

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 272**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/706** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/US2012/063382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12844799 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2773360**

54 Título: **Administración de inhibidor de enzimas que activa NEDD8 y agente de hipometilación**

30 Prioridad:  
**03.11.2011 US 201161555049 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.05.2018**

73 Titular/es:  
**MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
40 Landsdowne Street  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:  
**SMITH, PETER G.**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 668 272 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

Administración de inhibidor de enzimas que activa NEDD8 y agente de hipometilación

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/555.049 presentada el 3 de noviembre de 2011.

Se ha mostrado que la inhibición de la enzima que inhibe NEDD8 (NAE) induce la muerte de células cancerosas e inhibe el crecimiento de tumores en modelos de xenoinjerto. Véanse, por ejemplo, T.A. Soucy *et al.*, *Nature*, 2009, 458, 732-737; T.A. Soucy *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15 (12), 3912-3916; y J.E. Brownell *et al.*, *Mol. Cell.*, 2010, 37 (1), 102-111. Informes de estudios clínicos en Fase I de un inhibidor de NAE incluyen R.T. Swords *et al.*, *Blood*, 2010, 115, 3796-3800; J.S. Kauh *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29, resumen 3013; y S. Bhatia *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 2011, 29, resumen 8529. Inhibidores de NAE se describen en las Sol. de Patente de Estados Unidos N.º 11/346.469 (N.º de Publ. 2006/0189636, Patente N.º 7.951.810), N.º 11/700.614 (N.º de Publ. 2007/0191293) y N.º 11/890.338 (N.º de Publ. 2008/0051404, Patente N.º 8.008.307).

La US Food and Drug Administration ha aprobado agentes de hipometilación para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, VIDAZA® (azacitidina para inyección) está indicado para el tratamiento de pacientes con los siguientes subtipos de síndromes mielodisplásicos Francés-Americano-Británico (FAB): anemia refractaria (RA) o anemia refractaria con sideroblastos en anillo (si van acompañadas de neutropenia o trombocitopenia o requieren transfusiones), anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB), anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (RAEB-T), y leucemia mielomonocítica crónica (CMML). DACOGEN® (decitabina para inyección) está indicado para el tratamiento de pacientes con síndromes mielodisplásicos (MDS) que incluyen MDS de novo y secundarios, tratados previamente y sin tratar de todos los subtipos Francés-Americano-Británico (anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, y leucemia mielomonocítica crónica) y grupos intermedio 1, intermedio 2, y de alto riesgo del Sistema Internacional de Puntuación de Pronóstico Internacional.

Por lo general, se busca la dosis más elevada posible (MTD: dosis máxima tolerada) para agentes para el tratamiento del cáncer ya que se cree que el beneficio del tratamiento aumenta con las dosis. Véase, por ejemplo, Y. Lin y W.J. Shih, *Biostatistics*, 2001, 2 (2), 203-215. Una combinación sinérgica de agentes - es decir, una combinación de agentes que es más eficaz que lo que se espera de la eficacia de sus constituyentes, además sin agravar los efectos secundarios del tratamiento - puede proporcionar una oportunidad para ofrecer una eficacia incluso superior de la MTD. Por lo tanto, se puede desear el descubrimiento de combinaciones sinérgicas de agentes anticáncer para tratar pacientes con cáncer de la forma más eficaz, sin saturar al paciente con efectos secundarios.

Meng Wang *et al.*, *Expert Opin. Ther. Targets* 15(3): 253-264, 2011 describe el direccionamiento a la ruta de conjugación de NEDD8 como estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer y las referencias MLN4924 como un inhibidor de esta ruta (un inhibidor de NAE). Garcia-Manero, G., *Current Opinion in Oncology* 20: 705-710, 2008 describe la 5-azacitidina y la decitabina como agentes hipometilantes y su uso en el tratamiento de las neoplasias mieloides.

En la actualidad se ha descubierto que la administración de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo proporcionan un efecto sinérgico. Se encontraron efectos sinérgicos tanto in vitro como in vivo. La sinergia in vitro se midió usando El Índice de Combinación (M.C. Berenbaum, *J. Theor. Biol.*, 1985, 114, 413-431), tal como se analiza con más detalle a continuación. La sinergia in vivo se midió de acuerdo con un método sinérgico de supervivencia o con un método sinérgico de crecimiento tumoral, tal como se analiza con más detalle a continuación. La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. La materia objeto que no se abarca por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada en el presente documento.

Al menos un aspecto de la presente divulgación se refiere a un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración en combinación con un agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato o {(1S,2S,4R)-4-[(6-[[1R,2S]-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]amino]pirimidin-4-il)oxi]-2-hidroxiciclopentil}metil sulfamato, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es azacitidina o decitabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Al menos un aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto en reconocida necesidad del mismo, comprendiendo el kit al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, e instrucciones para la administración de los medicamentos, en donde el inhibidor de NAE o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es ((1S,2S,4R)-4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]-pirimidin-7-il)-2-hidroxyciclopentil)metil sulfamato o ((1S,2S,4R)-4-((6-((1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)amino)pirimidin-4-il)oxi)-2-hidroxyciclopentil)metil sulfamato, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es azacitidina o decitabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Adicionalmente, por ejemplo, el kit puede comprender activos antineoplásicos que consisten en al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un agente antimetilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; comprendiendo adicionalmente dicho kit para el tratamiento del cáncer instrucciones de dosificación para la administración de los medicamentos para el tratamiento del sujeto en reconocida necesidad del mismo.

#### Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestran los valores del Índice de Combinación para los inhibidores de NAE MLN4924 e I-216, cada uno separadamente en combinación con azacitidina o decitabina en líneas celulares HL60, OCIM2, NB4 y THP-1.

La FIG. 2 muestra una representación del volumen tumoral como una función del tiempo en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de HL-60 después del tratamiento subcutáneo con: el vehículo solo, MLN4924 como un agente único, azacitidina ("Aza") como un agente único, y coadministración (s.c.) de MLN4924 y azacitidina, los Días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 en las dosis indicadas.

La FIG. 3 muestra una representación del volumen tumoral como una función del tiempo en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de THP-1 después del tratamiento subcutáneo con: el vehículo solo, MLN4924 como un agente único, azacitidina ("Aza") como un agente único, y coadministración (s.c.) de MLN4924 y azacitidina, los Días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 en las dosis indicadas.

La FIG. 4 muestra una representación del volumen tumoral como una función del tiempo en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de OCI-M2 después del tratamiento subcutáneo con: el vehículo solo, MLN4924 como un agente único, azacitidina ("Aza") como un agente único, y coadministración (s.c.) de MLN4924 y azacitidina, los Días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 en las dosis indicadas.

La FIG 5 muestra una representación del porcentaje de supervivencia como una función del tiempo en un modelo diseminado de HL60 después del tratamiento subcutáneo con: el vehículo solo, MLN4924 como un agente único, azacitidina ("AzaC") como un agente único, y coadministración (s.c.) de MLN4924 y azacitidina los Días 22, 25, 29, 32, 36, 39 en las dosis indicadas.

En el presente documento, se pueden usar las siguientes definiciones y abreviaturas:

ALP	fosfatasa alcalina
ALT	alanina aminotransferasa
AML	leucemia mielógena aguda
ANC	recuento de neutrófilos absoluto
AST	aspartato aminotransferasa
AUC	área bajo la curva de concentración de plasma frente al tiempo
BSA	área de superficie corporal
CR	respuesta completa
CRM	método de reevaluación continua
CYP	citocromo P450
DLBCL	linfoma de linfocitos B grandes difusos
DLT	toxicidad limitante de dosis
LFT	ensayos de función hepática
LVEF	fracción de eyección ventricular izquierda
MDS	síndromes mielodisplásicos
MM	mieloma múltiple
MTD	dosis máxima tolerada
NAE	enzima activadora de Nedd8
NEDD8	células precursoras neurales 8 expresadas reguladas negativamente en el desarrollo
PASP	presión sistólica de la arteria pulmonar
PR	respuesta parcial
QD	una vez al día
SCLC	cáncer de pulmón de células pequeñas

Tal como se usa en el presente documento, "toxicidad que limita la dosis" (DLT) se define como un suceso negativo que el médico que administra considera que está relacionado con la terapia con MLN4924 de modo que el médico que administra cree que las dosis se deberían limitar en cantidad o detener en conjunto. Los ejemplos de dichos sucesos incluyen:

- Neutropenia de grado 4 (ANC < 500 células/mm<sup>3</sup>) que dura más de 7 días consecutivos

- Neutropenia de grado 3 con fiebre y/o infección, en la que la fiebre se define como una temperatura oral  $\geq 38,5$  °C
  - Trombocitopenia de grado 4 (plaquetas  $< 25.000/mm^3$  pero  $> 10.000/mm^3$ ) que dura más de 7 días consecutivos
- 5
- Trombocitopenia de grado 3 con sangrado
  - Un recuento de plaquetas  $< 10.000/mm^3$  en cualquier momento
- 10
- Náuseas y/o emesis de grado 3 o superior a pesar del uso de profilaxis óptima con antieméticos (en las que "profilaxis óptima con antieméticos" se define como un régimen con antieméticos que usa un antagonista de 5-HT<sub>3</sub> administrado en dosis convencionales y de acuerdo con programas convencionales). La dexametasona no se debería usar debido a sus efectos de inducción de CYP3A.
- 15
- Diarrea de grado 3 o superior que se produce a pesar de la terapia de apoyo máximo
  - Una reducción absoluta en LVEF de  $\geq 10$  % a un valor  $< 50$  % (por ejemplo, LVEF = 45 % en un paciente con LVEF = 55 % en la medida inicial)
- 20
- Una disminución en LVEF a  $< 40$  %
  - Una disminución en PASP a  $> 50$  mm de Hg o 3 x la medida inicial
  - Cualquier otra toxicidad no hematológica de grado 3 o superior con las siguientes excepciones:
- 25
- Artralgia/mialgia de grado 3
  - Fatiga breve de grado 3 ( $< 1$  semana)
  - Fiebre de grado 3 que se produce en ausencia de neutropenia del grado 3 o más grave o infección documentada después de la administración diaria de MLN4924
- 30
- Retraso en el tratamiento de más de una 1 semana debido a una falta de recuperación adecuada de las toxicidades hematológicas o no hematológicas relacionadas con MLN4924
- 35
- Toxicidad relacionada con MLN4924 que requiere que cualquier dosis de MLN4924 se pierda durante un ciclo o discontinuidad en la terapia con MLN4924

Tal como se usa en el presente documento, "cantidad clínicamente eficaz" y "terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia terapéutica que es suficiente después de la administración apropiada durante un periodo de tiempo apropiado a un paciente (a) para causar una disminución detectable en la gravedad del trastorno o estado de enfermedad que se está tratando; (b) para mejorar o aliviar los síntomas de la enfermedad o trastorno en el paciente; o (c) para ralentizar o evitar el avance, o estabilizar de otro modo o prolongar la estabilización del trastorno o estado de enfermedad que se está tratando (por ejemplo, para evitar el crecimiento tumoral adicional o inhibir el crecimiento celular de un cáncer).

45

Cuando se está administrando más de una sustancia terapéutica, la "cantidad total clínicamente eficaz" o "cantidad total terapéuticamente eficaz" se refiere a que la suma de las cantidades individuales de cada sustancia terapéutica coincide con la definición de "cantidad clínicamente eficaz" incluso si las cantidades individuales de cualquier número de las sustancias terapéuticas individuales no lo hace. Por ejemplo, si 10 mg de A no fue una cantidad clínicamente eficaz, y 20 mg de B no fue una cantidad clínicamente eficaz, pero la administración de 10 mg de A + 20 mg de B dio como resultado al menos uno de los resultados que se enumeran para la definición de "cantidad clínicamente eficaz", entonces la suma de 10 mg de A + 20 mg de B se consideraría una "cantidad total clínicamente eficaz".

55

En cualquier forma o composición, la dosis o dosis administradas o la cantidad (total) clínicamente eficaz pueden expresarse como cantidad o cantidades de sustancia o sustancias terapéuticas por BSA del paciente, por ejemplo, como mg/m<sup>2</sup>.

60

Tal como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a un ser humano diagnosticado con, que presenta síntomas o que de otro modo se cree que está afectado con una enfermedad, trastorno o afección y por lo tanto con necesidad reconocida del tratamiento que se describe en el presente documento.

65

Tal como se usa en el presente documento, los términos ilustrativos "incluyen", "tales como", "por ejemplo" y similares (y variaciones de los mismos, por ejemplo, "incluye" y "que incluye", "ejemplos"), a menos que se indique de otro modo, no pretenden ser limitantes. Es decir, a menos que se indique explícitamente de otro modo, dichos

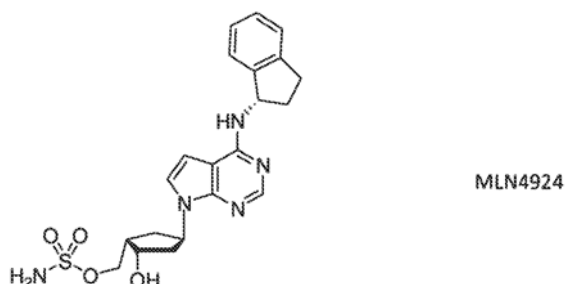
términos pretenden implicar "pero no estar limitados a", por ejemplo, "que incluye" significa que incluye pero no se limita a.

5 Tal como se usa en el presente documento, el "área de superficie corporal" (BSA) se calcula usando un nomograma convencional, por ejemplo,

$$BSA (m^2) = \sqrt{\frac{H (cm) \times P (kg)}{3600}} \quad \circ \quad BSA = \sqrt{\frac{H (in) \times P (lb)}{3131}}$$

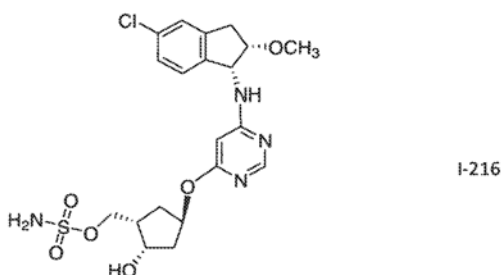
Sustancias Terapéuticas - inhibidores de NAE.

10 Se ha indicado que el compuesto sulfamato de ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metilo:



15 también conocido como MLN4924, es un inhibidor de la enzima que activa NEDD8 (NAE). Véase, por ejemplo, T.A. Soucy *et al.*, *Nature*, 2009, 458, 732-737; T.A. Soucy *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15 (12), 3912-3916; y J.E. Brownell *et al.*, *Mol. Cell.*, 2010, 37 (1), 102-111. Tal como se ha analizado anteriormente, se han descrito anteriormente MLN4924, sales farmacéuticas aceptables del mismo, composiciones farmacéuticas de MLN4924 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, procesos para síntesis, y formas polimórficas del mismo. Véanse, por ejemplo, Solicitudes de Patente de Estados Unidos N.º 11/700.614 (Publ. N.º 2007/0191293), N.º 12/221.399 (Publ. N.º 2009/0036678) y N.º 12/779.331 (Publ. N.º 2011/0021544). La Sustancia Fármaco MLN4924 ("MLN4924-DS") es la sal de clorhidrato de MLN4924, es decir, clorhidrato de sulfamato de ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metilo.

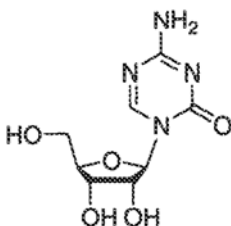
25 Además, se ha indicado que el compuesto sulfamato de ((1S,2S,4R)-4-((6-((1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)amino)pirimidin-4-il)oxi]-2-hidroxiciclopentil)metilo:



30 también conocido como I-216, es un inhibidor de NAE. Véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 13/592.389, presentada el 23 de agosto de 2012, que reivindica la prioridad de la Sol. de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/526.830, presentada el 24 de agosto de 2011.

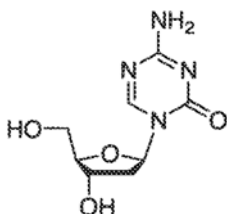
Sustancias Terapéuticas - Agentes de Hipometilación.

35 La azacitidina es 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-s-triazin-2(1H)-ona (nombre IUPAC: 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona):



5 Tal como se ha analizado anteriormente, VIDAZA® (azacitidina para inyección, Celgene Corporation (Summit, NJ); VIDAZA® es una marca comercial registrada de Celgene Corporation) está indicado y aprobado por la FDA de Estados Unidos para el tratamiento de pacientes con los siguientes subtipos de síndromes mielodisplásicos Francés-Americano-Británico (FAB): anemia refractaria (RA) o anemia refractaria con sideroblastos en anillo (si van acompañadas de neutropenia o trombocitopenia o requieren transfusiones), anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB), anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (RAEB-T), y leucemia mielomonocítica crónica (CMML). La información de la prescripción completa para VIDAZA® está disponible en el prospecto comercial.

10 La decitabina es 4-amino-1-(2-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona:



15 DACOGEN® (decitabina para inyección, Eisai, Inc., Woodcliff Lake, NJ; DACOGEN® es una marca comercial registrada de SuperGen, Inc., Dublín, CA) está indicado y aprobado por la FDA de Estados Unidos para el tratamiento de pacientes con síndromes mielodisplásicos (MDS) que incluyen MDS *de novo* y secundarios, tratados previamente y sin tratar de todos los subtipos Francés-Americano-Británico (anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, y leucemia mielomonocítica crónica) y grupos intermedio 1, intermedio 2, y de alto riesgo del Sistema Internacional de Puntuación de Pronóstico Internacional. La información de la prescripción completa para DACOGEN® está disponible en el prospecto comercial.

#### 25 Administración del Compuesto

En la actualidad se ha descubierto que la administración de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden proporcionar un efecto sinérgico.

30 El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (NAEi) se puede administrar en combinación con el agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (HMA) en una forma de dosificación individual o como una forma de dosificación separada. Cuando se administra como una forma de dosificación separada, el agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar antes de, al mismo tiempo que, o después de la administración del inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal como se usa en el presente documento, la administración en "combinación" de NAEi y HMA se refiere no solamente a la administración simultánea o secuencial de los dos agentes, sino también a la administración de ambos compuestos durante un solo ciclo de tratamiento, tal como lo entiende un experto en la materia.

40 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (NAEi) y un agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (HMA) de acuerdo con un ciclo de 28 días tal como sigue a continuación: administrar NAEi los Días 1, 4, 8 y 11; y administrar HMA los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9. Opcionalmente, el primer ciclo es de 35 días con administración de NAEi los Días 1, 4, 11 y 15 y administración de HMA los Días 8, 9, 10, 11, 12, 15 y 16, con ciclos posteriores de 28 días tal como se ha descrito en la frase anterior.

50 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (NAEi) y un agente de hipometilación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (HMA) de acuerdo con un ciclo de 28 días tal como sigue a continuación: administrar NAEi los Días 1, 3, y 5; y administrar HMA los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8 y

9. Opcionalmente, el primer ciclo es de 35 días con administración de NAEi los Días 1, 3, y 5 y administración de HMA los Días 8, 9, 10, 11, 12, 15 y 16, con ciclos posteriores de 28 días tal como se ha descrito en la frase anterior.

5 En diversas realizaciones, el NAEi puede ser sulfamato de ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxyciclopentil)metilo ("MLN4924") o sulfamato de {(1S,2S,4R)-4-[(6-[[[(1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]amino]pirimidin-4-il]oxi]-2-hidroxyciclopentil}metilo ("I-216"). En al menos una realización, el NAEi es MLN4924. En al menos una realización, el NAEi es I-216.

10 En diversas realizaciones, el HMA puede ser azacitidina o decitabina. En al menos una realización, el HMA es azacitidina. En al menos una realización, el HMA es decitabina.

15 En diversas realizaciones, MLN4924 se administra en combinación con azacitidina. En diversas realizaciones, MLN4924 se administra en combinación con decitabina. En diversas realizaciones, I-216 se administra en combinación con azacitidina. En diversas realizaciones, I-216 se administra en combinación con decitabina.

En diversas realizaciones, el NAEi se administra a una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 40 mg/m<sup>2</sup>, 45 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup> o 75 mg/m<sup>2</sup>. En diversas realizaciones, el HMA se administra a una dosis de aproximadamente 75 mg/m<sup>2</sup>.

20 En diversas realizaciones, el NAEi se administra por vía intravenosa. En diversas realizaciones, el NAEi se administra por vía oral. En diversas realizaciones, el NAEi se administra por vía subcutánea. En diversas realizaciones, el HMA se administra por vía intravenosa o por vía subcutánea.

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de un NAEi y de un agente de hipometilación HMA de acuerdo con un ciclo de 28 días tal como sigue a continuación: administrar el NAEi los Días 1, 4, 8 y 11; y administrar HMA los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9; en el que el NAEi es MLN4924 y HMA es azacitidina; en el que MLN4924 se administra por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 40 mg/m<sup>2</sup>, 45 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup> o 75 mg/m<sup>2</sup>; en el que la azacitidina se administra a una dosis de aproximadamente 75 mg/m<sup>2</sup>; y en el que el cáncer es una neoplasia hematológica. En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es leucemia mieloide aguda (AML) o síndromes mielodisplásicos (MDS). En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es AML. En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es MDS.

35 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de un NAEi y de un agente de hipometilación HMA de acuerdo con un ciclo de 28 días tal como sigue a continuación: administrar el NAEi los Días 1, 3, y 5; y administrar HMA los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9; en el que el NAEi es MLN4924 y HMA es azacitidina; en el que MLN4924 se administra por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 40 mg/m<sup>2</sup>, 45 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup> o 75 mg/m<sup>2</sup>; en el que la azacitidina se administra a una dosis de aproximadamente 75 mg/m<sup>2</sup>; y en el que el cáncer es una neoplasia hematológica. En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es leucemia mieloide aguda (AML) o síndromes mielodisplásicos (MDS). En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es AML. En diversas realizaciones, la neoplasia hematológica es MDS.

45 Sustancia Terapéutica; Composiciones Farmacéuticas.

La sustancia terapéutica puede ser una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, dichas sales derivan de ácidos o bases, inorgánicos u orgánicos. Para revisiones de sales adecuadas, véanse, por ejemplo, Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19 y *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> Ed., A. Gennaro (ed.), Lippincott Williams y Wilkins (2000).

50 Los ejemplos de sales de adición ácida adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benceno sulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanfor sulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, lucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato.

60 Los ejemplos de sales de adición básica adecuadas incluyen sales de amonio; sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio y de potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y de magnesio; sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitclohexilamina, *N*-metil-D-glucamina; y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, y similares.

65 Por ejemplo, Berge enumera las siguientes sales comercializadas en el mercado aprobadas por la FDA: aniones acetato, besilato (bencenosulfonato), benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio (etilendiamintetraacetato), camsilato (alcanforsulfonato), carbonato, cloruro, citrato, clorhidrato, edetato (etilendiamintetraacetato), edisilato (1,2-etanodisulfonato), estolato (sulfato de laurilo), esilato (etanosulfonato),

5 fumarato, gluceptato (glucoheptonato), gluconato, glutamato, glicolilarsanilato (glicolamidofenilarsonato), hexilresorcinato, hidrabamina (*N,N'*-di(deshidrobietil)etilendiamina), bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato (2-hidroxietanosulfonato), lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato (metanosulfonato), bromuro de metilo, nitrato de metilo, metilsulfato, mucato, napsilato (2-naftalenosulfonato), nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato (8-cloroteofilinato) y yoduro de trietilo; cationes orgánicos de benzatina (*N,N'*-dibenciletilendiamina), cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (*N*-metilglucamina) y procaína; y cationes metálicos de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc.

10 Berge enumera adicionalmente las siguientes sales comercializadas en el mercado no aprobadas por la FDA (fuera de los Estados Unidos): aniones adipato, alginato, aminosalicilato, citrato de anhidrometileno, arecolina, aspartato, bisulfato, bromuro de butilo, alcanforato, digluconato, dibromhidrato, disuccinato, glicerofosfato, hemisulfato, hidrofuro, yodhidrato, metilenobis(salicilato), napadisilato (1,5-naftalenodisulfonato), oxalato pectinato, persulfato, feniletilbarbiturato, picrato, propionato, tiocianato, tosilato y undecanoato; cationes orgánicos de benetamina (15 (*N*-bencilfenetilamina), clemizol (1-*p*-clorobencil-2-pirrolidina-1'-ilmetilbenzoimidazol), dietilamina, piperazina y trometamina (tris(hidroximetil)aminometano); y cationes metálicos de bario y de bismuto.

20 Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que es compatible con un sujeto receptor (un mamífero, por ejemplo un ser humano) y es adecuado para administrar un agente activo al sitio diana sin finalizar la actividad del agente. La toxicidad por los efectos adversos, si los hubiera, asociados con el vehículo son, por ejemplo, acordes con una relación razonable de riesgo/beneficio para el uso pretendido del agente activo.

25 Las composiciones farmacéuticas para uso en los métodos de la presente divulgación se pueden preparar mediante métodos tales como procesos de granulación, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización, o emulsión convencionales, entre otros. Las composiciones se pueden producir en diversas formas, que incluyen gránulos, precipitados, o partículas, polvos, que incluyen polvos liofilizados, secados por rotación o secados por pulverización, polvos amorfos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las formulaciones pueden contener estabilizantes, modificadores del pH, tensioactivos, agentes de solubilización, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de los mismos.

35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en estas composiciones incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos o carbonatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

40 Estas composiciones farmacéuticas se formulan para la administración farmacéutica a un mamífero, tal como un ser humano. Dichas composiciones se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante pulverización por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal, o a través de un depósito implantado. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o de infusión subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral, por vía intravenosa, o por vía subcutánea. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía intravenosa. Estas formulaciones se pueden diseñar para que sean de actuación corta, de liberación rápida, o de acción prolongada. Además, las composiciones se pueden administrar con medios locales en lugar de sistémicos, tales como administración (por ejemplo, por 50 inyección) a un sitio tumoral.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido, tal como en forma de un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de los mismos. Se pueden incluir agentes de solubilización tales como ciclodextrinas. Se pueden añadir tensioactivos, agentes de suspensión, o agentes de emulsión farmacéuticamente adecuados, para administración oral o parenteral. Las suspensiones pueden incluir aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. Las preparaciones en suspensión también pueden contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como etanol, alcohol isopropílico, alcohol de hexadecilo, glicerol y propilenglicol; éteres, tales como poli(etilenglicol); hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y vaselina; y agua.

65 Las formas inyectables estériles de estas composiciones farmacéuticas pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la materia usando agentes de dispersión o de humectación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no



tóxico, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes ilustrativos que se pueden usar están el agua, Solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se usan aceites fijos, estériles como un medio de disolvente o de suspensión. Con este fin, se puede usar cualquier aceite fijo blando que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, por ejemplo en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares que se usan normalmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones.

Otros tensioactivos usados normalmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan normalmente en la preparación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas o de otro tipo que también se pueden usar para los fines de la formulación. Los compuestos se pueden formular para administración parenteral por inyección tal como mediante inyección en bolo o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede ser en ampollas o en envases de dosis múltiples.

Por ejemplo, en diversas realizaciones de la presente divulgación, el NAEi es el Producto de Fármaco para Inyección MLN4924 ("MLN4924-IDP"). MLN4924-IDP se formula con los siguientes excipientes: ácido cítrico; hidróxido sódico; Sulfobutiléteres Ciclodextrinas, Sales de Sodio (Captisol®); y agua para inyección. En al menos una realización, MLN4924-IDP consiste en 10 mg/ml de MLN4924 (en forma de la base libre) en una solución que contiene tampón citrato 50 mM y 100 mg/ml de sulfobutiléter β-ciclodextrina, pH 3,3.

MLN4924-IDP ha experimentado problemas de estabilidad cuando se diluye en solución salina. MLN4924-IDP se puede usar para la duración del período de reanálisis indicado en el Certificado de Análisis. En la práctica, MLN4924-IDP se ha almacenado en refrigeración a 5 °C ± 3 °C. Cada vial de vidrio de Tipo I contiene en concreto 5 ml de solución estéril elaborada, cerrado herméticamente con un tapón de goma de butilo revestido con Teflon® y cerrado herméticamente por encima con un cierre de aluminio con un tapón de plástico Flip-Off®.

En diversas realizaciones de la presente divulgación, el HMA es azacitidina. La azacitidina es VIDAZA® disponible en el mercado (azacitidina para inyección), que se suministra en forma de polvo liofilizado en viales de un solo uso de 100 mg. Consultar el prospecto de VIDAZA® para información adicional.

Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se puede combinar con agentes de emulsión y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan normalmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Además, por lo general se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Los revestimientos se pueden usar para una diversidad de fines, por ejemplo, para enmascarar el sabor, para afectar al sitio de disolución o de absorción, o para prolongar la acción del fármaco. Los revestimientos se pueden aplicar a un comprimido o a partículas granuladas para su uso en una cápsula.

Como alternativa, estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Estas composiciones farmacéuticas también se pueden administrar por vía tópica, por ejemplo cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede realizar en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación adecuada de enema. Además, se pueden usar parches transdérmicos por vía tópica. Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente divulgación incluyen aceite mineral, vaselina líquida, vaselina de color blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contiene el componente o componentes activos suspendidos o disueltos en al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados incluyen aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol de cetearilo, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril con pH ajustado, isotónica, o, por ejemplo, en forma de soluciones en solución salina estéril con pH ajustado, isotónica, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar mediante aerosol o inhalación nasal. Dichas composiciones se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas en la materia de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, que usa alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes de solubilización o dispersión convencionales adecuados.

Los métodos que se desvelan en el presente documento se pueden usar para tratar enfermedades, trastornos, y afecciones en los que la inhibición de la actividad enzimática de NAE es perjudicial para la supervivencia y/o expansión de células o tejidos enfermos (por ejemplo, las células son sensibles a la inhibición de NAE; la inhibición de la actividad de NAE interrumpe los mecanismos de la enfermedad; la reducción de la actividad de NAE estabiliza proteínas que son inhibidoras de mecanismos de la enfermedad; la reducción de la actividad de NAE da como resultado la inhibición de proteínas que son activadores de mecanismos de la enfermedad). Las enfermedades, trastornos y afecciones también pueden incluir los que requieren actividad de culina y/o ubiquitinación eficaz, cuya actividad se puede regular mediante la disminución de la actividad enzimática de NAE.

Por ejemplo, los métodos que se desvelan en el presente documento pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos que implican proliferación celular, incluyendo trastornos que requieren una ubiquitinación eficaz dependiente de culinas y ruta de proteólisis (por ejemplo, las rutas de proteasoma y ubiquitina) para el mantenimiento y/o la progresión del estado de enfermedad. Los métodos de la presente divulgación pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos mediados a través de proteínas (por ejemplo, activación de NFκB, activación de p27<sup>Kip</sup>, activación de p21<sup>WAF/CIP1</sup>, activación de p53) que se regulan mediante la actividad de NAE. Los trastornos representativos incluyen trastornos proliferativos, los más notables cánceres y trastornos inflamatorios (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteoartritis, dermatosis (por ejemplo, dermatitis atópica, psoriasis), trastornos proliferativos vasculares (por ejemplo, aterosclerosis, reestenosis) enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, rechazo a tejidos y órganos)); así como inflamación asociada con infección (por ejemplo, respuestas inmunes), trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de neuronas motoras, dolor neuropático, trastornos por repetición de tripletes, astrocitoma, y neurodegeneración como resultado de enfermedad hepática por alcohol), lesión isquémica (por ejemplo, apoplejía), y caquexia (por ejemplo, degradación acelerada de proteínas musculares que acompaña a diversos estados fisiológicos y patológicos, (por ejemplo, lesión nerviosa, ayuno, fiebre, acidosis, infección por VIH, sufrimiento por cáncer, y determinadas endocrinopatías)).

Los métodos que se desvelan en el presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a un trastorno celular caracterizado por la proliferación celular incontrolada o desregulada, la diferenciación celular disminuida, la capacidad inapropiada para invadir tejidos circundantes, y/o la capacidad para establecer un nuevo crecimiento en sitios ectópicos. El término "cáncer" incluye tumores sólidos y tumores de transmisión sanguínea. El término "cáncer" incluye enfermedades de la piel, tejidos, órganos, hueso, cartílago, sangre, y vasos sanguíneos. El término "cáncer" incluye adicionalmente cánceres primarios y metastásicos.

En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido. Los ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar con los métodos de la presente divulgación incluyen cáncer pancreático; cáncer de vejiga; cáncer colorrectal; cáncer de mama, incluyendo cáncer de mama metastásico; cáncer de próstata, incluyendo cáncer de próstata dependiente de andrógenos e independiente de andrógenos; cáncer renal, incluyendo, por ejemplo, carcinoma metastásico de células renales; cáncer hepatocelular; cáncer de pulmón, que incluye, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma bronquioloalveolar (BAC), y adenocarcinoma del pulmón; cáncer de ovarios, que incluye, por ejemplo, cáncer peritoneal progresivo epitelial o primario; cáncer de cuello uterino; cáncer gástrico; cáncer de esófago; cáncer de cabeza y cuello, que incluye, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la cabeza y del cuello; melanoma; cáncer neuroendocrino, que incluye tumores neuroendocrinos metastásicos; tumores cerebrales, que incluyen, por ejemplo, glioma, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma multiforme en adultos, y astrocitoma anaplásico en adultos; cáncer de huesos; y sarcoma de tejidos blandos.

En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia hematológica. Los ejemplos de neoplasias hematológicas incluyen leucemia mieloide aguda (AML); leucemia mielógena crónica (CML), que incluye fase acelerada de blastos CML y CML (CML-BP); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL); Enfermedad de Hodgkin (HD); linfoma no Hodgkin (NHL), que incluye linfoma folicular y linfoma de células del manto; linfoma de linfocitos B; linfoma de linfocitos T; mieloma múltiple (MM); macroglobulinemia de Waldenstrom; síndromes mielodisplásicos (MDS), que incluyen anemia refractaria (RA), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS),

(anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB), y RAEB en transformación (RAEB-T); y síndromes mieloproliferativos.

5 En algunas realizaciones, un médico puede diagnosticar a un paciente con cáncer como de un tipo predominantemente. En algunas realizaciones, un médico puede diagnosticar que un paciente tiene más de un tipo de cáncer. En algunas realizaciones, el diagnóstico es predominantemente un tipo de síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones, el diagnóstico es más de un tipo de síndrome mielodisplásico.

10 En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación se usan para tratar a un paciente que tiene, o que está en riesgo de desarrollar o de experimentar, una recurrencia en un cáncer tumoral, tal como cáncer colorrectal, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer pancreático. En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación se usan para tratar a un paciente que tiene, o que está en riesgo de desarrollar o de experimentar, una recurrencia en un cáncer hematológico, tal como AML, CML, CML-BP, ALL, o CLL.

15 Con el fin de que la presente divulgación se entienda más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos solamente son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación de ningún modo.

20 **Ejemplos**

1. Ensayos de Viabilidad Celular *in vitro*

25 El protocolo experimental usó en placas de 384 pocillos Negra/Transparente BioCoat™ de Poli-D-lisina (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). El inhibidor de NAE apropiado se disolvió en DMSO y se repartió en los pocillos usando un sistema de manipulación de líquidos Echo (Labcyte, Sunnyvale, CA). Se obtuvieron líneas de HL60 y THP-1 a partir de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA), mientras que se obtuvieron líneas de NB4 y OCI-M2 a partir de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Brunswick, Alemania). Cada placa tenía una suspensión celular de una de las líneas añadidas a los pocillos. Una parte de los pocillos se usó como control positivo (no se añadió compuesto), mientras que otra parte de los pocillos se usó como control negativo (no se añadieron células). Las placas se incubaron durante 72 horas, y a continuación se midieron las viabilidades celulares usando un ensayo de ATPlite (PerkinElmer, Waltham, MA).

35 Análisis Estadístico.

*Normalización.* Los datos de viabilidad se normalizaron separadamente para cada placa ajustando los datos de modo que la media de los controles negativos fuera 0 y la media de los controles positivos fuera 100. Más formalmente,

40 
$$V_i = 100 \frac{U_i - \text{media}(U_-)}{\text{media}(U_+) - \text{media}(U_-)}$$

en la que  $V_i$  es la viabilidad normalizada del  $i^{\circ}$  pocillo,  $U_i$  es la medida de la viabilidad sin procesar,  $\text{media}(U_-)$  es la media de los controles negativos, y  $\text{media}(U_+)$  es la media de los controles positivos. Después de la normalización, los controles se descartaron.

45 *Modelo de respuesta superficial y ajuste.* Se usó un modelo de respuesta superficial para describir la relación entre la viabilidad normalizada y las concentraciones de fármaco. Para una placa dada, establecer

50 
$$C = (C_A / I_1) + (C_B / I_2)$$

$$x = (C_A / I_1) / C$$

$$E_{\text{máx}} = E_1 + E_2 x + E_3 x^2 + E_4 x^3$$

55 
$$I = 1 + I_3 x(1 - x)$$

$$S = S_1 + S_2 x + S_3 x^2 + S_4 x^3$$

$$V = 100 - E_{\text{máx}}(1 + (I/C)^5)^{-1} + \text{error}$$

en las que  $E_1, E_2, E_3, E_4, I_1, I_2, I_3, S_1, S_2, S_3,$  y  $S_4$  son parámetros,  $C_A$  y  $C_B$  son las concentraciones respectivas de los fármacos A y B, y  $V$  es la medida de la viabilidad normalizada. Se supuso que los valores de error eran independientes y variables aleatorias normales distribuidas idénticamente. Este modelo es una extensión de la ecuación de Hill (A.V. Hill, *J. Physiol.*, 1910, 40, iv-vii), que se usa normalmente para modelar el efecto de un solo fármaco. Los datos se ajustaron a este modelo usando el método de probabilidad máxima con el programa de software estadístico R de R Development Core Team (2008) (R: Un lenguaje y entorno para cálculo estadístico. R Fundación para Cálculo Estadístico, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>).

**Controles de calidad.** Se aplicaron tres tipos de controles de calidad a las placas. En primer lugar, se comprobó que la variación de los controles positivos y la media de los controles negativos eran pequeñas. A continuación, se comprobó que los nuevos datos concordaban con los datos de los experimentos anteriores de un solo fármaco. Finalmente, los restos del ajuste de respuesta superficial se analizaron para asegurar que la suma residual de los cuadrados era lo suficientemente pequeña. Todos estos controles de calidad se hicieron en base a umbrales numéricos para tomar decisiones de aceptar/rechazar, y los mismos umbrales se usaron para todas las placas en el experimento. Si una placa fallaba en uno cualquiera de los controles de calidad, se retiraba del análisis.

**Medida de sinergia in vitro.** El Índice de Combinación (M.C. Berenbaum, *J. Theor. Biol.*, 1985, 114, 413-431) se usó como una medida de sinergia del fármaco. El Índice de Combinación se calcula en base a un isoblograma, que es una parte de la superficie de respuesta a la dosis con viabilidad constante. Para el presente análisis, se usó el isoblograma de un 50 %, que es el contorno de dosis que tiene una viabilidad de un 50 %. La  $CE_{50A}$  y la  $CE_{50B}$  se definen como las dosis respectivas de los fármacos A y B solos que tienen una viabilidad de un 50 %. Para un punto ( $D_A, D_B$ ) a lo largo de un isoblograma de un 50 %, el Índice de Combinación se define como  $(D_A / CE_{50A}) + (D_B / CE_{50B})$ . Dado que la elección de ( $D_A, D_B$ ) puede ser arbitraria, se usó la restricción  $D_A / D_B = CE_{50A} / CE_{50B}$ . Si el Índice de Combinación es menor que 1, esto indica que el isoblograma se curva hacia el interior, y que la combinación de fármaco es sinérgica. A la inversa, si el Índice de Combinación es mayor que 1, el isoblograma de un 50 % se curva hacia el exterior, lo que indica antagonismo. En el método de análisis más estricto aplicado de acuerdo con la presente divulgación, los valores del Índice de Combinación dentro del intervalo de 0,8-1,2 se consideran aditivos. Esta regla evita que desviaciones pequeñas de la adición se clasifiquen como sinérgicas.

Un ensayo de t de dos lados para cada condición se realizó para determinar si el Índice de Combinación media difería de 1. El método de Benjamini-Hochberg (Y. Benjamini e Y. Hochberg, *J. R. Stat. Soc., Serie B (Stat. Methodol.)*, 1995, 57 (1), 289-300) se usó para ajustar los valores de p resultantes para ensayo de múltiples hipótesis. Se consideró que un valor de p ajustado por debajo de 0,05 era estadísticamente significativo. Para que una combinación se clasifique como sinérgica, necesitamos que se cumplan tres criterios: el Índice de Combinación media para la condición tenía que ser menor que 1, la diferencia tenía que ser estadísticamente significativa, y Índice de Combinación tenía que estar fuera del intervalo (0,8, 1,2). Este tercer criterio evitó que pequeñas desviaciones de la adición se clasificaran como sinérgicas. Las combinaciones para las que el valor de p era mayor que 0,05 o el Índice de Combinación estaba dentro del intervalo (0,8, 1,2) se clasificaron como aditivas.

Se usaron ensayos de viabilidad celular para evaluar el efecto de la combinación *in vitro* de cada uno de los dos inhibidores de NAE, MLN4924 y I-216, con cada uno de los dos agentes de hipometilación, azacitidina y decitabina, en cuatro líneas celulares, HL60, OCIM2, NB4, y THP-1. La Figura 1 muestra el Índice de Combinación para todos los experimentos que pasaron los controles de calidad entre cada combinación sometida a ensayo. Los resultados se clasifican según la condición. La Tabla 1, que sigue a continuación, enumera el Índice de Combinación media, el valor de p ajustado, y la conclusión para cada combinación determinada. Tal como muestra la Tabla 1, todas las ocho combinaciones de inhibidor de NAE y agente de hipometilación demostraron un efecto sinérgico en las líneas celulares tanto OCIM2 como NB4. En la línea HL60, ambos inhibidores de NAE demostraron sinergia con decitabina y mostraron un efecto aditivo con azacitidina. En la línea THP-1, ambos inhibidores de NAE demostraron un efecto aditivo con azacitidina. Debido a la falta de actividad del agente único de decitabina en THP-1, no se puede calcular un Índice de Combinación para los experimentos *in vitro* con inhibidores de NAE y decitabina en THP-1.

Tabla 1. Resumen de los valores del Índice de Combinación.

Inhibidor de NAE	Agente hipometilante	Línea celular	Número de placas de pasaje	Índice de combinación medio	P-valor ajustado	Conclusión
MLN4924	Decitabina	HL60	6	0,45	$6,2 \times 10^{-4}$	Sinergia
I-216	Decitabina	HL60	4	0,46	$5,8 \times 10^{-3}$	Sinergia
MLN4924	Azacitidina	HL60	5	1,03	$1,1 \times 10^{-1}$	Adición
I-216	Azacitidina	HL60	3	0,97	$4,9 \times 10^{-1}$	Adición
MLN4924	Decitabina	OCIM2	7	0,52	$1,4 \times 10^{-4}$	Sinergia
I-216	Decitabina	OCIM2	5	0,45	$4,0 \times 10^{-5}$	Sinergia
MLN4924	Azacitidina	OCIM2	5	0,44	$4,8 \times 10^{-6}$	Sinergia
I-216	Azacitidina	OCIM2	3	0,41	$2,7 \times 10^{-3}$	Sinergia
MLN4924	Decitabina	NB4	5	0,61	$1,4 \times 10^{-4}$	Sinergia
I-216	Decitabina	NB4	4	0,61	$2,7 \times 10^{-3}$	Sinergia
MLN4924	Azacitidina	NB4	4	0,52	$5,8 \times 10^{-3}$	Sinergia

Inhibidor de NAE	Agente hipometilante	Línea celular	Número de placas de pasaje	Índice de combinación medio	P-valor ajustado	Conclusión
I-216	Azacitidina	NB4	4	0,56	$5,3 \times 10^{-3}$	Sinergia
MLN4924	Decitabina	THP-1	4	NA	NA	NA
I-216	Decitabina	THP-1	4	NA	NA	NA
MLN4924	Azacitidina	THP-1	4	1,10	$2,4 \times 10^{-2}$	Adición
I-216	Azacitidina	THP-1	4	1,11	$2,7 \times 10^{-2}$	Adición

La Figura 1 muestra los valores del Índice de Combinación para cada placa, clasificada por la condición (es decir, una combinación dada de fármacos aplicada a una línea celular dada). Estos resultados se resumen mediante el cálculo del Índice de Combinación media para cada condición, tal como se muestra en la Tabla 1.

5

## 2. Modelos de Eficacia Tumoral *in vivo*.

### Modelos de xenoinjerto subcutáneo

10 *Sujetos de ensayo.* Células tumorales HL-60 ( $2 \times 10^6$ ) en 100  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato con Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, MA) se inyectaron de forma aséptica en el espacio subcutáneo en el costado dorsal derecho de ratones desnudos Ncr hembra (5-8 semanas de edad, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) usando una aguja de calibre 26. Células tumorales THP-1 ( $2,5 \times 10^6$ ) u OCI-M2 ( $5 \times 10^6$ ) en 100  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato con Matrigel™ se inyectaron de forma aséptica en el espacio subcutáneo en el costado dorsal derecho de ratones CB.17 SCID hembra (5-8 de edad, Charles River Laboratories) usando una aguja de calibre 26.

15

Comenzando en el día siete (7) después de la inoculación, los tumores se midieron dos veces semanalmente usando Un calibrador vernier. Los volúmenes tumorales se calcularon usando procedimientos convencionales ( $0,5 \times$  (largo x ancho<sup>2</sup>)). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 10 y se inyectaron por vía subcutánea con compuesto inhibidor (200  $\mu$ l) a diversas dosis y programaciones, con el primer día de dosificación definido como Día 1. Todos los grupos de control recibieron el vehículo solo. El tamaño del tumor y el peso corporal se midieron aproximadamente dos veces a la semana durante la duración del estudio. Los ratones se sacrificaron cuando su volumen tumoral alcanzó un 10 % de su peso corporal, o cuando el volumen tumoral medio de un grupo de tratamiento o de control alcanzó aproximadamente 2000 mm<sup>3</sup>. El programa de dosificación para cada estudio fue como sigue a continuación: MLN4924 y azacitidina se dosificaron separadamente o se co-dosificaron mediante inyección subcutánea los Días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 en las dosis indicadas. Se siguió controlando el crecimiento tumoral después del periodo de dosificación. El volumen tumoral medio indicado como una función del tiempo se muestra en las Figuras 2-4.

20

25

30

### Análisis Estadístico de sinergia para crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto subcutáneo.

35

40

Para los modelos de THP-1 y OCI-M2, se analizaron medidas desde el día 0 al 21. Para el modelo HL60, se usaron las medidas desde el día 0 al 14, ya que varios de los ratones tenían tumores que superaban el volumen permitido después del día 14. Todos los volúmenes tumorales tenían un valor de 1 añadido a ellos antes de la transformación por log<sub>10</sub>. Estos valores se compararon a través de grupos de tratamiento para evaluar si las diferencias en las tendencias en el tiempo eran estadísticamente significativas. Para comparar pares de grupos de tratamiento, el siguiente modelo de regresión lineal de efectos mixtos se ajustó a los datos usando el método de probabilidad máxima:

40

$$Y_{ijk} - Y_{i0k} = Y_{i0k} + \text{tratamiento}_i + \text{día}_j + \text{día}_j^2 + (\text{tratamiento} * \text{día})_{ij} + (\text{tratamiento} * \text{día}^2)_{ij} + e_{ijk}$$

45

en la que  $Y_{ijk}$  es el log<sub>10</sub> del valor tumoral en el  $j^{\circ}$  punto temporal del  $k^{\circ}$  animal en el  $i^{\circ}$  tratamiento,  $Y_{i0k}$  es el log<sub>10</sub> del valor tumoral el día 0 en el  $k^{\circ}$  animal en el  $i^{\circ}$  tratamiento, el día <sub>$j$</sub>  era el punto temporal centrado en la media y se trató como una variable continua, y  $e_{ijk}$  es el error residual. Una matriz de covarianza de ley de potencia espacial se usó para tener en cuenta las medidas repetidas en el mismo animal en el tiempo. Los términos de interacción, así como los términos del día<sup>2</sup> se retiraban si no eran estadísticamente significativos.

50

Un ensayo de relación de probabilidad se usó para evaluar si un par de grupos de tratamiento dado presentaba diferencias que eran estadísticamente significativas. La probabilidad del modelo completo -2 log se comparó con unos sin ningún término de tratamiento (modelo reducido) y la diferencia en los valores se sometió ensayo usando un ensayo de Chi cuadrado. Los grados de libertad del ensayo se calcularon como la diferencia entre los grados de libertad del modelo completo y los del modelo reducido.

55

Además de la significancia estadística, se encontró una medida de la magnitud del efecto para cada tratamiento. Las diferencias predichas en los valores tumorales log ( $Y_{ijk} - Y_{i0k}$ ) frente al tiempo se tomaron a partir del modelo

mencionado anteriormente para calcular los valores medios del área bajo la curva (AUC) para cada grupo de tratamiento. A continuación se calculó un valor del dAUC como:

$$dAUC = 100 \frac{\text{media}(AUC_{\text{control}}) - \text{media}(AUC_{\text{tratamiento}})}{|\text{media}(AUC_{\text{control}})|}$$

5 Para análisis de sinergia, las diferencias observadas en los valores tumorales log se usaron para calcular los valores del AUC para cada animal. En los casos en los que un animal en un grupo de tratamiento se retiró el estudio, el último valor tumoral observado se transportó a través de todos los puntos temporales posteriores. Para mejorar la robustez del análisis sinérgico, se aplicó el siguiente procedimiento en los valores del AUC a partir de cada grupo de tratamiento. Permitir que x sea el conjunto de valores del AUC para un grupo de tratamiento dado. Se definió un intervalo de interés:

$$(\text{media}(x) - 5 * \text{MAD}(x), \text{media}(x) + 5 * \text{MAD}(x)).$$

15 Aquí, MAD es la desviación media absoluta de x. Si cualquier valor de x caía fuera de este intervalo, ese valor se reemplazó por el valor del límite más cercano. El procedimiento no era iterativo, de modo que el intervalo se calculó solamente una vez para cada grupo de tratamiento.

20 La puntuación de sinergia para la combinación de los tratamientos A y B se definió como

$$100 * (\text{media}(AUC_{AB}) - \text{media}(AUC_A) - \text{media}(AUC_B) + \text{media}(AUC_{cti})) / \text{media}(AUC_{cti})$$

25 en la que  $AUC_{AB}$ ,  $AUC_A$ ,  $AUC_B$ , y  $AUC_{cti}$  son los valores del AUC para animales en el grupo de combinación, el grupo A, el grupo B, y el grupo de control, respectivamente. El error estándar de la puntuación de sinergia se calculó en base a la variación de los valores del AUC entre los animales. Se usó un ensayo de t de dos lados para determinar si la puntuación de sinergia era significativamente diferente de cero. Si el valor de P era menor que 0,05, y la puntuación de sinergia era menor que cero, entonces se consideró que la combinación era sinérgica. Si el valor de P era mayor que 0,05, entonces se consideró que la combinación era aditiva.

30 Se usaron modelos de xenoinjerto para evaluar el efecto de la combinación *in vivo* del inhibidor de NAE MLN4924 y del agente de hipometilación azacitidina. Las Figuras 2-4 muestran el volumen tumoral como una función del tiempo en tres modelos de xenoinjerto subcutáneos después de tratamiento con el vehículo como un agente único, MLN4924 como un agente único, azacitidina ("Aza") como un agente único, y coadministración (s.c.) de MLN4924 y de azacitidina los Días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 en las dosis indicadas.

35 En el modelo de xenoinjerto subcutáneo de HL-60 (FIG. 2), MLN4924 y azacitidina como agentes únicos tuvieron un efecto mínimo sobre el crecimiento tumoral. Como contraste, la co-dosificación de MLN4924 y de azacitidina condujo a regresiones tumorales, con una evaluación estadística de sinergia.

40 En el modelo de xenoinjerto de THP-1 (FIG. 3), azacitidina como agente único tuvo un efecto mínimo sobre el crecimiento tumoral mientras que MLN4924 como un agente único inhibió el crecimiento tumoral. Como contraste, la co-dosificación de MLN4924 y de azacitidina condujo a regresiones tumorales. A pesar de la evaluación estadística de adición en este modelo, en lugar de sinergia, la figura muestra claramente un beneficio de la combinación: inhibición del crecimiento tumoral (agente único) frente a la regresión tumoral con la combinación.

45 Una demostración adicional de la actividad mejorada en THP-1 es el retraso del nuevo crecimiento tumoral con la combinación en comparación con cada agente único. El beneficio adicional proporcionado por la combinación sobre los tratamientos con el agente único fue estadísticamente significativo, tal como se muestra en la Tabla 3b (valor de  $P < 0,05$ ).

50 En el modelo de xenoinjerto subcutáneo de OCI-M2 (FIG. 4), MLN4924 y azacitidina como agentes únicos inhibieron el crecimiento tumoral. Como contraste, la co-dosificación de MLN4924 y de azacitidina condujo a regresiones tumorales con una evaluación estadística de sinergia.

55 Modelo de xenoinjerto diseminado

50 *Sujetos de ensayo.* Células tumorales HL-60 ( $1 \times 10^7$ ) en 100  $\mu$ l de medios de IMDM se inocularon en la vena lateral de ratones CB-17 SCID hembra (8-10 semanas de edad, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) usando una aguja de calibre 27. En el día 20 después de la inoculación, los ratones se clasificaron al azar en grupos de 10. Comenzando en el día 22, los ratones se dosificaron por vía subcutánea con vehículo, 180 mg/kg de MLN4924, 10

mg/kg de azacitidina, o la combinación de 180 mg/kg de MLN4924 y 10 mg/kg de azacitidina, usando el mismo programa de dos veces a la semana tal como se describe en los experimentos de xenoinjerto subcutáneo (dosificación los días 22, 25, 29, 32, 36, 39). Los ratones se controlaron al menos dos veces a la semana para la pérdida de peso corporal y signos de enfermedad, incluyendo paresia o parálisis de las extremidades posteriores y aparición de tumores sólidos palpables e internos. Se registró el día en el que un animal murió o se sacrificó debido a la carga de la enfermedad. El tiempo de supervivencia se muestra en la Figura 5.

Análisis estadístico de sinergia para supervivencia en modelo de xenoinjerto diseminado.

Para determinar la sinergia en los tiempos de supervivencia, los tiempos de supervivencia media y los errores estándar correspondientes se calcularon para cada grupo de tratamiento. La sinergia de supervivencia se definió como

$$\text{media}(\text{supervivencia}_{AB}) - \text{media}(\text{supervivencia}_A) - \text{media}(\text{supervivencia}_B) + \text{media}(\text{supervivencia}_{ctl})$$

en la que supervivencia<sub>AB</sub>, supervivencia<sub>A</sub>, supervivencia<sub>B</sub>, y supervivencia<sub>ctl</sub> son los tiempos de supervivencia para los animales en el grupo de combinación, el grupo A, el grupo B, y el grupo de control, respectivamente. El error estándar para la sinergia de supervivencia se encontró por adición del error estándar de cada uno de los cuatro términos en cuadratura. Se usó un ensayo Z de dos lados para determinar si la sinergia de supervivencia era significativamente diferente de cero. Si el valor de P era menor que 0,05, y la sinergia de supervivencia era mayor que cero, entonces se consideraba que la combinación era sinérgica. Si el valor de P era mayor que 0,05, entonces se consideraba que la combinación era aditiva.

La Figura 5 muestra la supervivencia como una función del tiempo en un modelo de xenoinjerto diseminado en el que las células HL-60 se inocularon mediante inyección intravenosa, y los ratones se trataron con vehículo, con MLN4924 como un agente único, azacitidina como un agente único, y coadministración de MLN4924 y azacitidina s.c. comenzando en el Día 22 después de la inoculación en las dosis indicadas, usando el mismo programa de dos veces a la semana tal como en los experimentos en las Figuras 2-4. En el modelo diseminado de HL-60 (FIG. 5), MLN4924 y azacitidina como agentes únicos, ambos extendieron el tiempo de supervivencia media en comparación con el grupo de control (8,4 días de extensión para MLN4924 y 21,1 días de extensión para azacitidina). La combinación de MLN4924 y de azacitidina prolongó el tiempo de supervivencia media en 36,7 días, que es 7,2 días más largo que lo que se podría esperar de una combinación aditiva (FIG. 5). La sinergia de supervivencia era estadísticamente significativa.

Tabla 2a. Evaluación de sinergia para tumores de xenoinjerto subcutáneo de HL60.

Tratamiento	Puntuación de sinergia	Error estándar de puntuación de sinergia	P-Valor	Evaluación
MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 15 mg/kg	-54,8	17,6	0,005	Sinergia

Tabla 2b. Comparación por parejas de grupos de tratamiento para tumores de xenoinjerto subcutáneo de HL60.

Referencia	Tratado	dAUC	P-valor para la diferencia en los efectos.
MLN4924 180 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 15 mg/kg	118,3	<0,001
azacitidina 15 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 15 mg/kg	112,9	<0,001

Tabla 3a. Evaluación de sinergia para tumores de xenoinjerto subcutáneo de THP-1.

Tratamiento	Puntuación de sinergia	Error estándar de puntuación de sinergia	P-Valor	Evaluación
MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 10 mg/kg	-40,5	21,4	0,078	Aditivo

Tabla 3b. Comparación por parejas de grupos de tratamiento para tumores de xenoinjerto subcutáneo de THP-1.

Referencia	Tratado	dAUC	P-valor para la diferencia en los efectos.
MLN4924 180 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 10 mg/kg	882,2	<0,001
azacitidina 10 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 10 mg/kg	221,1	<0,001

Tabla 4a. Evaluación de sinergia para tumores de xenoinjerto subcutáneo de OCI-M2.

Tratamiento	Puntuación de sinergia	Error estándar de puntuación de sinergia	P-Valor	Evaluación
MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 5 mg/kg	-52,1	15,1	0,002	Sinergia

Tabla 4b. Comparación por parejas de grupos de tratamiento para tumores de xenoinjerto subcutáneo de OCI-M2.

Referencia	Tratado	dAUC	P-valor para la diferencia en los efectos.
MLN4924 180 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 5 mg/kg	545,5	<0,001
azacitidina 5 mg/kg	MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 5 mg/kg	767,6	<0,001

Tabla 5a. Tiempos de supervivencia media para ratones con modelo de xenoinjerto diseminado de HL-60.

Tratamiento	Tiempo de supervivencia medio (días)	Error estándar del tiempo de supervivencia medio (días)
Vehículo	48,1	1,0
MLN4924 180 mg/kg	56,5	0,7
azacitidina 10 mg/kg	69,2	2,1
MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 10 mg/kg	84,8	2,4

5 Tabla 5b. Evaluación de sinergia del tiempo de supervivencia para modelo de xenoinjerto diseminado de HL-60.

Tratamiento	Sinergia de supervivencia (días)	Error estándar de la sinergia de supervivencia (días)	P-valor	Evaluación
MLN4924 180 mg/kg + azacitidina 10 mg/kg	7,2	3,4	0.036	Sinergia

Ejemplo Profético de Administración de Fármacos.

10 Antes del uso, se calientan viales de MLN4924-IDP en condiciones ambientales (de 15 °C a 30 °C) colocándolos a temperatura ambiente. Métodos de calentamiento acelerado, tales como un baño de agua, no se usaron, y no se deben usar. MLN4924-IDP es estable a temperatura ambiente durante 8 horas antes de la dilución.

15 Cada vial de MLN4924-IDP contiene en concreto 5 ml (50 mg de MLN4924 en forma de la base libre). Usando técnicas estériles, el volumen apropiado del fármaco se extrae del vial o viales y se inyecta en una bolsa IV de 250 ml que contiene una solución de dextrosa al 5 %, que a continuación se invierte suavemente de forma repetida para mezclar. La bolsa IV de MLN4924-IDP preparada se debe usar en 6 horas si se almacena a temperatura ambiente. Como alternativa, la bolsa IV preparada es químicamente estable y se puede almacenar hasta 24 horas a 5 °C ± 3 °C. Después de 24 horas de almacenamiento 5 °C ± 3 °C, la bolsa IV preparada se debe usar en 6 horas después de llegar a temperatura ambiente. El vial no se debe agitar en ningún momento durante la preparación de la dosis.

20 Las instrucciones para la preparación, reconstitución, y administración de azacitidina se proporcionan en el prospecto de la azacitidina (VIDAZA®).

25 La cantidad de MLN4924 y azacitidina administrados se basa en el área de superficie corporal (BSA). El BSA se calcula usando un nomograma convencional en el Ciclo 1, Día 1, y en visitas posteriores si el paciente experimenta un cambio > 5 % en el peso corporal a partir del peso usado para el cálculo de BSA más reciente.

30 Los pacientes reciben MLN4924 diluido con dextrosa al 5 % en una bolsa IV de 250 ml a través de una infusión de 60 minutos. MLN4924 se debería administrar a través de acceso venoso central o periférico. La infusión se puede ralentizar o detener y reiniciar para cualquier reacción asociada a la infusión. El tiempo de infusión total no debe superar las seis horas desde el momento de la reconstitución.

35 Todo el contenido de la bolsa IV de MLN4924 se infundirá a una velocidad constante durante 1 hora. Para asegurarse de que todo el MLN4924 entra el organismo, la línea de infusión se lavará abundantemente con dextrosa al 5 % inmediatamente después de la administración.

Las instrucciones para la administración de azacitidina se proporcionan en el prospecto de la azacitidina (VIDAZA®).

40 Aunque las DLT se pueden producir en cualquier momento durante el tratamiento, solamente las DLT que se producen durante el Ciclo 1 del tratamiento influirán necesariamente en las decisiones con respecto al aumento de las dosis, expansión de un nivel de dosis, o evaluación de niveles de dosis intermedias. Los pacientes se controlan a través de todos los ciclos de terapia para las toxicidades relacionadas con el tratamiento.

45 La duración de los ciclos será de 28 días. La azacitidina se administrará en un programa de 5 días seguidos/2 días libres/2 días seguidos, es decir, los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8, y 9. MLN4924 se administrará los Días 1, 3, y 5. Los pacientes recibirán ambos agentes los Días 1, 3 y 5. MLN4924 se puede administrar en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 40 mg/m<sup>2</sup>, 45 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup>, o 75 mg/m<sup>2</sup>. La azacitidina se administrará por vía IV o SC a una dosis de 75 mg/m<sup>2</sup>.



## ES 2 668 272 T3

En una realización opcional, MLN4924 se administrará los Días 1, 8, y 15.

5 Opcionalmente, la duración de los ciclos será de 28 días, con excepción del Ciclo 1, en el que se incorporará un periodo preliminar 7 días en el que no se administrará azacitidina, de modo que el Ciclo 1 se prolongará durante un total de 35 días. De acuerdo con este programa, la azacitidina se administran un programa de 5 días seguidos/2 días libres/2 días seguidos 5; los Días 8 a 12 y los Días 15 y 16 en el Ciclo 1, y los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8, y 9 para todos los ciclos posteriores. De acuerdo con este programa, MLN4924 se administrará los Días 1, 3, y 5.

10 En otra realización opcional, MLN4924 se administrará los Días 1, 4, 11 y 15 para el Ciclo 1 solamente, proporcionando un ciclo de 35 días; en todos los ciclos posteriores, MLN4924 se administrará los Días 1, 3, y 5, durando cada ciclo 28 días. De acuerdo con este programa opcional, los pacientes recibirán ambos agentes los Días 11 y 15 del Ciclo 1 y los Días 1, 3, y 5 de ciclos posteriores. MLN4924 se administrará a una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 40 mg/m<sup>2</sup>, 45 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup>, o 75 mg/m<sup>2</sup>. La azacitidina se administrará por vía IV o SC (elección del médico) a una dosis de 75 mg/m<sup>2</sup>.

15 Los pacientes recibirán azacitidina como una inyección IV o SC (véase el prospecto de azacitidina [VIDAZA<sup>®</sup>] para detalles de administración). En los días en los que se van a administrar tanto MLN4924 como azacitidina, la infusión de MLN4924 comenzará en un tiempo que varía de 15 a 60 minutos después de la finalización de la administración de azacitidina. Se hará una evaluación de los signos vitales antes de la dosis de azacitidina, antes de la dosis de  
20 MLN4924, y después de la dosis de MLN4924 en estos días.

## REIVINDICACIONES

5 1. Un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante la administración en combinación con un agente hipometilante, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el inhibidor de NAE, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es:

10 ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-ilo)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
{{(1S,2S,4R)-4-[(6-[[[(1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]amino}pirimidin-4-il]oxi]-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

y en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es:

15 azacitidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; o  
 decitabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

20 2. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la reivindicación 1, en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es azacitidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

3. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la reivindicación 1, en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es decitabina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

25 4. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 5. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es {{(1S,2S,4R)-4-[(6-[[[(1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]amino}pirimidin-4-il]oxi]-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 6. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la reivindicación 4, en donde ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino))-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en cada uno de los Días 1, 3 y 5 de un ciclo de 28 días.

40 7. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la reivindicación 4, en donde ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se:

- 45 a) administra a una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>; o  
 b) administra a una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup>; o  
 c) administra a una dosis de aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup>; o  
 d) administra a una dosis de aproximadamente 30 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup>; o  
 e) administra a una dosis de aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup>; o  
 50 f) administra a una dosis de aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>.

8. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde ((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-hidroxiciclo-clopentil)metil sulfamato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por vía intravenosa o vía subcutánea.

55 9. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 6, en donde el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es azacitidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y se administra en cada uno de los Días 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9 de un ciclo de 28 días; opcionalmente, en donde la azacitidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra a una dosis de aproximadamente 75 mg/m<sup>2</sup>.

60 10. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 9, en donde la azacitidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra por vía subcutánea o intravenosa.

- 5 11. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con el agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una forma farmacéutica única.
- 10 12. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con el agente hipometilante o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en formas de dosificación distintas.
- 15 13. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cáncer es una neoplasia hemática.
- 15 14. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer es leucemia mieloide aguda (LMA).
- 20 15. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer son síndromes mielodisplásicos (SMD).
- 25 16. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 15, en donde los síndromes mielodisplásicos (SMD) se diagnostican como cualquiera de anemia resistente (AR), anemia resistente con blastos anillados (RARS), (anemia resistente con blastos en exceso (RAEB), y RAEB en transformación (RAEB-T), opcionalmente en donde el diagnóstico es predominantemente un tipo de síndromes mielodisplásicos; o en donde el diagnóstico es más de un tipo de síndrome mielodisplásico.
- 30 17. El inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer se diagnostica como cualquiera de leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), enfermedad de Hodgkin (EH), linfoma no Hodgkiniano (LNH), linfoma de linfocitos T, mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom, síndromes mielodisplásicos (MDS) y síndromes mieloproliferativos; opcionalmente, en donde el diagnóstico es predominantemente un tipo de cáncer; o en donde el diagnóstico es más de un tipo de cáncer.
- 35 18. Un kit adecuado para el tratamiento del cáncer en un sujeto en reconocida necesidad del mismo que comprende:  
 -al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y  
 -al menos un medicamento que comprende al menos una dosis de un agente hipometilante o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 40 comprendiendo adicionalmente dicho kit para el tratamiento del cáncer instrucciones de dosificación para la administración de los medicamentos para el tratamiento del sujeto en reconocida necesidad del mismo, en donde el inhibidor de NAE o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es:
- 45  $((1S,2S,4R)-4-(4-((1S)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ilamino)-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-7-ilo)-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato$ , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;  
 $\{(1S,2S,4R)-4-[(6-(((1R,2S)-5-cloro-2-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]amino)pirimidin-4-il)oxi]-2-hidroxiciclopentil)metil sulfamato$ , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 50 y en donde el agente hipometilante o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es:  
 azacitidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; o  
 decitabina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

FIG. 1. Valores del Índice de Combinación

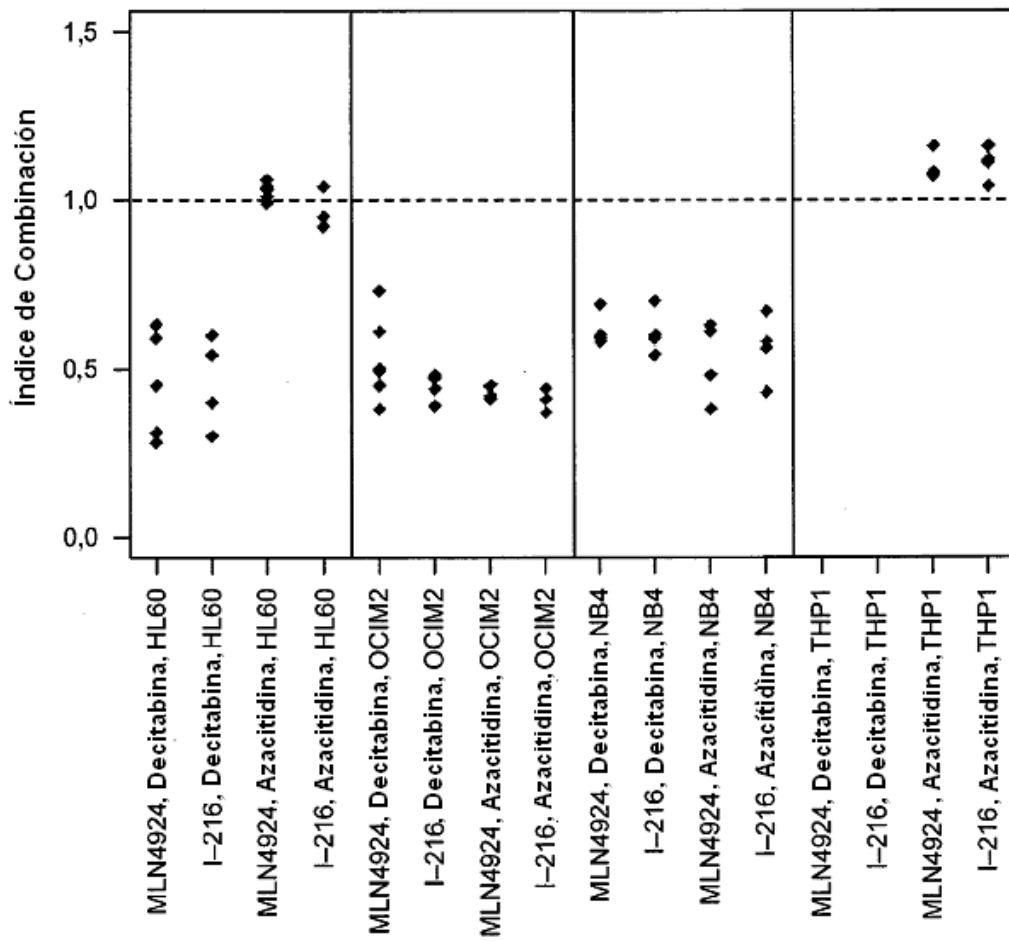


FIG. 2

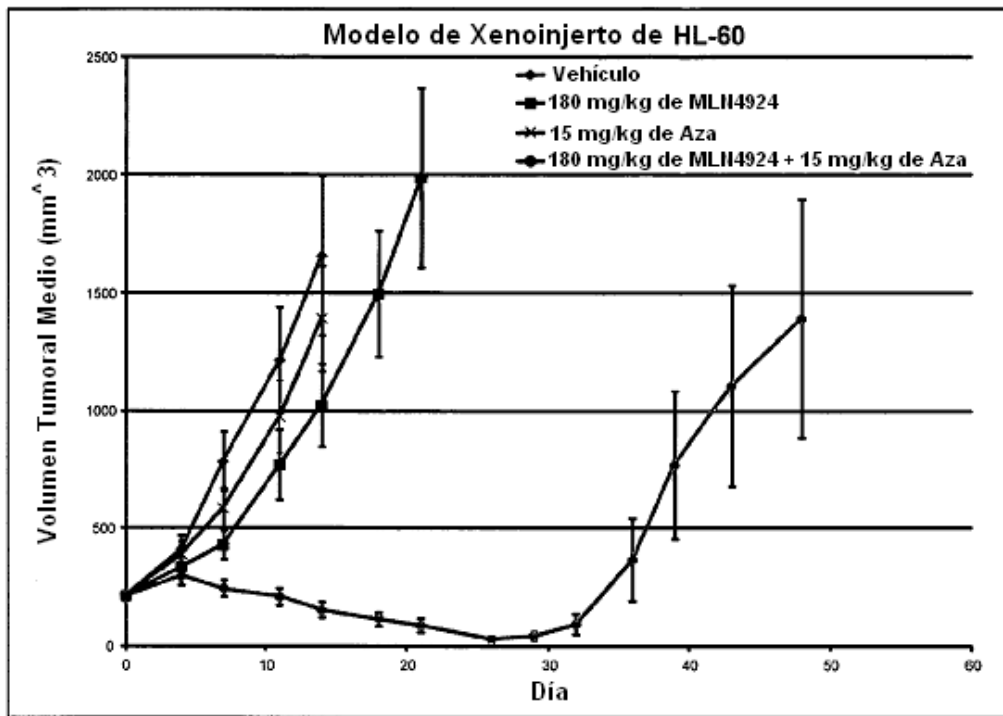


FIG. 3

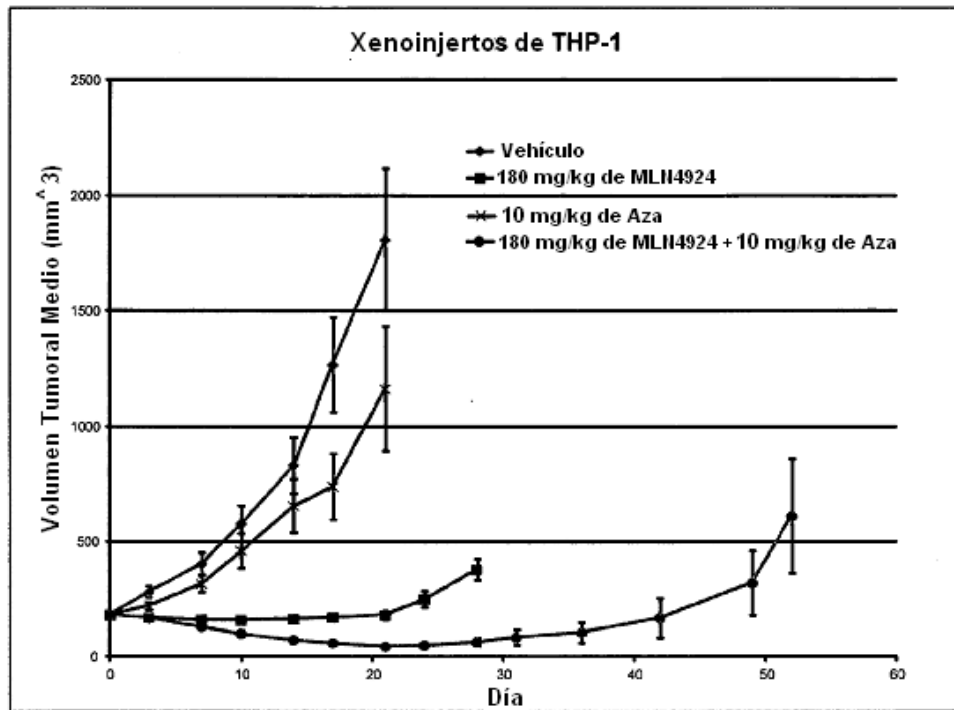


FIG. 4

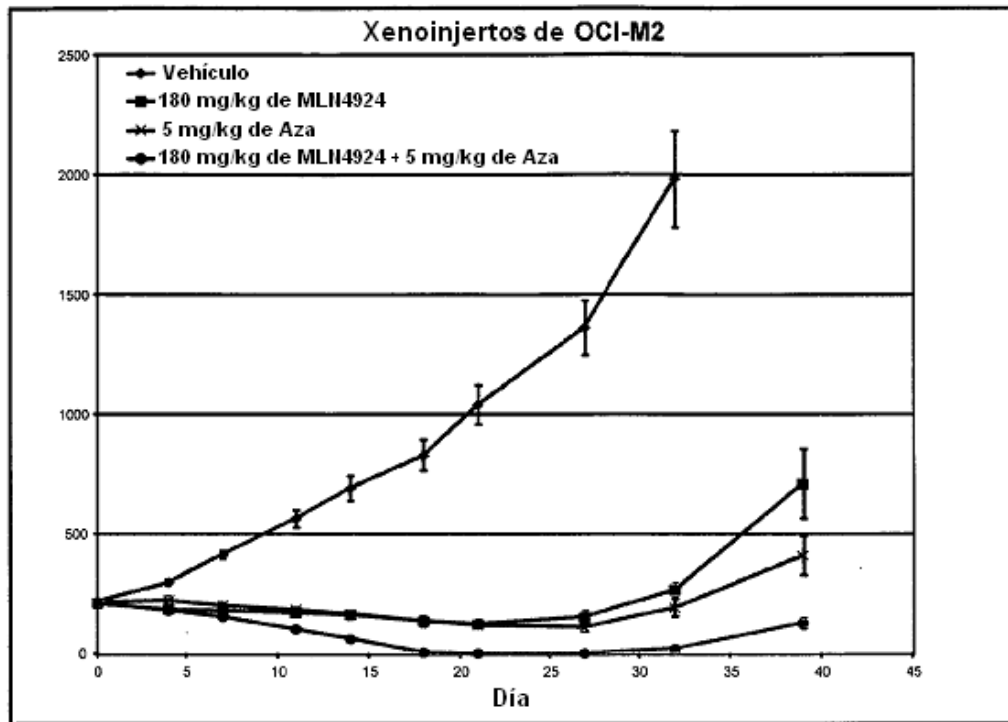


FIG. 5

