores, incluyendo tumores rabdoide malignos de diferentes órganos. En la mayoría de estos casos, la inactivación bialélica de SMARCB1 conduce a una pérdida completa de la proteína. Se encontró que niveles de SMARCB1 celulares reducidos estaban asociados con la activación de la respuesta de proteína desplegada. Específicamente, tales células presentan una sensibilidad aumentada hacia la fosforilación de eIF2alpha (subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eucariota 2), un componente central de la respuesta de proteína desplegada.

55 Se ha mostrado que la fosforilación de eIF2alpha sostenida confiere citoprotección frente a la hipoxia, estrés oxidativo y deficiencia de glucosa a largo plazo, todos los cuales representan condiciones *in vivo* típicas de tumores en crecimiento rápido (Bi *et al.*, 2005; Harding *et al.*, 2003; Koumenis *et al.*, 2002; Muaddi *et al.*, 2010; Wiseman y Balch, 2005).

60 Se demuestra que las consecuencias de la pérdida de función de SMARCB1 pueden aprovecharse terapéuticamente: la inhibición de la degradación de proteínas desplegadas por determinados compuestos, incluyendo inhibidores del proteosoma, conduce a un aumento de la apoptosis de células con función de SMARCB1 reducida o perdida. El proteosoma es una enzima multicatalítica que degrada proteínas que están marcadas para su destrucción mediante etiquetas de ubiquitina. La degradación de proteínas puede bloquearse inhibiendo el etiquetado de proteínas con residuos de ubiquitina, modulando la desubiquitinación o inhibiendo la propia actividad del proteosoma.

Materiales y métodos

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se recogieron células al 50-70% de confluencia, se sedimentaron mediante centrifugación y se disolvieron en tampón RIPA (Tris/HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,1%, NaCl 100 mM) complementado con inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM y 1x Complete Mini, Roche). Se recogieron los sobrenadantes, se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo BCA (Pierce/Thermo Scientific) y se separaron las proteínas en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. La inmunotransferencia de tipo Western siguió protocolos convencionales usando membranas de nitrocelulosa (Amersham/GE Healthcare). Se analizaron las intensidades de señal con ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Los anticuerpos usados fueron: anti-BAF47 (SMARCB1/SNF5; BD Biosciences, San Diego, CA), anti-fosfo-eIF2alpha (119A11; Cell Signaling), anti-actina beta-HRP (Abcam, Cambridge, RU).

Cultivo de líneas celulares humanas

Se obtuvo la línea celular CHLA-02-ATRT de la ATCC y se mantuvo en medio de neuroesferas (DMEM/F12 (1:1) con Glutamax, B27, penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml; todos de Invitrogen), HEPES (10 mmol/l), partricina (0,5 µg/ml, Biochrom); insulina (20 µg/ml; Sigma Aldrich), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF; 20 ng/ml) y rhFGFbasic (20 ng/ml; PAN Biotech)). La línea celular de tumor rabdoide maligno humano LM (proporcionada por Rupert Handgrettinger, Tuebingen, Alemania) se mantuvo según Versteeg *et al.* (Nature 1998). Las células de meduloblastoma DAOY (proporcionadas Michael Grotzer, Zúrich, Suiza) se mantuvieron en EMEM (PAA) complementado con FBS al 10% (Biochrom), glutamina 2 mM, penicilina/estreptomycin 100 unidades/ml (Invitrogen) y anfotericina B 2,5 µg/ml (PAA). Las líneas celulares de glioma Hs683 (proporcionadas por Matthias Simon, Bonn, Alemania) se mantuvieron en medio de DAOY con piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales MEM y disolución de vitaminas MEM (todos de Invitrogen). Las células de glioblastoma SW1783 (proporcionadas por Matthias Simon, Bonn, Alemania) y las células de AT/RT BT12 (proporcionadas por Michael Grotzer, Zúrich, Suiza) se mantuvieron en DMEM (glucosa 1 g/l) complementado con FBS al 10% (Biochrom), glutamina 2 mM, penicilina/estreptomycin 100 unidades/ml (Invitrogen) y anfotericina B 2,5 µg/ml (PAA).

Se cultivaron células MCF7-SNF5-KD#73 (Xu *et al.*, 2010) en DMEM (glucosa 4,5 g/l, Invitrogen), FBS al 10% (Tet System Approved, Clontech), glutamina 2 mM y penicilina/estreptomycin 100 unidades/ml (Invitrogen). Para la desactivación de SMARCB1, se añadió tetraciclina (1 µg/ml) en el día 1 y 3, y se recogieron las células en el día 4. En el día 4, se trataron las células con DTT (5 mM) o taspigargina (5 µM). Se mantuvieron las células 786-O y A-498 (ambas de Angelika Toelle, Charité Berlín, Alemania), células HepG2 (de Peter Nilsson-Ehle, Universidad de Lund, Suecia) y G401 (ATCC) en RPM11640 (PAA) complementado con FBS al 10% (Biochrom), glutamina 2 mM, penicilina/estreptomycin 100 unidades/ml (Invitrogen) y anfotericina B 2,5 µg/ml (PAA). Se hicieron crecer A-204 (ATCC) en medio modificado 5a de McCoy complementado con FBS al 10% (Biochrom), penicilina/estreptomycin 100 unidades/ml (Invitrogen) y anfotericina B 2,5 µg/ml (PAA). Se mantuvieron todas las células en frascos de cultivo tisular T75 (Techno Plastic Products).

Inmunofluorescencia

Se trataron cubreobjetos con células unidas con Triton X-100 (al 0,1% en PBS) durante 10 min, se lavaron con PBS tres veces (10 min cada una) y se incubaron con anticuerpos primarios a 4°C durante la noche. Se usó PBS sin anticuerpo primario como control negativo. Antes de una incubación a TA de una hora con anticuerpos secundarios (acoplados a Cy3 (Jackson ImmunoResearch) y Alexa 488 (Invitrogen)), se realizaron tres etapas de lavado de 15 min en PBS seguido por la aplicación de suero de asno al 5% en PBS durante 30 min a TA. Entonces se lavaron las muestras tres veces en PBS (15 min cada una), se enjuagaron brevemente en agua, se deshidrataron en etanol y se secaron al aire. Se usó medio de montaje que contenía tinción nuclear de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-BAF47 (SMARCB1/SNF5; 1:100; BD Biosciences, San Diego, CA), anti-calnexina (1:100; C5C9; Cell Signaling Technology). Se tomaron imágenes de las células sobre los cubreobjetos con un microscopio Axiovert 200M usando el software AxioVision 4.5 (Zeiss).

Ensayo de apoptosis

Se sembraron 500.000 células MCF7-SNF5-KD#73 (Xu *et al.*, 2010) en frascos de cultivo tisular T75 (Techno Plastic Products). Para experimentos de desactivación, se añadió tetraciclina (1 µg/ml) en el día 1 y día 3. En el caso de células tratadas con bortezomib (BTZ), se añadió el fármaco (Santa Cruz Biotechnology, concentración final de 10 nM) durante 12 horas en el día 4 (al 70-85% de confluencia).

De manera similar, se sembraron en placa las células G401, A498, 786-O, BT12, SW1783 y DAOY en placas de 6 pocillos (200.000 células por pocillo) y se hicieron crecer durante 24 horas antes de que se añadiera BTZ 10 nM, carfilzomib 30 nM (CFZ, de Active Biochemicals Co.) o DMSO como control de vehículo a los medios de cultivo celular durante otras 24 horas. Posteriormente, se lavaron cuidadosamente las células con PBS y se disociaron mediante tripsinización. Se tiñeron alícuotas de suspensiones de células individuales que contenían 1×10^5 células en 100 μ l de PBS con anexina V-APC y 7AAD según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences) durante 15 min a TA. Posteriormente, se añadieron 400 μ l de tampón de unión de anexina V (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl_2 2,5 mM), se colocaron las suspensiones celulares sobre hielo y se analizaron inmediatamente con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Se realizó el análisis de datos usando el software FlowJo (Tree Star). Para los análisis estadísticos, se realizó una prueba de la t para datos independientes usando Prism 5.0 (GraphPad).

Resultados

No se ha notificado previamente una implicación de la respuesta de proteína desplegada (UPR) en la biología del tumor rabdoide maligno cerebral y extracerebral. Usando una línea celular de cáncer de mama MCF7, en la que puede inducirse la desactivación de *SMARCB1* mediante tetraciclina (Xu *et al.*, 2010), se encontró un aumento de la fosforilación de eIF2alpha tras la reducción de *SMARCB1* (figura 1A). Se detectaron también niveles de fosforilación de eIF2alpha elevados tras la inducción de estrés de ER mediado por taspigargina en líneas celulares tumorales negativas para *SMARCB1* humanas en comparación con líneas celulares de tumor cerebral positivas para *SMARCB1* humanas (figura 1C).

EIF2alpha es un componente central de una de las tres ramas de UPR y puede fosforilarse por cuatro cinasa diferentes (PERK; GCN2, HRI, PKR) (figura 1B). La reacción inversa, desfosforilación de eIF2alpha, se realiza mediante la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa-1 (PP1c).

Se ha notificado previamente que *SMARCB1* se une a la subunidad catalítica de PP1 (PP1c) y a la subunidad reguladora de PP1 15 (PPP1R15A/GADD34), y se mostró que aumenta la actividad de PP1c en disolución (Wu *et al.*, 2002). Por tanto, una probable explicación del aumento de la fosforilación de eIF2alpha en células con desactivación de *SMARCB1* es una actividad de PP1c disminuida. Las inmunotinciones revelaron que *SMARCB1* no sólo está presente en el núcleo, sino que también se localiza conjuntamente con el marcador de ER calnexina en el citoplasma (figura 1D).

Puesto que se sabe que la fosforilación de eIF2alpha potencia la apoptosis en combinación con la inhibición del proteosoma, se sometió a prueba si la sobreactivación de la rama de eIF2alpha podía aprovecharse terapéuticamente. El tratamiento con el inhibidor del proteosoma bortezomib dio como resultado un aumento de la apoptosis de células con desactivación de MCF7-*SMARCB1*, una línea celular de MRT de riñón y de AT/RT de cerebro en comparación con células control que expresan *SMARCB1* (figura 1E y F). También se detectó un aumento de la apoptosis en la línea de MRT de riñón y AT/RT de cerebro tras el tratamiento con otro inhibidor del proteosoma, carfilzomib (figura 2).

Discusión

Los resultados experimentales sugieren que los niveles reducidos de proteína *SMARCB1*, que se ha mostrado previamente que activa PP1c-GADD34 en disolución (Wu *et al.*, 2002), explica una sensibilidad celular elevada hacia la fosforilación de eIF2alpha, un mecanismo central de UPR (figura 1). En contraposición a la fosforilación de eIF2alpha aguda, que puede ser proapoptótica, se ha mostrado que la fosforilación de eIF2alpha sostenida confiere citoprotección frente a la hipoxia, estrés oxidativo y deficiencia de glucosa a largo plazo, todos los cuales representan condiciones *in vivo* típicas de tumores en crecimiento rápido ((Koumenis *et al.*, 2002); (Harding *et al.*, 2003); (Bi *et al.*, 2005); (Wiseman y Balch, 2005); (Muaddi *et al.*, 2010)). Se muestra en el presente documento que niveles reducidos o ausentes del supresor de tumores *SMARCB1* dan como resultado un estado celular que se caracteriza por una sensibilidad elevada hacia la fosforilación de eIF2alpha. De manera importante, se demuestra que la implicación de *SMARCB1* en la regulación de la UPR puede aprovecharse terapéuticamente: la aplicación de los inhibidores del proteosoma carfilzomib y bortezomib, este último conocido por experimentar sinergia con un inhibidor químico del complejo de GADD34-PP1c (Schewe y Aguirre-Ghiso, 2009), conduce a apoptosis de células con niveles de *SMARCB1* reducidos (figura 1 y 2). Un enfoque de este tipo representa una estrategia novedosa para tratar tumores con función de *SMARCB1* reducida o perdida.

Bibliografía

- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., *et al.* (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. EMBO J 24, 3470-3481.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell 11, 619-633.

- 5 Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., y Wouters, B. G. (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 22, 7405-7416.
- 10 Muaddi, H., Majumder, M., Peidis, P., Papadakis, A. I., Holcik, M., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Hatzoglou, M., y Koromilas, A. E. (2010). Phosphorylation of eIF2alpha at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency. *Mol Biol Cell* 21, 3220-3231.
- 15 Schewe, D. M., y Aguirre-Ghiso, J. A. (2009). Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res* 69, 1545-1552.
- Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M. F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., y Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394, 203-206.
- 20 Wiseman, R. L., y Balch, W. E. (2005). A new pharmacology--drugging stressed folding pathways. *Trends Mol Med* 11, 347-350.
- 25 Wu, D. Y., Tkachuk, D. C., Roberson, R. S., y Schubach, W. H. (2002). The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *J Biol Chem* 277, 27706-27715.
- Xu, Y., Yan, W., y Chen, X. (2010). SNF5, a core component of the SWI/SNF complex, is necessary for p53 expression and cell survival, in part through eIF4E. *Oncogene* 29, 4090-4100.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma para su uso en el tratamiento de cáncer en un paciente, en el que el paciente se ha evaluado para establecer que el cáncer está asociado con células tumorales en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente, lo que significa una expresión reducida o ausente de SMARCB1 en células tumorales en relación con controles positivos internos en muestras de tejido tal como se evalúa al nivel de proteína y/o ARNm, así como la presencia de aberraciones cromosómicas o mutaciones en el ADN o alteraciones epigenéticas.
2. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el paciente tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en tumores rabdoides malignos, tumores teratoides/rabdoides atípicos, sarcomas epitelioides, sarcomas sinoviales, sarcomas indiferenciados sin características rabdoides, condrosarcomas mixoides extraesqueléticos, carcinomas mucinosos del páncreas, tumores malignos de la vaina de nervios periféricos, schwannomas, schwannomatosis familiar y esporádica, tumores neuroepiteliales cribiformes, tumores embrionarios del sistema nervioso central sin características rabdoides, carcinomas del plexo coroideo, teratoma, tumores neuroectodérmicos primitivos, cordomas escasamente diferenciados, linfoma no Hodgkin, y leucemia mieloide crónica, meningioma, glioblastoma, carcinoma mioepitelial, carcinoma del conducto colector.
3. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el paciente tiene, o se sospecha que tiene, cáncer de mama.
4. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente tiene, o se sospecha que tiene, un tumor teratoide-rabdoide atípico (AT/RT) y/o un tumor rabdoide maligno (MRT), un sarcoma indiferenciado con características rabdoides, carcinomas medulares renales o tumores embrionarios del sistema nervioso central con características rabdoides.
5. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación del paciente comprende proporcionar una muestra de células de un paciente y evaluar la actividad funcional de SMARCB1 en la misma.
6. Inhibidor según la reivindicación 5, en el que las células son células cancerosas.
7. Inhibidor para su uso según la reivindicación 5 ó 6, en el que la evaluación de la actividad funcional de SMARCB1 comprende medir la cantidad de proteína SMARCB1, y/o ARNm que codifica para la misma, en las células.
8. Inhibidor para su uso según la reivindicación 7, en el que la evaluación del paciente comprende medir directa o indirectamente la cantidad de ARNm de SMARCB1.
9. Inhibidor para su uso según la reivindicación 5 ó 6, en el que la evaluación de la actividad funcional de SMARCB1 comprende determinar la secuencia de ADNc o ADN genómico de SMARCB1.
10. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la evaluación del paciente comprende además evaluar la actividad funcional de SMARCB1 en una o más muestras control de células, en el que la una o más muestras control de células comprenden muestras control negativo y/o muestras control positivo.
11. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la evaluación del paciente comprende diagnosticar el tipo de cáncer que padece el paciente.
12. Inhibidor para su uso según la reivindicación 11, en el que el inhibidor del proteosoma se selecciona del grupo que consiste en bortezomib, PI-083, MLN 9708, MLN 4924, MLN 519, carfilzomib, ONX 0912, CEP-1877, NPI-0052, BU-32, PR-171, IPSI-001, el polifenol de té verde 3-galato de (-)-epigallocatequina, genisteína de isoflavona de soja y el compuesto de la especia cúrcuma, curcumina.
13. Inhibidor para su uso según la reivindicación 12, en el que el inhibidor del proteosoma es bortezomib.
14. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor es para su administración mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en las vías parenteral, intratumoral, oral, intravenosa, transdérmica e intramuscular.
15. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor del proteosoma es para su administración a una dosis de entre 0,5 y 1,3 mg/m² por dosis.
16. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente también

recibe uno o más tratamientos adicionales para el cáncer seleccionados del grupo que consiste en agentes radioterápicos, quimioterápicos convencionales, compuestos terapéuticos basados en anticuerpos y esteroides.

5 17. Método para seleccionar un agente farmacéutico para tratar cáncer en un paciente, comprendiendo el método:

10 a. determinar si el cáncer presente en un paciente está asociado con células en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente; y
b. cuando se encuentra en la etapa (a) que el cáncer está asociado con células en las que la actividad funcional de SMARCB1 es baja o está ausente, seleccionar un inhibidor del sistema de ubiquitina-proteosoma como agente farmacéutico para tratar cáncer en el paciente.

Figura 1

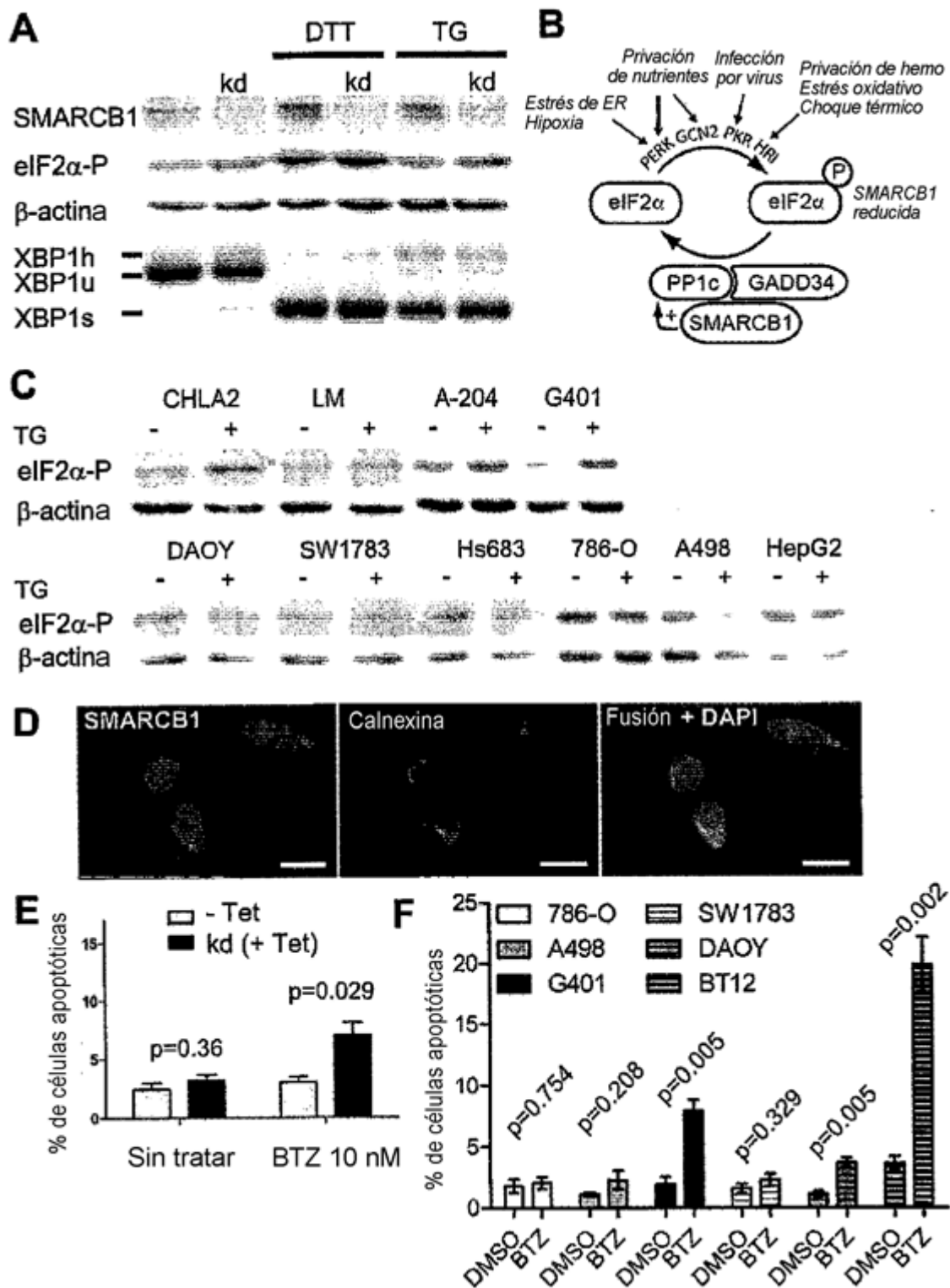


Figura 2

