

Contactenos

De: CAROLINA POLANCO <CPOLANCO@prietocarrizosa.com>
Enviado el: martes, 13 de agosto de 2013 3:39 p. m.
Para: contactenos@sic.gov.co
CC: NATALIA NOSSA; PATMARKS (prietocarrizosa); 150442_71833_MILLENNIUM PHARMACEUTICALS_INC_ _ COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE LOS MISMOS_ Correspondencia
Asunto: Reenvio de documentos por error en el sistema [IWOV-Imanage.FID280272]
Datos adjuntos: doc20130813153051.pdf; Radicación recurso de apelación (5,04 MB)

Estimados Señores,

Me permito adjuntar nuevamente el anexo del recurso de reposición enviado en el día de ayer 12 de agosto de 2013, el cual no subió por error involuntario al momento de anexar el archivo correspondiente.

Por lo anterior, solicito amablemente se anexe el presente documento al expediente No. 10.161.489 correspondiente a la Solicitud de Patente de Invención denominada: "COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE LOS MISMOS" a nombre de MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC, sólo en caso de que éste no hubiera cargado correctamente en el día de ayer.

Un cordial saludo.

Carolina Polanco
Asociada/ Associate
prietocarrizosa

Carrera 9 # 74-08, Bogotá D.C., Colombia
+ (571) 3268600 (Main) Ext. 1454
www.prietocarrizosa.com

Colombia Law Firm of the Year 2012
Chambers & Partners. Latin America Awards for Excellence

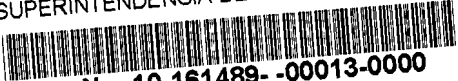
Colombia Law Firm of the Year 2012 and 2013
International Financial Law Review

Colombia Transfer Pricing Firm of the Year 2012
International Tax Review

🖨️ La sostenibilidad del medio ambiente comienza en casa, piense antes de imprimir!

* Aviso de confidencialidad: Este mensaje es para el uso exclusivo de la persona o entidad a la que se encuentra dirigido y puede contener información privilegiada o confidencial. Si usted ha recibido por error esta comunicación, sírvase notificarnos de inmediato telefónicamente al (571) 3268600 o vía e-mail, borrar de inmediato el mensaje y abstenerse de divulgar su contenido. Cualquier opinión, conclusión u otra información contenida en este mensaje, que no esté relacionada con las actividades oficiales de nuestra firma, deberá considerarse como nunca proporcionada o aprobada por la firma.

* Confidentiality notice: This message is intended only for the use of the individual or entity to which it is addressed and may contain information that is privileged or confidential. If you received this communication in error, please notify us immediately by telephone (571) 3268600 or by e-mail, delete the e-mail and do not disclose its content to any person. Opinions, conclusions and other information in this message, not related to the official business of our firm, shall not be understood as given or endorsed by it.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-161489- -00013-0000
Fecha: 2013-08-13 17:12:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 62

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

REF. PCT- PATENTE DE INVENCION

Invención: COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS DE LOS MISMOS

Expediente: 10.161.489

TITULAR: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

Asunto: COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN

MAURICIO PATIÑO BONNET, mayor de edad, con domicilio en la ciudad de Bogotá D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de la sociedad **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.**, me permito manifestar lo siguiente:

- I.** El 12 de agosto de 2013 se presentó recurso de reposición en contra de la Resolución No. **37571**. Por un error involuntario al momento de adjuntar el archivo correspondiente a la respuesta del recurso no se adjuntó la totalidad de la traducción correspondiente al anexo i)

"Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al. "Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer". *Cancer Res* 2010;70:1970-1980. February 16, 2010".

- II.** Teniendo en cuenta los hechos anteriores, allego las hojas faltantes de la traducción del documento mencionado.

NOTIFICACIONES

Recibiré notificaciones en la secretaría de su Despacho o en la Carrera 9 # 74-08, Oficina 305, en la ciudad de Bogotá D.C.

prietocarrizosa

Carrera 9 # 74-08 (305)
Bogotá D.C., Colombia
Tels.: + (571) 326 8400/8400
Fax: + (571) 326 8610
pelmarks@prietocarrizosa.com
www.prietocarrizosa.com

Señor Jefe de la Dirección de Nuevas Creaciones,

prietocarrizosa


MAURICIO PATIÑO BONNET

C.C. 11.342.699 de Zipaquirá

T.P. 73.583 del C.S. de la J.

Cancer Research

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al.

Cancer Res 2010;70:1970-1980. Publicado en línea primero. Febrero 16 de 2010.

Versión actualizada: Acceda a la versión más reciente de este artículo en:
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766

Material complementario: Acceda al material suplementario más reciente en:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/02/15/0008-5472.CAN-09-2766.DC1.html>

Artículos citados: Este artículo cita 53 artículos, a 28 de los cuales usted puede acceder gratis en:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#ref-list-1>

Artículos que citan: Este artículo ha sido citado por 17 artículos de HighWire. Acceda a los artículos en
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#related-urls>

Alertas de E-mail: Regístrese para recibir alertas de E-mail gratuitas relacionadas con este artículo o revista

Reimpresiones y suscripciones: Para ordenar reimpresiones de este artículo o para suscribirse a la revista, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de pubs@aacr.org.

Permisos: Para solicitar permiso para re utilizar todo o algunas partes de este artículo, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de permissions@aacr.org.

Terapéutica, metas y biología química.

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, Bret Bannerman, Michael Fitzgerald, Allison Berger, Jie Yu, Yu Yang, Paul Hales, Frank Bruzzese, Jané Liu, Jonathan Blank, Khristofer Garcia, Christopher Tsu, Larry Dick, Paul Fleming, Li Yu, Mark Manfredi, Mark Rolfe, y Joe Bolen.

Resumen

La proteasoma fue validada como un blanco de la oncología luego del éxito clínico de VELCADE (bortezomib) para inyección para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma de células de manto recurrente. En consecuencia, diversos grupos están detrás del desarrollo de inhibidores de proteasoma de moléculas pequeñas adicionales tanto para indicaciones hematológicas como de tumores sólidos. En el presente artículo describimos el MLN9708, un inhibidor de proteasoma selectivo, biodisponible oralmente, de segunda generación que se encuentra en la fase I de desarrollo clínico. MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta, así como farmacocinética, fármaco dinámica y actividad anti tumor mejorada en comparación con el bortezomib. MLN9708 tiene una mayor distribución de volumen de sangre en estado estable, y los análisis de la inhibición de la proteasoma 20S, así como los marcadores de la respuesta de proteína desplegada confirmaron que MLN9708 tiene mayores efectos fármaco dinámicos en los tejidos a comparación con el bortezomib. MLN9708 mostró actividad tanto en tumores sólidos como en modelos de xenoinjertos hematológicos, y encontramos una correlación entre mayores respuestas fármaco dinámicas y actividad anti tumor mejorada. Por otro lado, la actividad anti tumor fue evidenciada a través de múltiples rutas de dosificación, incluyendo sonda oral. En conjunto, esta información soporta el desarrollo clínico de MLN9708 tanto para indicaciones hematológicas y de tumores sólidos. *Cancer Res*; 70(5); 1970–80. ©2010 AACR.

Introducción:

El sistema ubiquitina-proteasoma procesa la mayoría de las proteínas celulares y es la principal manera en la que las células regulan la homeostasis de proteínas. Durante la homeostasis de proteínas normal, proteínas específicas son objeto de destrucción a través de la unión de ubiquitina. Estos sustratos de proteasoma incluyen proteínas mal plegadas y miembros altamente regulados de cascadas de señales críticas, incluyendo proteínas involucradas en el control del crecimiento, la regulación del ciclo celular y apoptosis. La inhibición de la proteasoma resulta en la estabilización y acumulación de dichos sustratos, llevando a la activación de señales antiproliferativas, trastornos en el ciclo celular, activación de caminos apoptóticos, y en último caso, muerte celular (1,2). Las células malignas de rápido crecimiento, que ya son deficientes en mecanismos de chequeo del ciclo celular normal, parecen ser altamente susceptibles a la inhibición de proteasoma (3-6). En consecuencia, la proteasoma se convirtió en un blanco atractivo para las terapias anticancerígenas. El éxito del inhibidor de proteasoma de la molécula pequeña primera de su clase VELCADE (bortezomib) para inyección (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) validó la proteasoma como un blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer humano (1, 7-12). VELCADE está aprobado para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple y linfoma de células de manto previamente tratada (13-21). Actualmente hay múltiples grupos en el proceso de desarrollar inhibidores de proteasoma de molécula pequeña para varias indicaciones de oncología. Estos incluyen tanto inhibidores reversibles, tal como CEP-18770 como inhibidores irreversibles, tal como carfilzomib y NPI-0052. Tanto CEP-18770 como NPI-0052 son activos oralmente, y todos los tres compuestos han mostrado actividad anti tumor en modelos preclínicos y actualmente se encuentran en varias fases de desarrollo clínico (22-30).

La proteasoma 20S consiste de un núcleo multicatalítico recubiertos en cada extremo con 19S subunidades regulatorias. La proteasoma 20S es una estructura compartimentada, en forma de barril que contiene dos anillos heptaméricos hechos de subunidades α y dos anillos heptaméricos hechos de subunidades β . Los anillos α realizan funciones de recubrimiento y de compuerta, mientras que tres de las subunidades β ($\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$) contienen las treoninas NH2-terminal responsables de las diferentes actividades proteolíticas de la proteasoma. Las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, y $\beta 5$ son referidas como de tipo caspasa, de tipo tripsina, y de tipo quimiotripsina, respectivamente, porque el sitio de escisión preferido de cada subunidad es similar a aquel de otras proteasas conocidas (2, 31-34).

El bortezomib muestra una inhibición dependiente del tiempo de la proteasoma 20S uniendo a la cadena de lado de la treonina NH2-terminal de las subunidades catalíticas β . El bortezomib exhibe actividad inhibidora contra todas las tres subunidades β pero preferencialmente se une e inhibe las del lado $\beta 5$ (35). Aunque el bortezomib ha demostrado eficacia clínica en mieloma múltiple y linfoma de células de manto, a la fecha no ha demostrado aún una actividad fuerte en indicaciones de tumores sólidos, quizás debido a su inhabilidad de penetrar en los tejidos y alcanzar concentraciones terapéuticamente relevantes en dichos sitios objetivo. En consecuencia, hay fundamentos sólidos para identificar los inhibidores de proteasoma que tienen propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas diferentes. En la presente describimos la información bioquímica y farmacológica preclínica que soporta el desarrollo de MLN9708. MLN9708 es un inhibidor de proteasoma de molécula pequeña que está siendo desarrollado para el tratamiento de un amplio rango de tumores humanos malignos. MLN9708 fue seleccionado de un amplio pool de inhibidores de proteasoma que contienen boro con base a un perfil fisicoquímico distinto al bortezomib. MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta que el bortezomib, lo cual creemos que juega un rol importante en la mejoría en la distribución de tejidos. La comparación directa con el bortezomib reveló que MLN9708 tiene un perfil farmacocinético y farmacodinámico mejorado y muestra una actividad anti tumor superior tanto en tumores sólidos como en modelos de xenoinjertos hematológicos, y muestra actividad anti tumor cuando es administrado a través de múltiples rutas de dosificación y regímenes. MLN9708 está actualmente siendo evaluado en múltiples estudios clínicos de fase I tanto para tumores sólidos y hematológicamente basados.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Células WSU-DLCL2, OCI-Ly7, A375, H460, HCT-116, HT-29, MDAMB- 231, HEK293, y células Calu-6 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection y mantenidas según las recomendaciones del proveedor.

Ensayos in vitro

Análisis cinético de inhibición de proteasoma 20S: El análisis cinético de la inhibición de proteasoma 20S fue realizado según lo descrito previamente por Williamson y sus colegas (36).

Ensayos de indicador basados en células NF-κB-Luc y 4×Ub-Luc

Los ensayos de indicador basados en células NF-κB-Luc y 4×Ub-Luc fueron realizados según lo descrito previamente por Williamson y sus colegas (36).

Proteasoma Glo IC50 y ensayos de inhibidor de lavado basados en células. Las células Calu-6 fueron cultivadas en MEM conteniendo 10% suero bovino fetal y 1% penicilina/estreptomicina y fueron sembradas 1 d antes del comienzo del experimento a 10,000 células por cavidad en una placa de 384 cavidades. Para las determinaciones IC50 las células fueron tratadas con concentraciones variables de bortezomib o de MLN2238 en DMSO (0.5% final, v/v) por 1 h a 37°C. Para los experimentos de reversibilidad, las células fueron tratadas con bien sea 1 μmol/L bortezomib o MLN2238 por 30 min a 37°C y luego fueron lavadas tres veces en el medio para remover los compuestos. Las células fueron incubadas por 4 h adicionales a 37°C luego de lo cual el medio fue removido y reemplazado con medio fresco. La actividad de proteasoma fue evaluada monitoreando la hidrólisis del sustrato quimiotripsina de tipo quimiotripsina Suc-LLVY - aminoluciferin en presencia de luciferasa haciendo uso de los reactivos de ensayo Proteasoma-Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Corp.). La luminiscencia fue medida haciendo uso de un instrumento LEADseeker (GE Healthcare Life Sciences).

Estudios farmacocinéticos

Las muestras de sangre y de tumores fueron recolectadas antes de la dosis y en numerosos puntos de tiempo luego de la administración. Cada punto en el tiempo representa el valor promedio de tres animales. Las concentraciones de MLN2238 o bortezomib en la sangre y en las muestras de plasma fueron determinadas haciendo uso de un método basado en una espectrometría de masa de un tándem de cromatografía de un líquido de prácticas de laboratorio no-bueno (LC/MS/MS). MLN2238 o el bortezomib fueron aislados de 50 μL de plasma o de sangre haciendo uso de un procedimiento de extracción líquido-líquido. Una muestra (50 μL) fue mezclada con 50 μL de solución estándar interna, 50 μL de 0.5 mol/L HCl, y 500 μL de éter metil terciario butil. Lo flotante (300 μL) fue luego transferido a una placa de cavidades de 96 cavidades, evaporado, reconstituido en 100 μL de acetronilo/ agua (5:95) con un contenido de 0.1% de ácido fórmico, e inyectado en el sistema LC/MS/MS para análisis. Un método gradiente de fase de reversión proporcionó apilamiento de muestras y separación. El análisis farmacocinético de la información de concentración de sangre y plasma fue realizado haciendo uso de WinNonlin versión 5.2 (Pharsight Corp.). Los parámetros cinéticos fueron estimados haciendo uso de un modelo sin compartimientos que utiliza un modo de muestreo disperso (modelo 201 para plasma y sangre). Los valores del área bajo la concentración versus la curva de tiempo (AUC) y del área bajo el efecto versus la curva de tiempo (AUE) fueron calculados haciendo uso de la regla trapezoidal lineal.

Estudios farmacodinámicos

Aproximadamente 200 μL de sangre entera fueron recolectados de cada animal y procesados para el ensayo de inhibición de proteasoma de sangre 20S. Los tumores subcutáneos (aproximadamente 600- 800 mm³ de tamaño fueron recolectados y divididos en dos o tres partes. Uno fue procesado para el ensayo de inhibición de proteasoma de tejido 20S uno para análisis de transferencia de Western y otro para inmunohistoquímica.

Procesamiento de tumores para ensayos de proteasoma de tejido 20S

Muestras congeladas fueron pulverizadas en el Tejido CryoPrep (Covaris) y transferidas a tubos de vidrio. Luego de adicionar 1 mL de solución reguladora de lisis de tejido frío [50 mmol/L HEPES (pH 8.0), 1 mmol/L DTT], las muestras fueron colocadas en hielo y homogenizadas según las instrucciones del fabricante haciendo uso del Covaris E200.

Procesamiento de tumores para ensayos de transferencia de Western.

Los tumores fueron procesados como se describió previamente en el Covaris E200. La solución reguladora de lisis M-PER (Pierce) fue suplementado con lo siguiente: 1x conjunto de coctel de inhibidor de proteasa (Calbiochem), 2 mmol/L sodio ortovanadato (Sigma), 25 mmol/L fluorido de sodio y 25 mmol/L β -glicerofosfato. Se adicionó solución reguladora frío de lisis (300– 800 μ L) a los tumores justo ante del ultrasonido. Luego del ultrasonido, los flotantes fueron transferidos a tubos nuevos y fueron determinadas las concentraciones de proteína.

Análisis de transferencia de Western

Lisato tumoral fue cargado en 4% a 12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF-FL (Millipore) hacienda uso de un aparato de transferencia semi seco. Luego de la transferencia y el bloqueo, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBSTween 20 (TBST) e incubadas con inmunoglobulina de cabra anti-conejo G Alexa Fluor etiquetada -680 (Sondas moleculares) durante 1 h. Las membranas fueron lavadas cinco veces con TBST y una vez con TBS mientras eran protegidas de la luz. Las membranas fueron secadas y escaneadas con un Sistema de Imágenes Infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences). Fueron utilizados los siguientes anticuerpos primarios: anti-tubulina (policlonal de conejo, dilución 1:15.000; Abcam) y daños en el ADN anti-detención del crecimiento 34(GADD34; Proteintech Group, Inc.). Un anticuerpo secundario fue utilizado a 1:20,000 para tubulina y a 1:2,000 para GADD34. La cuantificación de las señales de transferencia de Western fue realizada con un software Odyssey.

Proteasoma 20S β 5 y ensayos de sangre

Los tumores de proteasoma 20S β 5 y los ensayos de sangre fueron realizados como se describió previamente (36–38).

Estudios inmunohistoquímicos

Las secciones tumorales fijadas con formalina, CWR22 incrustados con parafina y los xenoinjertos WSU-DLCL2 fueron teñidos con anticuerpos primarios a GADD34, activando el factor de transcripción 3 (ATF3), y la caspasa-3 escindida (Proteintech Group, Santa Cruz Biotechnology, y Cell Signaling Technology). Los anticuerpos GADD34 y ATF3 fueron detectados con anticuerpos secundarios etiquetados con peroxidasa de rábano silvestre (UltraMapa anti-conejo Ventana Medical Systems) e incubados con el kit de Chromo-Map 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Ventana Medical Systems). El anticuerpo de caspasa-3 escindido fue detectado con un anticuerpo secundario con etiqueta de Alexa Fluor 594 (Invitrogen). Las láminas fueron contrastadas con hematoxilina para ensayos de GADD34 y ATF3 y 4',4',6-diamino-2-fenilindol para el ensayo de caspasa-3 escindido. Se capturaron imágenes haciendo uso de un microscopio Eclipse E800 (Nikon Instruments), lente 20x, y una cámara digital a color Retiga EXi (QImaging). Se capturaron cinco campos de visión por muestra, y las imágenes fueron procesadas haciendo uso de un software MetaMorph (Molecular Devices). Los niveles marcadores fármaco dinámicos fueron medidos por color umbralizando en el DAB o en la señal fluorescente y midiendo el área de la señal umbralizada. El porcentaje de área positiva fue calculado normalizando con el área total del campo de visión.

Cuidado animal

Ratones con CB17 –severa con inmunodeficiencia combinada (SCID) y ratones diabéticos no obesos (NOD)–SCID fueron alojados y mantenidos en un ambiente controlado y recibieron comida y agua a

voluntad. Se proporcionó cuidado veterinario a los animales de acuerdo con el Comité Internacional del milenio de Cuidado y Uso de animales

Estudios de eficacia

Xenoinjertos CWR22

Ratones machos CB17-SCID (Laboratorios Charles River), aproximadamente de 8 a 11 semanas de edad fueron inoculados por vía subcutánea con fragmentos de tumor CWR22 recientemente disecados (~20 mg) en el flanco dorsal derecho. La media del volumen tumoral (MTV) fue calculada haciendo uso de la siguiente fórmula: $0.5 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$. Cuando la MTV alcanzó aproximadamente 150 a 200 mm³, los animales fueron aleatorizados en grupos de tratamiento (n = 10 por grupo) antes de la administración. La actividad anti tumor fue determinada al final del estudio calculando la proporción de tratamiento sobre control (T/C) de sus MTV al final del estudio.

Xenoinjertos WSU-DLCL2

Ratonas hembras CB17-SCID de ~6 semanas de edad fueron inoculadas por vía intravenosa con 4×10^6 WSU-DLCL2 células tumorales suspendidas en 0.1 mL RPMI 1640 en el flanco dorsal derecho. Los animales fueron aleatorizados, y la MTV y la proporción T/C fueron calculadas como se describió previamente.

Xenoinjertos OCI-Ly7-Luc diseminados

Ratonas hembras NOD-SCID de ~9 semanas de edad fueron inoculadas por vía intravenosa por la vena de la cola con células tumorales 1.0×10^6 OCI-Ly7. Los ratones fueron aleatorizados en grupos de tratamiento (n = 10 por grupo) el día 7 luego de la inoculación. Para cada sesión de imágenes los animales recibieron 150 mg/kg de luciferina (Caliper Life Sciences) a través de una inyección intraperitoneal. La vista dorsal y ventral de los animales fueron capturadas en imágenes para determinar el flujo de fotones total. Las imágenes fueron capturadas con el sistema de imágenes Xenogen IVIS (Xenogen Corp.), y la información fue recolectada con el software Xenogen Living Image (Living Image 3.0.2.2). La actividad antitumor fue determinada calculando la proporción T/C del flujo de fotones promedio al final del estudio. Las curvas de supervivencia fueron generadas haciendo uso del método Kaplan-Meier.

Análisis estadístico

Los datos de eficacia fueron analizados haciendo uso de un modelo de regresión de efecto mixto lineal. Las diferencias entre los ratones fueron tratadas como efectos aleatorios, y una estructura de covarianza simétrica compuesta fue utilizada para modelar la variabilidad entre medidas tumorales repetidas para cada ratón. Las comparaciones de los tratamientos fueron realizadas tomando curvas ajustadas del modelo para calcular Δ AUCs. La importancia de las Δ AUC fue evaluada haciendo uso de pruebas de permutación. Los valores P de ≤ 0.05 fueron considerados significativos. Para el estudio OCI-Ly7-Luc, las diferencias en el flujo total de fotones fueron comparadas haciendo uso de ANOVA de una sola vía y las comparaciones fueron ajustadas con el método Tukey-Kramer. Las curvas de supervivencia generadas haciendo uso del método Kaplan-Meier fueron comparadas haciendo uso de la prueba log-rank (Mantel-Cox) y las comparaciones por pares fueron ajustadas con la corrección Bonferroni.

Resultados y discusión

MLN2238 es un inhibidor de la proteasoma selectivo, potente y reversible. MLN9708 fue identificado en pantallas para inhibidores de proteasoma de molécula pequeña con un perfil farmacológico mejorado a comparación con el bortezomib (Fig1). En estudios preclínicos, MLN9708 inmediatamente hidrolizó a MLN2238 (ver datos suplementarios), la forma biológicamente activa, en la exposición a soluciones acuosas o plasma. En estudios en los que una solución de MLN9708 fue adicionada directamente en una rata, un perro o plasma humano e inmediatamente extraída y analizada por cromatografía líquida de alto rendimiento, únicamente se pudo identificar MLN2238. MLN2238 es un ácido borónico dipeptídico leucino N-recubierto y preferencialmente unido a e inhibido el sitio de tipo quimiotripsina proteolítico

($\beta 5$) de la proteasoma 20S con un valor IC_{50} de 3.4 nmol/L (K_i de 0.93 nmol/L; Tabla 1). En mayores concentraciones, también inhibió los sitios proteolíticos de tipo caspasa ($\beta 1$) y de tipo tripsina ($\beta 2$) (IC_{50} of 31 and 3,500 nmol/L, respectivamente). Aunque la selectividad y la potencia de MLN2238 fueron similares a aquellas del bortezomib, la cinética de unión de proteasoma para estas dos moléculas es diferente. Tanto MLN2238 como el bortezomib mostraron inhibición de proteasoma reversible dependiente del tiempo; sin embargo, se determinó que la vida media de disociación de proteasoma ($t_{1/2}$) para MLN2238 era ~6-veces más rápida que aquella del bortezomib ($t_{1/2}$ de 18 y 110 minutos, respectivamente).

MLN2238 es un potente inhibidor de la proteasoma en células tumorales. A partir de los resultados bioquímicos, una serie de experimentos basados en células fueron realizados para confirmar la potente inhibición de proteasoma en las células. La inhibición de la proteasoma resulta en la estabilización y acumulación de proteínas ubiquitinadas, las cuales han sido objeto de destrucción. Esto lleva a trastornos en el ciclo celular, la activación de caminos apoptóticos, y activa la muerte celular (39–43). Estudios iniciales examinaron los efectos del tratamiento MLN2238 en un sustrato de proteasoma exógeno. Las células MDA-MB-231 que expresan un indicador 4 $\times$ Ub-Luc (36) fueron tratadas con concentraciones en aumento de MLN2238 y bortezomib. Ambos compuestos inhibieron de manera fuerte la actividad de proteasoma, lo que resulta en la acumulación del indicador de luciferasa con valores EC_{50} similares (Tabla 1).

El efecto del bortezomib y de MLN2238 sobre la activación de necrosis tumoral de factor α (TNF- α)–inducido del camino NF- κ B fue igualmente examinada (44). La inhibición de la proteasoma previene la degradación de I κ B α , un inhibidor de NF- κ B, resultando en una disminución de la expresión del gen impulsado por in NF- κ B. Las células HEK293 que expresan de forma estable un indicador de NF- κ B-Luc fueron tratadas con concentraciones en aumento de MLN2238 y bortezomib. Ambos compuestos inhibieron de manera fuerte la activación de TNF- α – inducida del camino NF- κ B, resultando en valores EC_{50} similares (Tabla 1).

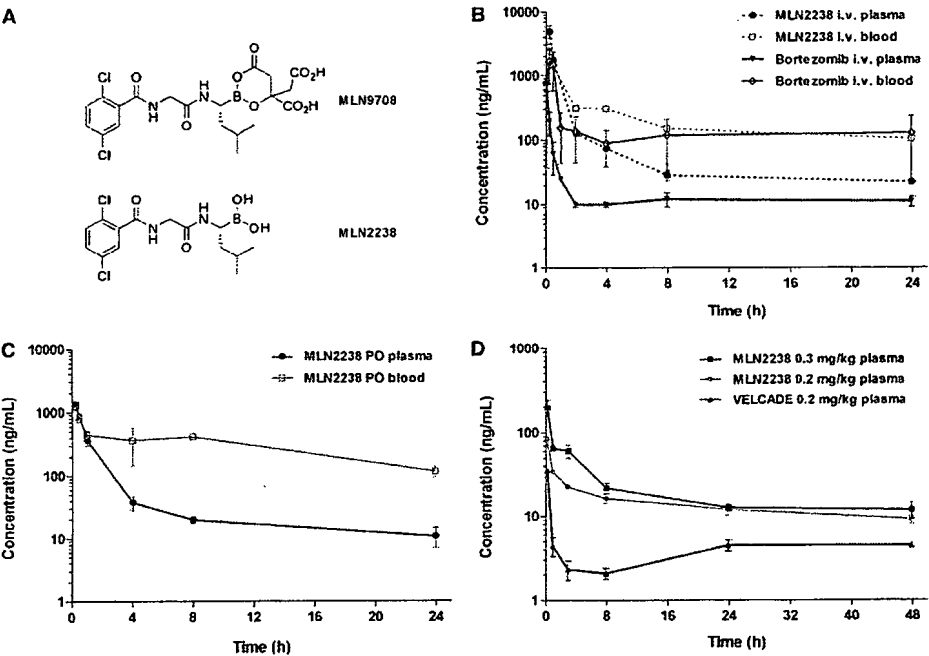


Figura 1. Estructura de MLN9708. A, concentración de sangre y plasma versus perfil de tiempo de MLN2238 y bortezomib en ratones CB-17SCID siguiendo una administración aguda por vía intravenosa (100 μ L por ratón) a 17 o 0.8 mg/kg, respectivamente. B, concentración de sangre y plasma versus perfil de tiempo siguiendo una administración aguda oral de MLN2238 en ratones CB17-SCID a 11 mg/kg (100 μ L por ratón). C, concentración de plasma versus perfil de tiempo siguiendo una administración aguda por vía intravenosa (200 μ L por rata) de MLN2238 y bortezomib en ratas desnudas a 0.3, 0.2 y 0.2 mg/kg, respectivamente. D, barras, SD. N=3 para todos los puntos excepto 0.5 h

después de la dosis en plasma para MLN2238 por vía intravenosa, 1 h después de la dosis en plasma para bortezomib por vía intravenosa y 0.5 y 8 horas después de la dosis en sangre para MLN2238 por vía oral (PO), en donde n =2.

El efecto de MLN2238 o el bortezomib sobre la actividad de $\beta 5$ fue determinada in situ haciendo uso de la evaluación Proteasoma-Glo basada en células. Los valores IC50 determinados por este ensayo luego de una hora de tratamiento con MLN2238 o bortezomib se encontraron en el rango nanomolar bajo y comparable con aquellos calculados con proteasoma 20S purificada. La recuperación de la actividad de proteasoma fue determinada llevando a cabo experimentos de lavado con MLN2238 o bortezomib. Las células fueron tratadas con el medicamento por 4 horas, luego de las cuales el medicamento fue removido y la actividad de proteasoma fue evaluada. La actividad de proteasoma en las células tratadas con MLN2238 se recuperó al 69% de las células de control, mientras que en las células tratadas con bortezomib se recuperó tan solo al 20% (Tabla 1). La diferencia en la recuperación de la actividad de proteasoma entre MLN2238 y el bortezomib es consistente con las diferencias observadas en la proteasoma t1/2 entre las dos moléculas.

Los estudios de viabilidad celular fueron llevados a cabo en una variedad de líneas celulares de mamíferos para comparar los efectos antiproliferativos in vitro de MLN2238 con el bortezomib. Los estudios llevados a cabo con células A375 (pulmón), H460 (pulmón), HCT-116 (colon), y HT-29 (colon) revelaron valores LD50 similares para los dos compuestos, los cuales oscilaron entre 4 a 58 nmol/L (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de parámetros de enzimología, farmacocinética y fármaco dinámica de MLN2238 y bortezomib						
			MLN2238		Bortezomib	
Ensayos bioquímicos						
$\beta 5$ Ki (nmol/L)			0.93 (0.64–1.4, n = 3)		0.55 (0.34–0.89, n = 3)	
$\beta 5$ IC ₅₀ (nmol/L)			3.4 (2.8–4.1, n = 3)		2.4 (2.0–2.9, n = 45)	
$\beta 2$ IC ₅₀ (nmol/L)			3,500		1,200	
$\beta 1$ IC ₅₀ (nmol/L)			31		24 (14.5–40, n = 12)	
$\beta 5$ disociación de media vida (min)			18 (6.8–30, n = 3)		110 (71–150, n = 3)	
Ensayos basados en células						
MDA-MB-231 4×Ub-Luc EC ₅₀ (nmol/L)			525 (330–840, n = 4)		310 (230–400, n = 29)	
E _{max} (veces de estimulación)			265 (160–370, n = 4)		370 (330–410, n = 29)	
HEK293 NF- κ B-Luc EC ₅₀ (nmol/L)			55 (33–91, n = 7)		33 (27–40, n = 23)	
E _{max} (% inhibición máxima)			99.3 (99.0–99.6, n = 7)		99.6 (99.3–100, n = 23)	
Calu-6 Proteasome-Glo IC ₅₀ (nmol/L)			9.7 (n = 7)		4.8 (n = 12)	
Calu-6 Proteasoma-Glo (% actividad),* t = 4 h, sin lavado			7.1 (3.6–10.6, n = 5)		3.45 (2.0–4.9, n = 5)	
Calu-6 Proteasoma-Glo (% actividad),* t = 4 h, lavado			69 (66–71, n = 5)		20 (18–23, n = 5)	
A375 ATPlite LD ₅₀ (nmol/L)			20		6.5	
H460 ATPlite LD ₅₀ (nmol/L)			58		13	
HCT-116 ATPlite LD ₅₀ (nmol/L)			19		4	
HT-29 ATPlite LD ₅₀ (nmol/L)			52		7	
Parámetros farmacocinéticos						
Agente	Dosis y ruta	Matriz	C _{max} (ng7mL9	AUC _{0–24h} (h·ng/mL)	Vd (L/kg)	F%
MLN2238	14 mg/kg i.v	Plasma	17,000	8.090		
	14 mg/kg i.v	Sangre	10.500	9.660	20.2	
	11 mg/kg oral	Plasma	1.630	1.810	27.8	
	11 mg/kg oral	Sangre	1.710	6.310	59.5	
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Plasma	321	485		
	0.8 mg/kg i.v.	Sangre	548	4422	4.3	
Parámetros fármaco dinámicos						
MLN2238	14 mg/kg i.v	Sangre		83.1 †	718 †	
	14 mg/kg i.v	Tumor (CWR22)		69.1	1120	1.56
	14 mg/kg i.v	Tumor (WSU – DLCL2)		77.0	1460	2.03
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Sangre		88.3 ‡	1170‡	
	0.8 mg/kg i.v.	Tumor (CWR22)		44.8	804	0.69

0.8 mg/kg i.v.	Tumor (WSU – DLCL2)	27.6	306	0.26
NOTA: Los resultados son reportados como media (95% intervalo de confianza, número de experimentos) Abreviaciones: K _i , constante de disociación de inhibición; E _{max} , máximo efecto; F%, biodisponibilidad oral; t = tiempo; AUC _{0-24 h} , AUC desde 0 a 24 h; C _{max} , concentración máxima; Vd, volumen de distribución; I%, porcentaje de inhibición. * Después de la exposición a 1 µmol/L o 1 µmol/L de bortezomib por 30 min. † Para MLN2238, sangre E _{max} = 81.3 % a 85.0% (n=2) y AUE _{0-24 h} = 554 a 882 (n=2) ‡ Para bortezomib sangre E _{max} = 86.8% a 89.8% (n = 2) y AUE _{0-24 h} = 1,140 a 1,200 (n = 2).				

En conjunto, estos estudios in vitro muestran que MLN2238 es un potente inhibidor del sitio β5 de la proteasoma 20S y que MLN2238 se disoció más rápidamente de la proteasoma que el bortezomib, en consistencia con una recuperación más rápida de la actividad de proteasoma observada en el ensayo de Proteasome-Glo. Dadas las altas concentraciones de proteasoma encontradas en los RBCs, esgrimimos la hipótesis de que la división de RBC podría servir como un dissipador de medicamento para el bortezomib y limitar su distribución por fuera del compartimiento sanguíneo. La proteasoma más pequeña t_{1/2} de MLN2238 debería permitir una distribución del medicamento en los tejidos. Para abordar este aspecto de forma directa, una serie de estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y de eficiencia con MLN2238 y bortezomib fueron realizados en diferentes modelos de xenoinjertos.

Farmacocinética de MLN2238 y bortezomib

Para determinar el perfil farmacocinético de MLN2238 y el bortezomib, se les administró a los ratones una dosis única de MLN2238 a 14 mg/kg por vía intravenosa y 11 mg/kg oralmente o bortezomib a 0.8 mg/kg por vía intravenosa. Estas dosis representan la dosis máxima tolerada (MTD) para cada medicamento para la vía de administración especificada. Las exposiciones fueron determinadas midiendo la concentración de medicamento sanguínea y de plasma en varios puntos en tiempo luego de la dosis inicial (Tabla 1). La curva de concentración versus tiempo de MLN2238 administrado por vía intravenosa mostró un perfil biexponencial diferente con una fase de distribución inicial empinada y una terminal larga t_{1/2} (>24 horas ; Fig. 1B). Debido a la extensa división de RCB, la distribución de tejidos de cuerpo entero es reflejada de manera más precisa en la distribución de volumen de sangre en estado estable (Vd_{ss, s}) más que en la distribución de volumen de plasma en estado estable (Vd_{ss, p}). MLN2238 mostró un mayor Vd_{ss, s} (20.2 L/kg) a comparación con el bortezomib (4.3 L/kg), proporcionando sólida evidencia de que MLN2238 se mueve más fácilmente del compartimiento sanguíneo al compartimiento del tejido. MLN2238 igualmente mostró una biodisponibilidad moderada (Tabla 1; Fig. 1C). Para determinar el perfil farmacocinético de MLN2238 y el bortezomib en segundas especies, se les administró a ratas Sprague-Dawley una dosis intravenosa única de MLN2238 a bien sea 0.3 o 0.2 mg/kg o bortezomib a 0.2 mg/kg. Ambas dosis de MLN2238 proporcionaron una exposición de plasma mayor (dosis AUC_{0-48h} de 704 y 1,070 h·ng/mL para 0.2 y 0.3 mg/kg, respectivamente) a comparación con el bortezomib (AUC_{0-48h} of 206 h·ng/mL), confirmando que MLN2238 tiene una exposición de plasma mejorada a comparación con el bortezomib en los roedores (Fig. 1D).

MLN2238 induce una mayor respuesta farmacodinámica que el bortezomib en tumores xenoinjertos.

Para una evaluación adicional de la actividad de MLN2238 in vivo, una serie de estudios farmacodinámicos fueron desarrollados en ratones CB17-SCID usando próstata humana (CWR22). La respuesta fármaco dinámica fue evaluada por medio de la medición de (a) el grado de inhibición de proteasoma 20S y (b) los niveles de expresión de la proteína GADD34.

La inhibición de la proteasoma 20S en sangre y tumores fue generada por MLN2238 y bortezomib desde ambos CWR22 y xeno implantes WSA-DLCL2 (Fig.2) la AUE fue calculada desde 0 hasta 24 horas (AUE_{0-24h}) tanto para sangre como para tumor (Tabla 1) estas AUEs representa la suma del efecto fármaco dinámico sobre un periodo definido de tiempo en un compartimiento de tejido particular. Calculando la tasa AUE de tumor y sangre proporcionando una reflexión funcional de la distribución y del efecto fármaco dinámico perdurable del medicamento en diferentes compartimientos de tejido. El nivel máximo de inhibición de proteasoma en sangre (E_{max}) seguido de una dosis aguda intravenosa bien

sea de MLN2238 (83.1%) o bortezomib (88.3%) fue cercanamente idéntica (Tabla 1). Sin embargo, la duración del efecto difiere entre la dos moléculas, teniendo con bortezomib una respuesta mas sostenida y, por lo tanto, un AUE mayor en sangre que MLN2238 (Fig. 2B y D) en contraste con la sangre, MLN2238 mostró una tanto una mayor y máxima y sostenida inhibición de proteasoma de tumor comparada con bortezomib en ambos modelos de xenoinplante (Tabla 1; Fig 2^a y C) la tasa de sangre y tumor para MLN2238 en CWR22s y WSU-DLCL2s fue 1.56 y 2.03, respectivamente, comparada con 0.69 y 0.29 para bortezomib (Tabla 1). Consistente con los perfiles farmacocinéticos descritos para estas dos moléculas (es decir, MLN2238 tiene un mayor $V_{d_{ss}}$), estos resultados mostraron que MLN2238 tuvo un mayor efecto farmacodinámico en tumor comparado con sangre, mientras que lo contrario fue cierto para bortezomib. Consistente con el tumor mejorado E_{max} en ratones tratados MLN2238, estos datos confirman que MLN2238 tuvo un mayor efecto farmacodinámico general que el bortezomib tal y como fue evaluado por la inhibición de 20S.

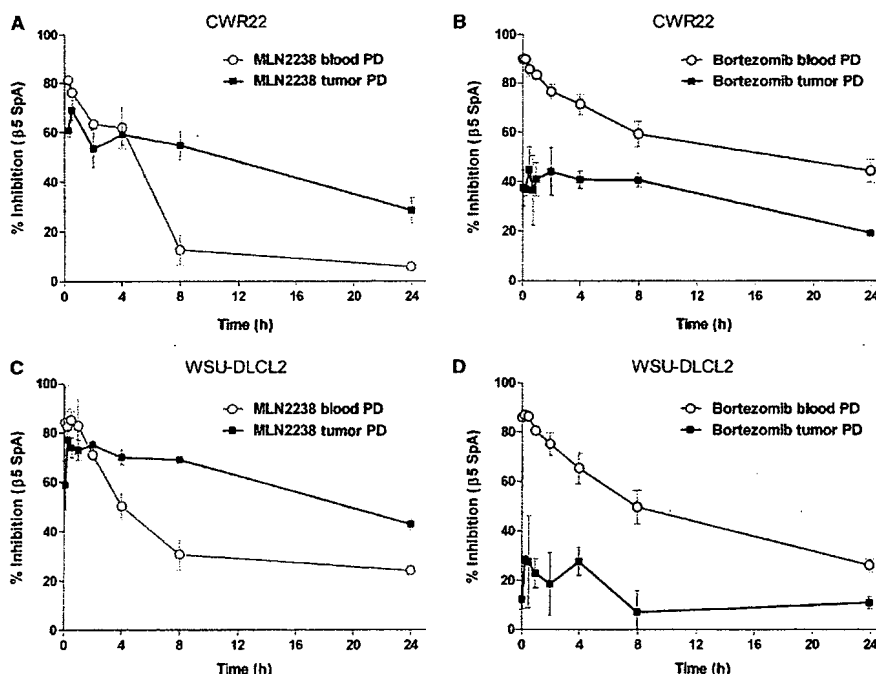


Figura 2. Inhibición de la proteasoma versus perfil de tiempo de MLN2238 (14 mg/kg; A y C) y bortezomib (0.8 mg/kg; B y D) siguiendo una administración aguda por vía intravenosa en CWR22 (A y B) y WSU-DLCL2 (C y D) ratones que llevan tumores. La respuesta farmacodinámica en sangre y tumores fue determinada por medio de la medición de la inhibición de la enzima $\beta 5$ de la proteasoma 20S en sangre y tumores en diferentes puntos de tiempo.

Fueron evaluados marcadores adicionales de farmacodinámica para estudiar el efecto descendiente de la inhibición de la proteasoma. Una de las consecuencias de la inhibición de la proteasoma es la acumulación de las proteínas asociadas con el estrés de la vía de tensión de reticulum endoplásmico (ER) y de la vía de respuesta de proteínas desdobladas (UPR) (11, 45-50). Una de estas proteínas es GADD34, un gen de tensión inducible que también es sobre regulado en respuesta a daños en el ADN, hipoxia, y agotamiento de energía (51). Los análisis de Western blot fueron realizados en tumores aislados a partir de ratones CWR22 y WSU-DLCL2 que llevaban xenoinplantes tanto con MLN2238 como con bortezomib (Fig 3). El incremento de la expresión de GADD34 fue visto en tumores CWR22 xeno implantados siguiente tratamiento de MLN2238 o bortezomib, mientras que una respuesta aun mayor fue vista siguiendo el tratamiento MLN2238 (Fig 3A). De manera similar, el tratamiento con bortezomib solo

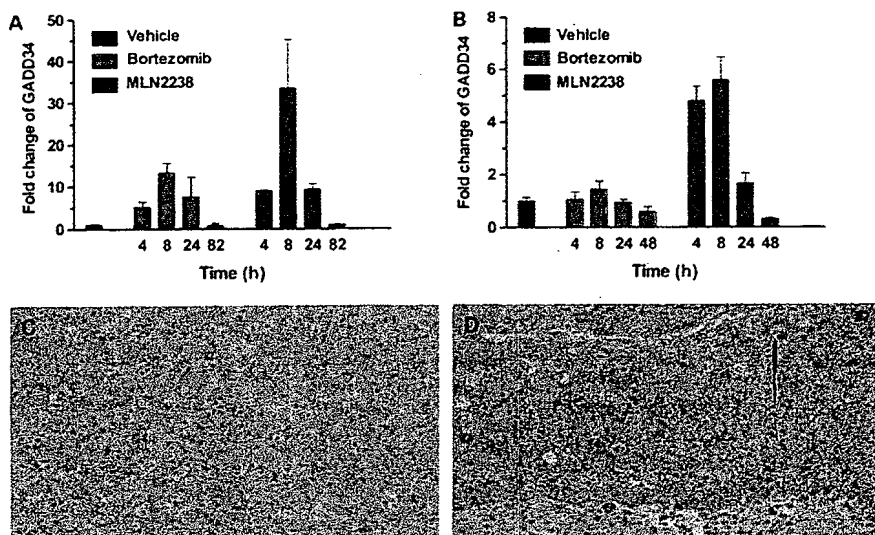


Figura 3. La respuesta fármaco dinámica en tumores fue determinada por medio de la medida de los niveles de la proteína GADD34 en diferentes puntos de tiempo por medio de western blot y cuantificada con un Sistema de imágenes Infrarojo Odyssey. A y B, respuesta normalizada de GADD34 versus perfil de tiempo se muestran como factor de cambio del vehículo de control siguiendo una administración aguda por vía intravenosa de MLN2238 a 10 mg/kg y bortezomib a 0.8 mg/kg en ratones que llevan tumores CWR22 (A) y WSU – DLCL2 (B). Las columnas, media de tres tumores por grupo, excepto el grupo de vehículo CWR22 con cuatro tumores y el grupo de vehículo WSU – CLDL2 con 5 tumores; las barras, SD. La coloración inmunohistoquímica (C y D) para GADD34 en tumores xenoinplantados CWR22 8h siguiendo una dosis aguda intravenosa de cualquiera de los vehículos (C) o MLN2238 a 14 mg/kg (D).

llevó a un menor incremento en los niveles de GADD34 en tumores xeno implantados WSU.DLCL2, en donde MLN238 induce fuertemente su expresión (Fig 3B). Para confirmar estos resultados y para tener un mejor entendimiento de la magnitud de la respuesta a través de células individuales dentro del tumor, se desarrolló una coloración inmunohistoquímica usando en anticuerpo anti-GADD34 (Proteintech). Una coloración fuerte GADD34, reflejando un incremento en los niveles de proteína GADD34, fue vista a través de la mayoría de las células del tumor en xenoinplantados CRW22 8 horas después de una dosis intravenosa única de MLN2238 a 14mg/kg (Fig. 3D) comparada con una muy baja coloración en los xenoinplantados CRW22 tratados con vehículos (Fig. 3C). Aproximadamente un incremento de 5 veces el número total de células positivas de GADD34 fueron vistas 8 y 24 horas después del tratamiento con MLN2238 en comparación con el vehículo de los tumores de control tratados (Fig. suplementaria S1). En los tumores xenoinplantados WSU-DLCL2, el tratamiento con bortezomib lleva solo a un menor incremento en los niveles de GADD34 medidos por western blot, en donde MLN2238 induce fuertemente su expresión (Fig. 3B). De manera adicional, examinando los niveles de ATF3, otro gen sobre regulado durante la tensión ER y la activación UPR (48, 52, 53) reveló un patrón similar, con un mayor número de celular con coloración positivamente para ATF3 siguiendo un tratamiento de tumores xenoinplantados WSU.DLCL2 con MLN2238 en comparación con bortezomib (Fig. suplementaria S2). Estos resultados confirman que la mejor exposición de los tumores vista con MLN2238 trasladada dentro de una farmacodinámica mejorada del tumor responde tanto al nivel como de manera descendiente desde la proteasoma.

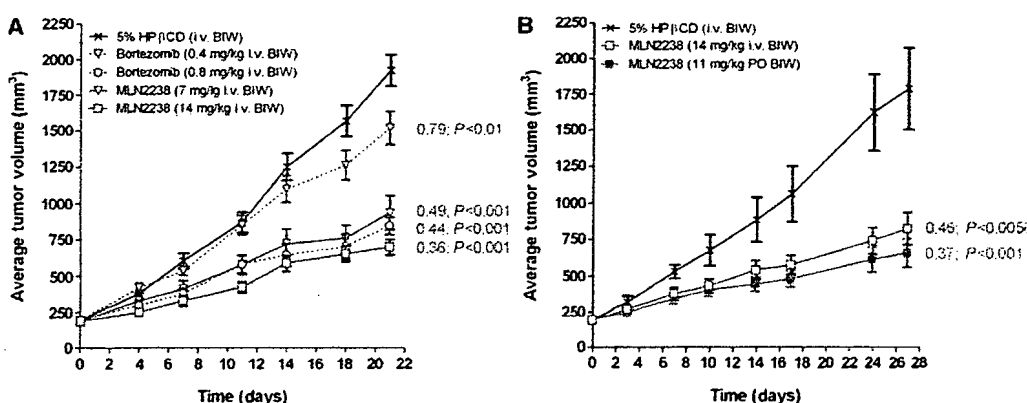


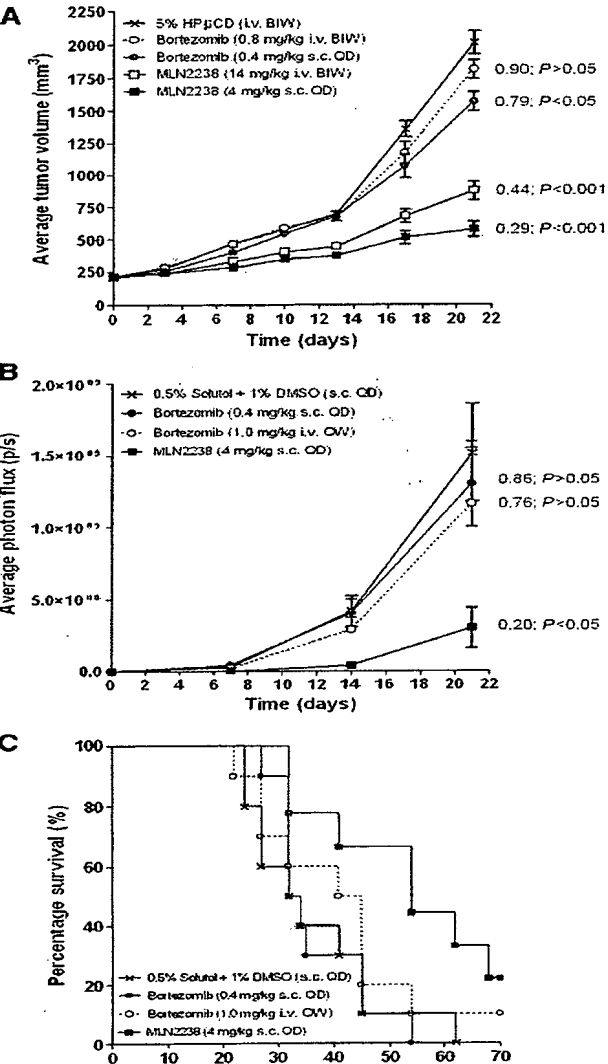
Figura 4. Actividad anti tumor de MLN2238 y bortezomib en ratones que llevan tumores CWR22 (n =10). A. los animales fueron dosificados por vía intravenosa dos veces a la semana (BIW) con un vehículo (5% HPβCD) bortezomib (0.4 y 0.8 mg/kg en salina 0.9%), y MLN2238 (7 y 14 mg/kg en 5% HPβCD). B. los animales fueron dosificados por vía intravenosa dos veces a la semana con un vehículo, dos veces a la semana por vía intravenosa con MLN2238 (14 mg/kg), o por vía oral dos veces a la semana con MLN2238 (11 mg/kg). Los puntos, volumen promedio del tumor en cada grupo de tratamiento; barras, SE. Valores T/C y P fueron calculados tal y como se describe en Materiales y Métodos. Un valor P ≤0.05 fue considerado como significativo.

MLN2238 muestra una actividad anti tumor en el modelo de xenoimplante CWR22.

Para confirmar que la respuesta fármaco dinámica vista en los xenoimplantes CWR22 se podría trasladar dentro de la actividad anti tumor, una serie de experimentos de eficacia fueron llevados a cabo comparando MLN2238 con bortezomib.

Los efectos antitumor de MLN2238 dosificado a 14mg/kg de manera intravenosa o 7 mg/kg de manera intravenosa fueron comparados con bortezomib dosificado a 0.8 mg/kg de manera intravenoso o 0.4 mg/kg de manera intravenosa en un régimen de dos veces a la semana (Fig 4A). La dosis más alta tanto para MLN2238 como para bortezomib mostraron una actividad anti tumor similar en este modelo (T/C = 0.36 y 0.44 respectivamente). Sin embargo, MLN2238 (7 mg/kg) mostró mayor eficacia a una dosis de 0.5 MTD en comparación con una dosis de 0.5 MTD de bortezomib (0.4 mg/kg: T/C = 0.4 en comparación con T/C = 0.79 respectivamente; Fig. 4A).

MLN2238 tiene una biodisponibilidad moderada (Tabla 1) en la Fig 4B, nosotros mostramos que la dosis oral de MLN2238 resultó en una actividad anti tumor en el modelo xenoimplante CWR22 (T/C = 0.37) . Tomado en conjunto, estos resultados muestran que el modelo de próstata humana es sensible a la inhibición de proteasoma. Adicionalmente, una comparación directa entre MLN2238 y bortezomib reveló una actividad anti tumor similar cuando es dosificada a sus respectivos MTD; sin embargo, cuando ambos compuestos fueron dosificados a sus respectivos 0.5 MTD, MLN2238 mostró una actividad mejorada por sobre bortezomib (Fig 4A).



MLN2238 mostró una eficacia mejorada en comparación con bortezomib en dos modelos de linfoma.

MLN2238 mostró una mayor respuesta fármaco dinámica en xenoimplantes WSU-DLCL2 en comparación con bortezomib (Tabla 1; Figs. 2 y 3). Para evaluar si la respuesta fármaco dinámica más robusto es trasladada a una mayor actividad anti tumor, fue llevado a cabo un estudio de eficacia en ratones WSU-DLCL2 que llevaban tumores. Los efectos anti tumor de MLN2238 [dosificado a 14 mg/kg vía intravenosa dos veces a la semana o 4 mg/kg vía subcutánea una vez al día (QD)] fueron directamente comparados con bortezomib (Dosificado a 0.8 mg/kg vía intravenosa dos veces a la semana o 0.4 mg/kg por vía subcutánea QD; Fig 5A). En este experimento, ninguna de las dosis de bortezomib mostró una fuerte actividad anti tumor (T/C = 0.79 y 0.9 para 0.8 mg/kg por vía intravenosa y 0.4 mg/kg por vía subcutánea, respectivamente). En contraste tanto regímenes de dosificación intermitente

15

como regímenes de dosificación continuo de MLN2238 mostraron una fuerte actividad anti tumor (T/C = 0.44 y 0.29 for 14 mg/kg por vía intravenosa y mg/kg por vía subcutánea, respectivamente) y generaron una respuesta apoptotica mayor en tejidos de tumor tal y como fue medido por los niveles de caspasa-3 escindidos (Fig. suplementaria S3).

Figura 5. La actividad anti tumor de MLN2238 y bortezomib en dos modelos de linfoma xenoinplantado. Cada grupo de tratamiento consistió en 10 ratones. A. la actividad anti tumor en xenoinplantos WSU – DLCD2. Los animales fueron dosificados con un vehículo (5% HPβCD por vía intravenosa dos veces a la semana) bortezomib (0.8 mg/kg dos veces a la semana o 0.4 mg/kg por vía subcutánea QD) o MLN2238 (14 mg/kg por vía intravenosa dos veces a la semana o 4 mg/kg por vía subcutánea QD) por tres semanas consecutivas. B, la actividad anti tumor en el modelos de linfoma diseminado OCI-Ly7-Luc. Los animales fueron dosificados con un vehículo (0.5% Solutol + 1% DMSO por vía subcutánea QD) bortezomib (0.4 mg/kg en salina 0.9% por vía subcutánea QD), bortezomib (1.0 mg/kg en salina 0.9% por vía intravenosa QW) o MLN2238 (4 mg/kg en 0.5 Solutol + 1% DMSO vía subcutánea QD) por 3 semanas consecutivas. Los Puntos, volumen promedio de los tumores; barras, SE. La valores T/C y P fueron calculados tal y como fue descrito en Materiales y Métodos. Un valor P de ≤0.05 fue considerado como significativo. C, perfil de supervivencia Kaplan-Meier.

La actividad anti tumor de MLN2238 y bortezomib fue evaluada en un modelo diseminado de linfoma. La capacidad de los dos medicamentos para reducir la carga tumoral y mejorar la supervivencia general fue evaluada en este modelo de linfoma sistémico. Ratones NOD-SCID fueron inoculados con células OCI-Ly7-Luc expresando un gen de reporte de luciferasa. Escaneos bioluminiscentes, obtenidos por medio de formación de imágenes cuantitativas Xenogen, permitió el seguimiento del crecimiento del tumor en animales vivos a través del tiempo. La más fuerte respuesta anti tumor fue vista siguiendo el tratamiento con MLN2238 a 4.0 mg/kg por vía subcutánea QD (T/C = 0.20; Fig 5B). Este régimen de dosificación también prolongó de manera significativa la supervivencia general en este modelo en comparación con los vehículos de control tratados (la supervivencia media fue de 54 días versus 33 días, P = 0.05; Fig. 5C). Una respuesta anti tumor mucho más débil fue vista siguiendo el tratamiento con bortezomib a 0.4 mg/kg por vía subcutánea QD o 1.0 mg/kg por vía intravenosa una vez a la semana (T/C = 0.86 y 0.76 respectivamente). Este régimen de dosificación de bortezomib tampoco prolongó de manera significativa la supervivencia (la supervivencia media fue de 33 y 43 días respectivamente; P > 0.99 para ambos; Fig. 5C).

En resumen, hemos identificado una segunda generación de pequeñas moléculas inhibidores de la proteasoma. Estas tienen unas propiedades fisico químicas diferentes en comparación con el bortezomib, incluyendo una disociación más corta de la proteasoma $t_{1/2}$, la cual nosotros creemos que juega un rol crítico en la capacidad de esta molécula para distribuir dentro de los tejidos. Una farmacocinética y tolerabilidad mejoradas permiten que esta molécula sea administrada en dosis más altas, resultando en una mayor exposición de la sangre y el plasma. De manera consistente con estos hallazgos, hemos encontrado una mayor respuesta fármaco dinámica en múltiples modelos de xenoinplantos tratados con MLN2238 n comparación con bortezomib, particularmente en tumores, soportando nuestra hipótesis de que MLN2238 tiene unas características de distribución mejoradas. La biodisponibilidad superior también permite a esta molécula ser dosificada por vía oral, en donde bortezomib está restringido regímenes de dosificación intravenoso y subcutáneo para alcanzar niveles de exposición aceptables. Los datos generados tanto de los estudios de eficacia subcutánea como de xenoinplantos diseminados muestran que MLN2238 tiene una mayor actividad anti tumor cuando es administrado bien sea por regímenes de dosificación continuos o intermitentes y mejora la supervivencia general en comparación con el bortezomib. Tomados en conjunto, estos datos soportan el desarrollo clínico de MLN9708, tanto para indicación de tumores sólidos como hematológicos.

Revelación de conflictos de intereses potenciales

Ningún conflicto de intereses potencial fue revelado.

Reconocimientos:

Los gastos de publicación de este artículo fueron sufragados en parte por el pago de cargos por página. Este artículo debe, por tanto, por la presente estar marcado como *publicidad* de conformidad con la Sección 1734 de 18 USC exclusivamente para indicar este hecho.

Recibido el 24 de julio de 2009, revisado el 14 de diciembre de 2009; aceptado el 15 de diciembre de 2009, publicado en OnlineFirst el 16 de febrero de 2010.

Referencias:

1. Orlowski RZ, Kuhn DJ. Inhibidores de la proteasoma en la terapia de cáncer: lecciones desde la primera década. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1649–57.
2. Dalton WS. La Proteasoma. *Semin Oncol* 2004; 31:3–9; discusión 33.
3. Delic J, Masdehors P, Omura S, et al. El inhibidor de la proteasoma lactacistina induce la apoptosis y sensibiliza la quimio y la radio resistencia crónica en humanos de linfocitos en leucemia linfocítica para apoptosis iniciada TNF- α - [ver comentarios]. *Br J Cancer* 1998; 77:1103–7.
4. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. El inhibidor de Proteasoma PS-341 inhibe el crecimiento de células de mieloma humano in vivo y prolonga la supervivencia en un modelo murino. *Cancer Res* 2002; 62:4996–5000.
5. Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, et al. Inhibición del crecimiento de tumores inducidos en un modelo murino de linfoma humano de Burkitt por un inhibidor de proteasoma. *Cancer Res* 1998; 58:4342–8.
6. Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, et al. Inducción de Apoptosis resultante desde la inhibición de la proteasoma. *Biochem J* 1996; 317:385–8.
7. Adams J. Inhibidores de proteasoma como nuevos medicamentos anti cáncer. *Curr Opin Oncol* 2002; 14:628–34.
8. Adams J. Potencial para la inhibición de la proteasoma en el tratamiento de cáncer. *Drug Discov Today* 2003; 8:307–15.
9. Adams J. El desarrollo de los inhibidores de proteasoma como medicamentos anti cáncer. *Cancer Cell* 2004;5:417–21.
10. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Descubrimiento de medicamentos en el Sistema ubiquitin proteasoma. *Nat Rev* 2006; 5:596–613.
11. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Inhibidores de la Proteasoma; efectos antitumor y mas alla. *Leukemia* 2007; 21:30–6.
12. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. La proteasoma como un objetivo para la terapia de cáncer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6316–25.
13. Belch A, Kouroukis CT, Crump M, et al. Un estudio de fase II de bortezomib en linfoma de células del manto: el Instituto de Cáncer de Canadá Grupo de Pruebas Clínicas prueba IND.150. *Ann Oncol* 2007;18:116–21.
14. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Estudio multi central fase II de bortezomib en pacientes con linfoma de células del manto en recaída o resistente. *J Clin Oncol* 2006; 24:4867–74.
15. Goy A, Younes A, McLaughlin P, et al. Estudio de fase II de inhibidor de proteasoma bortezomib en recaída o resistentes en células B de linfoma de non-Hodgkin. *J Clin Oncol* 2005; 23:667–75.
16. O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, et al. Fase II de experiencia clínica con el Nuevo inhibidor de proteasoma bortezomib en pacientes con linfoma indolente de non-Hodgkin y linfoma de células del manto. *J Clin Oncol* 2005; 23:676–84.
17. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Ensayo Fase I del inhibidor de proteasoma PS-341 en pacientes con tumores malignos hematológicos resistentes. *J Clin Oncol* 2002; 20:4420–7.
18. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Un estudio de fase 2 de bortezomib en mieloma en recaída o resistente. *N Engl J Med* 2003; 348:2609–17.
19. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Seguimiento extendido de un ensayo de fase II en mieloma múltiple en recaída o resistente: tiempo final para los resultados del evento desde el ensayo SUMMIT. *Cancer* 2006; 106:1316–9.

20. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Seguimiento extendido de un ensayo de fase III en mieloma múltiple en recaída: tiempo final para los resultados del evento desde el ensayo APEX. *Blood* 2007;110:3557-60
21. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib o una lata dosis de dexametasona para mieloma múltiple en recaída, *N Engl J Med* 2005;352:2487-98.
22. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M, et al. Combinación de los inhibidores de proteasoma bortezomib y el disparador NPI-0052 in vivo de citotoxinas sinérgicas en mieloma múltiple. *Blood* 2008;111:1654-64
23. Cusack JC, Jr., Liu R, Xia L, et al. NPI-0052 incrementa la respuesta tumoricida para la terapia de cáncer convencional en un modelo de cáncer de colon. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6758-64.
24. Demo SD, Kirk CJ, AujayMA, et al. Actividad anti tumor de PR-171, un Nuevo inhibidor irreversible de la proteasoma. *Cancer Res* 2007; 67:6383-91.
25. Dorsey BD, Iqbal M, Chatterjee S, et al. Descubrimiento de un inhibidor de proteasoma potente, selectivo y oralmente activo para el tratamiento del cáncer. *J Med Chem* 2008; 51:1068-72.
26. Mitsiades CS, Hayden PJ, Anderson KC, Richardson PG. Desde el banquillo hasta la cabecera: surgimiento de nuevos tratamientos en mieloma múltiple. *Best Pract Res* 2007; 20:797-816.
27. Piva R, Ruggeri B, Williams M, et al. CEP-18770: un inhibidor de proteasoma novedoso y oralmente activo con un perfil farmacológico selectivo de tumores competitivo con el bortezomib. *Blood* 2008; 111:2765-75.
28. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, et al. El potencial de los inhibidores de proteasoma en la terapia de cáncer. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17:879-95.
29. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potente actividad de carfilzomib, un inhibidor novedoso e irreversible de la ruta de ubiquitin proteasoma, en contra de modelos preclínicos de mieloma múltiple. *Blood* 2007; 110: 3281-90.
30. Stapnes C, Doskeland AP, Hatfield K, et al. el inhibidor de proteasoma bortezomib y PR-171 tiene efectos anti proliferativos y proapoptóticos en células de leucemia mieloide aguda humanas primarias. *Br J Haematol* 2007; 136:814-28.
31. Arendt CS, Hochstrasser M. Identificación de los centros catalíticos de levadura 20S proteasoma y de interacciones requeridas de subunidades para formación activa in sitio. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:7156-61.
32. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. La proteasoma: paradigma de una proteasa auto compartimentada. *Cell* 1998; 92:367-80.
33. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Estructura y funciones de las proteasomas 20S y 26S. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:801-47.
34. Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ. La última picadora de nano escala: ensamble, estructura y sitios de actividad del núcleo de la proteasoma 20S. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:1562-78.
35. Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Inhibidores potentes y selectivos de la proteasoma: ácidos dipeptídico bórico. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:333-8.
36. Williamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ, et al. Comparación de los efectos bioquímicos y biológicos de ML858 (salinosporamida A) y bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:3052-61.
37. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Mediciones de inhibición de proteasoma: aplicación clínica. *Clin Chem* 2000; 46:673-83.
38. Elliott PJ, Soucy TA, Pien CS, Adams J, Lightcap ES. Ensayos para la inhibición de la proteasoma. *Métodos Mol Med* 2003; 85:163-72.
39. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, et al. Expresión anormalmente alta de proteasomas en células leuquémicas humanas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:7071-5.
40. Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW. Ubiquitin y el borde proteolítico ATP-independiente de p21 por la ruta REGy-proteasoma. *Mol Cell* 2007; 26:831-42.
41. Tambyrajah WS, Bowler LD, Medina-Palazon C, Sinclair AJ. Células ciclo dependientes con actividad similar a la caspasa que escinden p 27(KIP1) es la sub unidad $\beta(1)$ de la proteasoma 20S. *Arch Biochem Biophys* 2007; 466: 186-93.
42. Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. Un signo de degradación localizado en el término - C de p21WAF1/CIP1 es un sitio de vínculo para la α -sub unidad C8 de la proteasoma 20S. *EMBO J* 2001; 20:2367-75.
43. Ang XL, Harper JW. Osciladores entrelazados de y control del ciclo de transiciones. *Sci STKE* 2004; 2004:pe31.
44. Karin M, Lin A. NF- κ B en los caminos cruzados de la vida y la muerte. *Nat Immunol* 2002; 3:221-7.

45. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Los inhibidores de proteasoma interrumpen la respuesta de la proteína desplegada en células de mieloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:9946–51.
46. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. El inhibidor de proteasoma PS-341 induce apoptosis través de la inducción de especies de oxígeno reactivas al estrés del retículo endoplásmico en células de carcinoma de células escamosas del cuello. *Mol Cell Biol* 2004; 24:9695–704.
47. Kraus M, Malenke E, Gogel J, et al. El Ritonavir induce es estrés del retículo endoplásmico y sensibiliza las células a través de la apoptosis inducida de bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:1940–8.
48. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. Los inhibidores ERAD integran estrés ER con un mecanismo epigenético para la actividad única BH3 de la proteína NOXA en células de cáncer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2200–5.
49. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. La producción extensiva inmunoglobulina sensibiliza las células de mieloma para la inhibición de la proteasoma. *Cancer Res* 2007; 67:1783–92.
50. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Los inhibidores de proteasoma inducen una respuesta terminal de la proteína desplegada en células de mieloma múltiple. *Blood* 2006; 107:4907–16.
51. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. Gen mamífero GADD34, apoptosis- y un gen de daño de ADN inducible. *J Biol Chem* 1997; 272:13731–7.
52. Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 y respuestas de estrés. *Gene Expr* 1999; 7:321–35.
53. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, et al. La activación de la transcripción del factor 3 está integrada a la iniciación eucariótica de la respuesta de factor 2 de estrés de quinasa. *Mol Cell Biol* 2004;24: 1365–77.

Corrección: Evaluación del Inhibidor de la Proteasoma MLN9708 en modelos Preclínicos de cáncer humano

En este artículo (Cancer Res 2010;70:1970–80), el cual fue publicado en la edición del 1 de marzo de 2010 de Cancer Research (1), Paul Hales (Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts) debió haber sido incluido como el noveno autor. El artículo en línea ha sido cambiado para reflejar esta corrección y ya no coincide con la versión impresa.

Referencia

1. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, Yang Y, Hales P, Bruzzese F, Liu J, Blank J, Garcia K, Tsu C, Dick L, Fleming P, Yu L, Manfredi M, Rolfe M, Bolen J. Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en modelos preclínicos de cáncer humano. Cancer Res 2010;70:1970–80.

Publicado en OnlineFirst el 27 de Abril de 2010

© 2010 Asociación Americana para la Investigación del Cáncer

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0973

Corrección: fechas de publicación en línea para artículos de Cancer Research del 15 de abril 2010

Los siguientes artículos en la edición del 15 de abril de 2010 fueron publicadas con una fecha de publicación en línea listada el 6 de abril de 2010, pero fueron actualmente publicadas en línea el 13 de abril de 2010:

Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresch D, Ginsberg M, Varner JA. La señalización de la integrina $\alpha 4 \beta 1$ es requerida para limfangiogénesis y metástasis de tumor. *Cancer Res* 2010;70:3042–51. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3761.

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracilo mata selectivamente las células supresoras asociadas a tumores derivadas mieloide resultando en una inmunidad anti tumor T celulo – dependiente. *Dancer Res* 2010;70:3052–61. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690.

Nagasaka T, Rhees J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A. La Hipermetilación somática de MSH2 es un evento frecuente en los cánceres colorectales del síndrome de Lynch. *Cancer Res* 2010;70:3098–108. Publicado en OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3290.

He X, Ota T, Liu P, Su C, Chien J, Shridhar V. La regulación negativa de HtrA1 promueve la resistencia a anoikis y la diseminación peritoneal de células de cáncer de ovario. *Cancer Res* 2010;70:3109–18. Publicado en OnlineFirst Abril el 13 de 2010. doi:10.1158/0008-5472. CAN-09-3557.

Florentino M, Judson G, Penney K, Flavin R, Stark J, Fiore C, Fall K, Martin N, Ma J, Sinnott J, Giovannucci E, Stampfer M, Sesso HD, Kantoff PW, Finn S, Loda M, Mucci L. Expresión Inmunohistoquímica de BRCA1 y cáncer de próstata letal. *Cancer Res* 2010;70:3136–9. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4100.

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanesi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Rol oncogénico de miR-483-3p en el locus IGF2/483. *Cancer Res* 2010;70:3140–9. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4456.

Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG II, Huang Q, Gelovani JG, Li C. Silenciamiento de tumores de sitio específico de NF- κ B p65 por medio de direccionamiento de nanoesferas mediadas huecas doradas de transfección fototermal. *Cancer Res* 2010;70:3177–88. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3379.

Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Harvey CT, Lafortune MC, Myrthue A, Garzotto M, Nelson PS, Beer TM, Qian DZ. ID1 incrementa la citotoxicidad del docetaxel en las células de cáncer de próstata a través de la inhibición de p21. *Cancer Res* 2010;70:3239–48. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3186.

Yoo BK, Chen D, Su Z-z, Gredler R, Yoo J, Shah K, Fisher PB, Sarkar D. Mecanismo molecular de quimioresistencia por astrocitos elevados gen-1. *Cancer Res* 2010;70:3249–58. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4009.

Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, Fan D, Krajewski S, Chiang GG, Mills GB, Arbeit JM. El objetivo Mammalian del activador RHEB rapamicina está frecuentemente sobre expresado en carcinomas humanos y es crítico y suficiente para carcinogénesis epiteliales de la piel. *Cancer Res* 2010;70:3287–98. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3467.

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. el receptor CXCR7 de quimioquinas está altamente expresado en células de glioma humano y es mediador de

24
21

efectos anti-apoptóticos. *Cancer Res* 2010;70:3299–308. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.

Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung H-J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. Activación aberrante del receptor andrógeno por NF- κ B2/p52 en células de cáncer de próstata. *Cancer Res* 2010;70:3309–19. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3703.

Acu ID, Liu T, Suino-Powell K, Mooney SM, D'Assoro AB, Rowland N, Muotri AR, Correa RG, Niu Y, Kumar R, Salisbury JL. La coordinación de homeostasis de centrosoma y la reparación de AND está intacta en MCF-7 e interrumpida en MDA-MB 231 células de cáncer de seno. *Cancer Res* 2010;70:3320–8. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3800.

McFarlane C, Kelvin AA, de la Vega M, Govender U, Scott CJ, Burrows JF, Johnston JA. La enzima deubiquitinating USP17 está expresada altamente en biopsias de tumor, está regulada por el ciclo de la células y es requerida para la progresión G1-S. *Cancer Res* 2010;70:3329–39. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4152.

Dudka AA, Sweet SMM, Heath JK. Los transductores de señales y los activadores de transcripción -3 vinculados al receptor del factor de crecimiento de fibroblastomas es activado por la amplificación del receptor. *Cancer Res* 2010;70:3391–401. . Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3033.

Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R. El efecto del procesamiento de CXCL12 en la migración de la célula CD34+ en neoplasmas mieloproliferativos. *Cancer Res* 2010;70:3402–10. Publicado en OnlineFirst el 13 de Abril de 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3977.

Publicado en OnlineFirst el 11 de Mayo de 2010

© 2010 Asociación Americana para la Investigación del Cáncer

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1347

Contactenos

72

De: CAROLINA POLANCO <CPOLANCO@prietocarrizosa.com>
Enviado el: lunes, 12 de agosto de 2013 5:15 p. m.
Para: contactenos@sic.gov.co
CC: NATALIA NOSSA; PATMARKS (prietocarrizosa)
Asunto: Radicación recurso de apelación
Datos adjuntos: doc20130812170424.pdf; doc20130812170526.pdf

Estimados Señores:

Conforme a la Resolución 42847 del 18 de julio de 2012, me permito adjuntar recurso de reposición en forma oportuna, en contra de la Resolución No. 37571 del 24 de junio de 2013, por medio de la cual se negó la Solicitud de Patente de Invención denominada: "COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE LOS MISMOS" a nombre de MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. Solicito que los presentes documentos sean anexados al expediente 10.161.489.

Un cordial saludo.

Carolina Polanco
Asociada/Associate
prietocarrizosa

Carrera 9 # 74-08, Bogotá D.C., Colombia
+ (571) 3268600 (Main) Ext. 1454
www.prietocarrizosa.com

Colombia Law Firm of the Year 2012
Chambers & Partners. Latin America Awards for Excellence

Colombia Law Firm of the Year 2012 and 2013
International Financial Law Review

Colombia Transfer Pricing Firm of the Year 2012
International Tax Review

 **La sostenibilidad del medio ambiente comienza en casa, piense antes de imprimir!**

* Aviso de confidencialidad: Este mensaje es para el uso exclusivo de la persona o entidad a la que se encuentra dirigido y puede contener información privilegiada o confidencial. Si usted ha recibido por error esta comunicación, sírvase notificarnos de inmediato telefónicamente al (571) 3268600 o vía e-mail, borrar de inmediato el mensaje y abstenerse de divulgar su contenido. Cualquier opinión, conclusión u otra información contenida en este mensaje, que no esté relacionada con las actividades oficiales de nuestra firma, deberá considerarse como nunca proporcionada o aprobada por la firma.

* Confidentiality notice: This message is intended only for the use of the individual or entity to which it is addressed and may contain information that is privileged or confidential. If you received this communication in error, please notify us immediately by telephone (571) 3268600 or by e-mail, delete the e-mail and do not disclose its content to any person. Opinions, conclusions and other information in this message, not related to the official business of our firm, shall not be understood as given or endorsed by it.

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

REF. PCT- PATENTE DE INVENCION

Invención: COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS DE LOS MISMOS

Expediente: 10.161.489

TITULAR: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

Asunto: RECURSO DE REPOSICIÓN

MAURICIO PATIÑO BONNET, mayor de edad, vecino de esta ciudad, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de la sociedad **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.**, por medio del presente memorial y dentro del término legal correspondiente, presento **RECURSO DE REPOSICIÓN** en contra de la Resolución No. **37571** del 24 de junio de 2013, por la cual se negó la patente de invención de la referencia, para que la revoque y en su lugar se conceda el privilegio de patente solicitado.

Sirven de fundamento los siguientes hechos y argumentos:

HECHOS

- La sociedad **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.**, mediante escrito radicado el 23 de diciembre de 2010, con el número 10.161.489, solicitó la entrada a fase nacional de la solicitud de patente de invención titulada "COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LOS MISMOS" que corresponde a la solicitud Internacional PCT/US2009/003602 del 16 de junio de 2009.

- Realizado el examen de forma, se ordenó publicar el extracto de la solicitud en la Gaceta de la Propiedad Industrial No. 632, sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.
- Realizado el examen de fondo, se requirió al solicitante mediante Oficio No. **463**, notificado el 22 de enero de 2013, para que se pronunciara sobre la patentabilidad de la invención en términos de claridad, excepciones de patentabilidad, novedad y nivel inventivo.
- El solicitante respondió oportunamente los requerimientos realizados, mediante escrito radicado el 07 de junio de 2013, y presentó un nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por diecisiete (17) reivindicaciones.
- Mediante Resolución No. **37571** del 24 de junio de 2013, la Superintendencia de Industria y Comercio, negó la patente de invención solicitada.

FUNDAMENTOS DE LA DIRECCIÓN

La Dirección fundamenta la decisión sosteniendo lo siguiente:

Como se dijo anteriormente, el documento D1 es considerado el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un compuesto de fórmula (1) y composiciones que los contienen con actividad inhibitoria de proteasoma (Pág. 1, Párr. [0011] a Pág. 2, Párr. (0020)).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1, y los compuestos del documento D1 consiste en que este documento no divulga específicamente el anillo 2,5-diclorofenilo unido a un sustituyente carbonilo como grupo P y no divulga específicamente la estructura derivada de dioxaborolano o dioxaborinano oxo sustituida comprendiendo los sustituyentes derivados de ácido carboxílico R^{b3} y R^{b4} . En los ejemplos del documento D1 se puede observar que en este documento ya se encuentra divulgado el grupo isobutilo como sustituyente correspondiente al grupo R^a del compuesto reclamado.

El efecto que logra el incluir el grupo 2,5-diclorofenilcarboxamida y los anillos dioxaborolano y dioxaborinano oxosustituídos comprendiendo los sustituyentes derivados de ácido carboxílico R^{b3} y R^{b4} es que permite obtener compuestos alternativos como inhibidores de proteasoma.

El problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar los compuestos conocidos en D1 para proporcionar compuestos alternativos como inhibidores de proteasoma?

Ahora bien, teniendo en cuenta que el documento D1 da a conocer compuestos de fórmula (I) inhibidores de proteasoma que tienen un anillo aromático unido a un grupo carboxamida y comprenden estructuras cíclicas como son los anillos dioxaborolano y dioxaborinano; se puede observar que el anillo 2,5-diclorofenilo y los sustituyentes R^{b3} y R^{b4} así como el sustituyente oxo de los anillos dioxaborolano y dioxaborinano son las diferencias estructurales entre los compuestos reclamados y los compuestos conocidos según el documento D1. Pese a esta diferencia no se presenta evidencia de un efecto técnico sorprendente otorgado al compuesto al seleccionar específicamente el anillo 2,5-diclorofenilo como anillo aromático y al incluir sustituyentes oxo y $-(CH_2)_p-CO_2H$ como sustituyentes de los anillos dioxaborolano y dioxaborinano. De esta manera esta oficina concluye que una persona normalmente versada en la materia seleccionaría el anillo de fenilo como anillo correspondiente al sustituyente R^7 divulgado en dicho documento y realizaría modificaciones menores sobre este anillo de fenilo y sobre los anillos de dioxaborolano y dioxaborinano para llegar al objeto de la reivindicación 1, por lo cual y ante la falta de evidencia de un efecto técnico sorprendente presentado por el compuesto reclamado, dicha reivindicación se considera obvia.

Lo anterior considerando que la actividad se debe al núcleo farmacofórico de la molécula y la modificación realizada en la estructura, que es una modificación menor, no ocasiona una variación importante en su actividad, lo cual es considerado obvio y por lo tanto, sin altura inventiva.

Puesto que para los demás compuestos reclamados así como para las formas cristalinas y las composiciones reivindicadas en la solicitud, no se presenta evidencia de un efecto técnico sorprendente; se considera que las reivindicaciones 2 a 17 tampoco tienen nivel inventivo.

La solicitante afirma que el documento D1 especifica que el termino radical derivado de azúcar se refiere a un radical formado por la remoción de átomos de hidrogeno desde dos grupos hidroxilo de cualquier radical de azúcar y que ni el ácido pirúvico ni el ácido cítrico corresponden a dicho tipo de radical, estableciendo además que la solicitud especifica que los radicales utilizados se refieren a un grupo radical directamente conectado a un átomo de carbono en una posición alfa o beta relativa al grupo ácido carboxílico y que por lo tanto no hay ninguna enseñanza en D1 que pueda conducir a llegar a los compuestos reivindicados de la fórmula (II) sin un descubrimiento inventivo.

Adicionalmente la solicitante manifiesta que "las nuevas reivindicaciones 6 a 14 relacionadas con nuevas formas cristalinas caracterizadas por patrones de difracción de polvo de rayos X con picos característicos, muestran propiedades distintivas en la unidad de empaque, termodinámica y temperatura de fusión" argumentando que el documento D1 no proporciona enseñanzas o sugerencias que guíen a obtener dichas nuevas formas cristalinas.

Se aclara a la solicitante que el documento D1 sugiere todas las características técnicas del grupo farmacofórico principal incluyendo el anillo 2,5-diclorofenilo el cual queda sugerido cuando en dicho documento se establece que el sustituyente R^7 corresponde a un anillo sustituido (Pág. 5, Párr. [0081]). Si bien el documento D1 no proporciona enseñanzas que permitan llegar a la consecución de los restos de ácido pirúvico y cítrico comprendiendo los sustituyentes oxo y $-(CH_2)_p-CO_2H$ como sustituyentes de los anillos dioxaborolano y dioxaborinano, estos constituyen una modificación menor sobre el grupo farmacofórico principal dentro de la experimentación para obtener compuestos alternativos como inhibidores de proteasoma y puesto que la solicitante no presenta evidencia que bajo las mismas condiciones los compuestos y las formas cristalinas de la presente invención presenten un efecto técnico sorprendente con respecto a los compuestos ya conocidos en el estado de la técnica. De manera que el nivel de actividad de dichos compuestos y formas cristalinas de la solicitud estudiada no es sorprendente para la persona normalmente conocedora de la materia, a la luz de lo enseñado en el documento D1.

ARGUMENTOS DEL RECURSO

En primer lugar deseo expresar mi total desacuerdo con las razones expuestas por ese Despacho respecto a la falta de nivel inventivo de la presente invención. Cabe resaltar los siguientes puntos que claramente demuestran que la presente invención cumple con el nivel inventivo necesario para que le sea concedido el privilegio de patente de invención. A saber:

Establece el artículo 18:

"Art. 18

Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

En este sentido es importante poner de presente que el examen de nivel inventivo está dirigido a determinar si la invención reivindicada había sido sugerida o enseñada en el estado del arte, de acuerdo con el conocimiento de un técnico medio en la materia. Para los anteriores efectos, el método problema-solución le indica al Examinador que al realizar el examen de nivel inventivo debe:

"- Identificar el estado de la técnica cercano a la invención reivindicada

El estado de la técnica cercano es un documento que se encuentra en el mismo campo técnico que la invención o trata de solucionar el mismo problema o uno semejante. Suele ser el que tiene más características en común con la invención o presenta leves modificaciones de estructura e indica la misma función, propósito.

En caso de que haya varios documentos relacionados, el estado de la técnica cercano es el documento que menciona una función, propósito, problema a resolver ó actividad semejante al de la invención.

-Determinar la diferencia entre la invención y estado de la técnica cercano.

- Definir el efecto técnico causado y atribuible al elemento diferencial.

- Deducir el problema técnico objetivo.

- Evaluar si la invención reivindicada, partiendo del estado de la técnica cercano y del problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona medianamente versada en la materia.”¹

En este sentido, el instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad de la Superintendencia de Industria y Comercio, establece:

“Si un compuesto tiene estructura similar a un compuesto conocido y su efecto es sorprendente, se considera inventivo”².

El Despacho considera que la invención de mi representada carece de nivel inventivo a la luz de **D1** (US2002188100) porque no se evidencia un efecto técnico sorprendente al seleccionar específicamente el anillo 2,5-diclorofenilo como anillo aromático y al incluir sustituyentes oxo y $-(CH_2)_p-CO_2H$ como sustituyentes de los anillos dioxaborolano y dioxaborinano.

En vista de lo anterior, presento junto con este escrito un artículo de *Erik Kupperman, et al.*, el cual fue publicado por la AACR – *American Association for Cancer Research*, en la edición del 1 de marzo de 2010 titulado “*Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano*”. Dicho artículo compara la efectividad del compuesto MLN9708, objeto de protección de la presente solicitud de patente, con el compuesto bortezomib; compuesto revelado y ejemplificado en el Ejemplo 2, pág. 10 de **D1**, identificado por el examinador como el estado de la técnica más cercano.

En este respecto, el artículo afirma:

“MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta, así como farmacocinética, farmacodinámica y actividad antitumoral mejorada en comparación con el bortezomib. MLN9708 tiene una mayor distribución de volumen de sangre en estado estable, y los análisis de la inhibición de la proteasoma 20S, así como los marcadores de la respuesta de proteína desplegada confirmaron que MLN9708 tiene mayores efectos

¹ Superintendencia de Industria y Comercio “**Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad**”, Bogotá D.C., Febrero 8, 2012, Pág. 72 - 73.

² Íbidem, Pág. 85.

farmacodinámicos en los tejidos a comparación con el bortezomib" (Ver el Resumen).

"MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta que el bortezomib, lo cual creemos que juega un rol importante en la mejoría en la distribución de tejidos. La comparación directa con el bortezomib reveló que MLN9708 tiene un perfil farmacocinético y farmacodinámico mejorado y muestra una actividad antitumoral superior tanto en tumores sólidos como en modelos de xenoinjertos hematológicos, y muestra actividad antitumoral cuando es administrado a través de múltiples rutas de dosificación y regímenes" (ver el final de la sección de la Introducción).

"Una superior biodisponibilidad igualmente permite que esta molécula sea administrada de forma oral, mientras que el bortezomib se limita a regímenes de administración por vía intravenosa y vía subcutánea actividad antitumoral" (Ver el último párrafo).

Por consiguiente, toda vez que las diferencias estructurales de los compuestos de la presente invención: (i) no son sugeridas o reveladas en **D1** y (ii) dichas diferencias **SÍ permiten obtener un efecto técnico sorprendente, evidenciado en una biodisponibilidad superior, un perfil farmacocinético y farmacodinámico mejorado, y una mejor actividad antitumoral**; se puede concluir, que **D1** no anticipa la materia de la presente invención y por lo tanto los compuestos y las formas cristalinas aquí reivindicados son inventivos a la luz de la anterioridad citada.

PETICIÓN

Atentamente solicito a su Despacho se sirva revocar la Resolución No. **37571** del 24 de junio de 2013, por la cual se negó la solicitud patente de la referencia y en su lugar, se conceda el privilegio de patente a la invención "COMPUESTOS DE ESTER BORONATO Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE LOS MISMOS" a nombre de **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.**, contenida en el Expediente No. 10.161.489.

PRUEBAS

Comedidamente solicito tener en cuenta como prueba de las argumentaciones expuestas en el presente recurso, el material constitutivo del Expediente No. 10.161.489 referente a la patente en discusión.

NOTIFICACIONES

Recibiré notificaciones en la secretaría de su Despacho o en la Carrera 9 # 74-08, Oficina 305, en la ciudad de Bogotá D.C.

ANEXOS

- i) Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al. "Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer". *Cancer Res* 2010;70:1970-1980. February 16, 2010, junto con su respectiva traducción al español.

Señor Jefe de la Dirección de Nuevas Creaciones,

prietocarrizosa



MAURICIO PATIÑO BONNET
C.C. 11.342.699 de Zipaquirá
T.P. 73.583 del C.S. de la J.

2

Cancer Research



Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al.

Cancer Res 2010;70:1970-1980. Published OnlineFirst February 16, 2010.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/02/15/0008-5472.CAN-09-2766.DC1.html

Cited Articles	This article cites by 53 articles, 28 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 17 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Gao, Bret Bannerman, Michael Fitzgerald, Allison Berger, Jie Yu, Yu Yang, Paul Hales, Frank Bruzzese, Jane Liu, Jonathan Blank, Khristofer Garcia, Christopher Tsu, Larry Dick, Paul Fleming, Li Yu, Mark Manfredi, Mark Rolfe, and Joe Bolen

Abstract

The proteasome was validated as an oncology target following the clinical success of VELCADE (bortezomib) for injection for the treatment of multiple myeloma and recurring mantle cell lymphoma. Consequently, several groups are pursuing the development of additional small-molecule proteasome inhibitors for both hematologic and solid tumor indications. Here, we describe MLN9708, a selective, orally bioavailable, second-generation proteasome inhibitor that is in phase I clinical development. MLN9708 has a shorter proteasome dissociation half-life and improved pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity compared with bortezomib. MLN9708 has a larger blood volume distribution at steady state, and analysis of 20S proteasome inhibition and markers of the unfolded protein response confirmed that MLN9708 has greater pharmacodynamic effects in tissues than bortezomib. MLN9708 showed activity in both solid tumor and hematologic preclinical xenograft models, and we found a correlation between greater pharmacodynamic responses and improved antitumor activity. Moreover, antitumor activity was shown via multiple dosing routes, including oral gavage. Taken together, these data support the clinical development of MLN9708 for both hematologic and solid tumor indications. *Cancer Res* 70(5): 1970–80. ©2010 AACR.

Introduction

The ubiquitin-proteasome system processes the majority of cellular proteins and is the principal manner by which cells regulate protein homeostasis. During normal protein homeostasis, specific proteins are targeted for destruction via the attachment of ubiquitin. These proteasome substrates include misfolded proteins and highly regulated members of critical signaling cascades, including proteins involved in growth control, cell cycle regulation, and apoptosis. Proteasome inhibition results in the stabilization and accumulation of these substrates, leading to the activation of antiproliferative signals, cell cycle disruption, activation of apoptotic pathways, and, ultimately, cell death (1, 2). Rapidly growing malignant cells, already deficient in normal cell cycle checkpoint mechanisms, seem to be highly susceptible to proteasome inhibition (3–6). Therefore, the proteasome emerged as an attractive target for anticancer

therapeutics. The success of the first-in-class small-molecule proteasome inhibitor VELCADE (bortezomib) for injection (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) validated the proteasome as a therapeutic target for the treatment of human cancer (1, 7–12). VELCADE is approved for the treatment of patients with multiple myeloma and previously treated mantle cell lymphoma (13–21). At present, there are multiple groups in the process of developing small-molecule proteasome inhibitors for various oncology indications. These include both reversible inhibitors, such as CEP-18770, and irreversible inhibitors, such as carfilzomib and NPI-0052. Both CEP-18770 and NPI-0052 are orally active, and all three compounds have shown antitumor activity in preclinical models and are currently in various stages of clinical development (22–30).

The 26S proteasome consists of a 20S multicatalytic core capped on either end with 19S regulatory subunits. The 20S proteasome is a chambered, barrel-like structure containing two heptameric rings made from α subunits and two heptameric rings made from β subunits. The α rings perform capping and gating functions, whereas three of the β subunits ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$) contain the NH_2 -terminal threonines responsible for the different proteasome proteolytic activities. The $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ subunits are referred to as caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like, respectively, because the preferred cleavage site of each subunit is similar to those of other well-known proteases (2, 31–34).

Bortezomib shows time-dependent inhibition of the 20S proteasome by binding to the NH_2 -terminal threonine side chain of the catalytic β subunits. Bortezomib exhibits

Authors' Affiliation: Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org>).

E. Kupperman and E.C. Lee contributed equally to this work.

Corresponding Author: Erik Kupperman, Millennium Pharmaceuticals, Inc., 35 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02139. Phone: 617-551-3767; Fax: 617-444-1446; E-mail: erik.kupperman@mpl.com.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2766

©2010 American Association for Cancer Research.

inhibitory activity against all three β subunits but preferentially binds to and inhibits the $\beta 5$ site (35). Although bortezomib has shown clinical efficacy in multiple myeloma and mantle cell lymphoma, to date, it has yet to exhibit strong activity in solid tumor indications, perhaps due to its inability to penetrate into tissues and achieve therapeutically relevant concentrations at those target sites. Therefore, there is a strong rationale for identifying proteasome inhibitors that have different physicochemical or pharmacokinetic properties. Here, we describe the biochemical and preclinical pharmacology data that support the development of MLN9708. MLN9708 is a second-generation small-molecule proteasome inhibitor being developed for the treatment of a broad range of human malignancies. MLN9708 was selected from a large pool of boron-containing proteasome inhibitors based on a physicochemical profile that was distinct from bortezomib. MLN9708 has a shorter 20S proteasome dissociation half-life than bortezomib, which we believe plays an important role in its improved tissue distribution. Direct comparison with bortezomib revealed that MLN9708 has an improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profile and shows superior antitumor activity in both solid tumor and hematologic xenograft models, and shows antitumor activity when administered via multiple dosing routes and regimens. MLN9708 is currently being evaluated in multiple phase I clinical studies for both solid- and hematologic-based tumors.

Materials and Methods

Cell Culture

WSU-DLC1.2, OCI-Ly7, A375, H460, HCT-116, HT-29, MDA-MB-231, HEK293, and Calu-6 cells were obtained from the American Type Culture Collection and maintained as recommended by the supplier.

In vitro Assays

Kinetic analysis of 20S proteasome inhibition. Kinetic analysis of 20S proteasome inhibition was performed as previously described by Williamson and colleagues (36).

NF- κ B-Luc and 4 $\times$ Ub-Luc cell-based reporter assays. NF- κ B-Luc and 4 $\times$ Ub-Luc cell-based reporter assays were performed as previously described by Williamson and colleagues (36).

Proteasome-Glo IC₅₀ and inhibitor washout cell-based assays. Calu-6 cells were cultured in MEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and plated 1 d before the start of the experiment at 10,000 cells per well in a 384-well plate. For IC₅₀ determinations, cells were treated with varying concentrations of bortezomib or MLN2238 in DMSO (0.5% final, v/v) for 1 h at 37°C. For reversibility experiments, cells were treated with either 1 μ M/L bortezomib or MLN2238 for 30 min at 37°C and then washed thrice in medium to remove the compounds. Cells were incubated for an additional 4 h at 37°C, after which the medium was removed and replaced with fresh medium. Proteasome activity was assessed by monitoring hydrolysis of the chymo-

trypsin-like substrate Suc-LLVY-aminoluciferin in the presence of luciferase using the Proteasome-Glo assay reagents according to the manufacturer's instructions (Promega Corp.). Luminescence was measured using a LEADseeker instrument (GE Healthcare Life Sciences).

Pharmacokinetic Studies

Blood and tumor samples were collected before dose and numerous time points after dosing. Each time point represents the average value of three animals. MLN2238 or bortezomib concentrations in blood and plasma samples were determined using a non-good laboratory practice liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)-based method. MLN2238 or bortezomib was isolated from 50 μ L of plasma or blood using a liquid-liquid extraction procedure. Sample (50 μ L) was mixed with 50 μ L of internal standard solution, 50 μ L of 0.5 mol/L HCl, and 500 μ L of methyl tertiary butyl ether. The supernatant (300 μ L) was then transferred to a clean 96-well plate, evaporated, reconstituted in 100 μ L of acetonitrile/water (5:95) containing 0.1% formic acid, and injected onto the LC/MS/MS system for analysis. A reverse-phase gradient method provided sample stacking and separation. Pharmacokinetic analysis of the blood and plasma concentration data was performed using WinNonlin version 5.2 (Pharsight Corp.). Kinetic parameters were estimated using a noncompartmental model using sparse sampling mode (model 201 for plasma and blood). Area under the concentration versus time curve (AUC) and area under the effect versus time curve (AUE) values were calculated using the linear trapezoidal rule.

Pharmacodynamic Studies

Approximately 200 μ L of whole blood were collected from each animal and processed for the 20S blood proteasome inhibition assay. Subcutaneous tumors (approximately 600–800 mm³ in size) were harvested and divided into two or three parts. One was processed for the 20S tissue proteasome inhibition assay, one for Western blot analysis, and one for immunohistochemistry.

Tumor processing for 20S tissue proteasome assays. Frozen samples were pulverized in the Tissue CryoPrep (Covaris) and transferred to glass tubes. After addition of 1 mL of cold tissue lysis buffer [50 mmol/L HEPES (pH 8.0), 1 mmol/L DTT], samples were placed on ice and homogenized as per the manufacturer's instructions using the Covaris E200.

Tumor processing for Western blot assays. Tumors were processed as described above in the Covaris E200. M-PER lysis buffer (Pierce) was supplemented with the following: 1 $\times$ protease inhibitor cocktail set (Calbiochem), 2 mmol/L sodium orthovanadate (Sigma), 25 mmol/L sodium fluoride, and 25 mmol/L β -glycerophosphate. Cold lysis buffer (300–800 μ L) was added to the tumors just before sonication. After sonication, supernatants were transferred to new tubes and protein concentrations were determined.

Western blot analysis. Tumor lysate (50 μ g) was loaded onto 4% to 12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Proteins were transferred to PVDF-FL membranes (Millipore) using a

semidry transfer apparatus. After transfer and blocking, membranes were incubated with primary antibody overnight at 4°C. Membranes were washed thrice with TBS-Tween 20 (TBST) and incubated with Alexa Fluor 680-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G (Molecular Probes) for 1 h. Membranes were washed five times with TBST and once with TBS while protected from light. Membranes were dried and scanned with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). The following primary antibodies were used: anti-tubulin (rabbit polyclonal, 1:15,000 dilution; Abcam) and anti-growth arrest DNA damage 34 (GADD34; Proteintech Group, Inc.). Secondary antibody was used at 1:20,000 for tubulin and 1:2,000 for GADD34. Quantitation of Western blot signals was performed with Odyssey software.

20S $\beta 5$ proteasome tumor and blood assays. 20S $\beta 5$ proteasome tumor and blood assays were performed as previously described (36–38).

Immunohistochemical studies. Formalin-fixed, paraffin-embedded CWR22 and WSU-DLCL2 xenograft tumor sections (5 μ m) were stained with primary antibodies to GADD34, activating transcription factor 3 (ATF3), and cleaved caspase-3 (Proteintech Group, Santa Cruz Biotechnology, and Cell Signaling Technology). The GADD34 and ATF3 antibodies were detected with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (UltraMap anti-rabbit, Ventana Medical Systems) and incubated with the ChromoMap 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kit (Ventana Medical Systems). The cleaved caspase-3 antibody was detected with Alexa Fluor 594-labeled secondary antibody (Invitrogen). Slides were counterstained with hematoxylin for GADD34 and ATF3 assays and 4',6-diamidino-2-phenylindole for cleaved caspase-3 assay. Images were captured using an Eclipse E800 microscope (Nikon Instruments), 20 $\times$ objective, and Retiga EXi color digital camera (QImaging). Five fields of view were captured per sample, and images were processed using MetaMorph software (Molecular Devices). Pharmacodynamic marker levels were measured by color thresholding on the DAB or fluorescent signal and measuring area of thresholded signal. Percent positive area was calculated by normalizing with the total area of the field of view.

Animal Care

CB17-severe combined immunodeficient (SCID) and non-obese diabetic (NOD)-SCID mice were housed and maintained in a controlled environment and received food and water *ad libitum*. Veterinary care for the animals was provided in accordance with Millennium Institutional Animal Care and Use Committee.

Efficacy Studies

CWR22 xenografts. Male CB17-SCID mice (Charles River Laboratories), approximately 8 to 11 wk of age, were inoculated s.c. with freshly dissected CWR22 tumor fragments (~20 mg) in the right dorsal flank. Mean tumor volume (MTV) was calculated using the following formula: $0.5 \times (\text{length} \times \text{width}^2)$. When MTV reached approximately

150 to 200 mm³, animals were randomized into treatment groups ($n = 10$ per group) before dosing. Antitumor activity was determined at the end of the study by calculating the treatment over control (T/C) ratio of their MTVs at the end of the study.

WSU-DLCL2 xenografts. Female CB17-SCID mice, ~6 wk of age, were inoculated s.c. with 4×10^6 WSU-DLCL2 tumor cells suspended in 0.1 mL RPMI 1640 in the right dorsal flank. Animals were randomized, and the MTV and T/C ratio were calculated as described above.

OCI-Ly7-Luc disseminated xenografts. Female NOD-SCID mice, ~9 wk of age, were inoculated i.v. via the tail vein with 1.0×10^6 OCI-Ly7-Luc tumor cells. Mice were randomized into treatment groups ($n = 10$ per group) on day 7 after inoculation. For each imaging session, animals received 150 mg/kg of luciferin (Caliper Life Sciences) via i.p. injection. Animal dorsal and ventral views were imaged to determine total photon flux. Images were captured by the Xenogen IVIS imaging system (Xenogen Corp.), and data were collected with Xenogen Living Image software (Living Image 3.0.2.2). Antitumor activity was determined by calculating the T/C ratio of the mean photon flux measurements at the end of the study. Survival curves were generated using the Kaplan-Meier method.

Statistical Analyses

Efficacy data were analyzed using a linear mixed-effect regression model. Differences among mice were treated as random effects, and a compound symmetry covariance structure was used to model the variability between repeated tumor measurements for each mouse. Treatment comparisons were performed by taking fitted curves from the model to calculate Δ AUCs. The significance of the Δ AUC was assessed using permutation testing. P values of ≤ 0.05 were considered significant. For the OCI-Ly7-Luc study, differences in total photon flux among mice were compared using one-way ANOVA and pairwise comparisons were adjusted by the Tukey-Kramer method. Survival curves generated using the Kaplan-Meier methods were compared using the log-rank (Mantel-Cox) test and pairwise comparisons were adjusted with the Bonferroni correction.

Results and Discussion

MLN2238 is a selective, potent, and reversible inhibitor of the proteasome. MLN9708 was identified in screens for small-molecule proteasome inhibitors with an improved pharmacologic profile compared with bortezomib (Fig. 1). In preclinical studies, MLN9708 immediately hydrolyzed to MLN2238 (see Supplementary Data), the biologically active form, on exposure to aqueous solutions or plasma. In studies where a solution of MLN9708 was added directly into rat, dog, or human plasma and immediately extracted and analyzed by high-performance liquid chromatography, only MLN2238 could be identified. MLN2238 is an N-capped dipeptidyl leucine boronic acid and preferentially bound to and inhibited the chymotrypsin-like proteolytic ($\beta 5$) site

of the 20S proteasome with an IC_{50} value of 3.4 nmol/L (K_i of 0.93 nmol/L; Table 1). At higher concentrations, it also inhibited the caspase-like ($\beta 1$) and trypsin-like ($\beta 2$) proteolytic sites (IC_{50} of 31 and 3,500 nmol/L, respectively). Although the selectivity and potency of MLN2238 were similar to that of bortezomib, the proteasome binding kinetics for these two molecules are different. Both MLN2238 and bortezomib showed time-dependent reversible proteasome inhibition; however, the proteasome dissociation half-life ($t_{1/2}$) for MLN2238 was determined to be ~6-fold faster than that of bortezomib ($t_{1/2}$ of 18 and 110 minutes, respectively).

MLN2238 is a potent inhibitor of the proteasome in tumor cells. To build on the biochemistry results, a series of cell-based experiments were performed to confirm potent proteasome inhibition in cells. Proteasome inhibition results in the stabilization and accumulation of ubiquitinated proteins, which have been targeted for destruction.

This leads to cell cycle disruption, activation of apoptotic pathways, and active cell death (39–43). Initial studies examined the effects of MLN2238 treatment on an exogenous proteasome substrate. MDA-MB-231 cells expressing a 4xUb-Luc reporter (36) were treated with increasing concentrations of MLN2238 and bortezomib. Both compounds strongly inhibited proteasome activity, resulting in accumulation of the Luciferase reporter with similar EC_{50} values (Table 1). The effect of bortezomib and MLN2238 on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced activation of the NF- κ B pathway was also examined (44). Proteasome inhibition prevents the degradation of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B, resulting in a decrease in NF- κ B-driven gene expression. HEK293 cells stably expressing a NF- κ B-Luc reporter were treated with increasing concentrations of MLN2238 and bortezomib. Both compounds strongly inhibited TNF- α -induced activation of the NF- κ B pathway, resulting in similar EC_{50} values (Table 1).

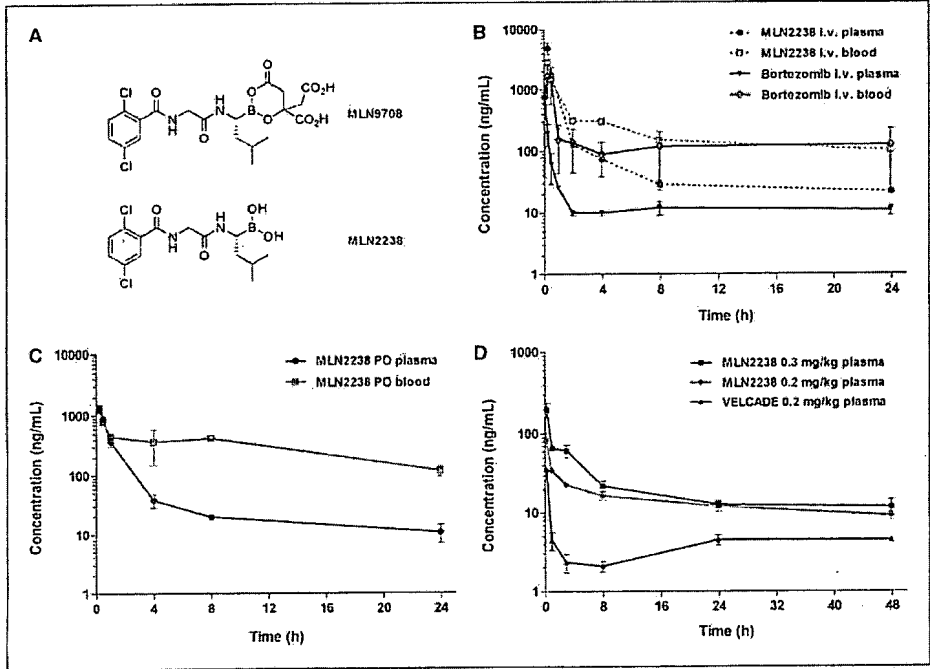


Figure 1. Structure of MLN9708, A, blood and plasma concentration versus time profile of MLN2238 and bortezomib in CB17-SCID mice following an acute i.v. administration (100 μ L per mouse) at 14 or 0.8 mg/kg, respectively. B, blood and plasma concentration versus time profile following an acute oral administration of MLN2238 in CB17-SCID mice at 11 mg/kg (100 μ L per mouse). C, plasma concentration versus time profile following an acute i.v. administration (200 μ L per rat) of MLN2238 and bortezomib in nude rats at 0.3, 0.2, and 0.2 mg/kg, respectively. D, bars, SD, $n = 3$ for all time points, except 0.5 h after dose in plasma for MLN2238 i.v., 1 h after dose in plasma for bortezomib i.v., and 0.5 and 8 h after dose in blood for MLN2238 orally (PO), where $n = 2$.

Table 1. Summary of MLN2238 and bortezomib enzymology, pharmacokinetic, and pharmacodynamic parameters						
		MLN2238		Bortezomib		
Biochemical assays						
β5 <i>K_i</i> (nmol/L)			0.93 (0.64–1.4, <i>n</i> = 3)		0.55 (0.34–0.89, <i>n</i> = 3)	
β5 <i>IC</i> ₅₀ (nmol/L)			3.4 (2.8–4.1, <i>n</i> = 3)		2.4 (2.0–2.9, <i>n</i> = 45)	
β2 <i>IC</i> ₅₀ (nmol/L)			3,500		1,200	
β1 <i>IC</i> ₅₀ (nmol/L)			31		24 (14.5–40, <i>n</i> = 12)	
β5 dissociation half-life (min)			18 (6.8–30, <i>n</i> = 3)		110 (71–150, <i>n</i> = 3)	
Cell-based assays						
MDA-MB-231 4xUb-Luc <i>EC</i> ₅₀ (nmol/L)			525 (330–840, <i>n</i> = 4)		310 (230–400, <i>n</i> = 29)	
<i>E</i> _{max} (fold stimulation)			265 (160–370, <i>n</i> = 4)		370 (330–410, <i>n</i> = 29)	
HEK293 NF-κB-Luc <i>EC</i> ₅₀ (nmol/L)			55 (33–91, <i>n</i> = 7)		33 (27–40, <i>n</i> = 23)	
<i>E</i> _{max} (% maximum inhibition)			99.3 (99.0–99.6, <i>n</i> = 7)		99.6 (99.3–100, <i>n</i> = 23)	
Calu-6 Proteasome-Glo <i>IC</i> ₅₀ (nmol/L)			9.7 (<i>n</i> = 7)		4.8 (<i>n</i> = 12)	
Calu-6 Proteasome-Glo (% activity),* <i>t</i> = 4 h, no washout			7.1 (3.6–10.6, <i>n</i> = 5)		3.45 (2.0–4.9, <i>n</i> = 5)	
Calu-6 Proteasome-Glo (% activity),* <i>t</i> = 4 h, washout			69 (66–71, <i>n</i> = 5)		20 (18–23, <i>n</i> = 5)	
A375 ATPlite <i>LD</i> ₅₀ (nmol/L)			20		6.5	
H460 ATPlite <i>LD</i> ₅₀ (nmol/L)			58		13	
HCT-116 ATPlite <i>LD</i> ₅₀ (nmol/L)			19		4	
HT-29 ATPlite <i>LD</i> ₅₀ (nmol/L)			52		7	
Pharmacokinetic parameters						
Agent	Dose and route	Matrix	<i>C</i> _{max} (ng/mL)	AUC _{0–24h} (h·ng/mL)	Vd (L/kg)	F%
MLN2238	14 mg/kg i.v.	Plasma	17,000	8,090	20.2	27.8
	14 mg/kg i.v.	Blood	10,500	9,660		
	11 mg/kg orally	Plasma	1,630	1,810		
	11 mg/kg orally	Blood	1,710	6,310		
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Plasma	321	485	4.3	59.5
	0.8 mg/kg i.v.	Blood	548	4422		
Pharmacodynamic parameters						
Agent	Dose and route	Matrix	<i>E</i> _{max} (I%)	AUE _{0–24h} (%I·h)	AUE ratio (tumor/blood)	
MLN2238	14 mg/kg i.v.	Blood	83.1 [†]	718 [†]		
	14 mg/kg i.v.	Tumor (CWR22)	69.1	1120	1.56	
	14 mg/kg i.v.	Tumor (WSU-DLCL2)	77.0	1460	2.03	
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Blood	88.3 [‡]	1170 [‡]		
	0.8 mg/kg i.v.	Tumor (CWR22)	44.8	804	0.69	
	0.8 mg/kg i.v.	Tumor (WSU-DLCL2)	27.6	306	0.26	
NOTE: Results are reported as mean (95% confidence interval, number of experiments).						
Abbreviations: <i>K_i</i> , inhibition dissociation constant; <i>E</i> _{max} , maximum effect; F%, oral bioavailability; <i>t</i> = time; AUC _{0–24 h} , AUC from 0 to 24 h; <i>C</i> _{max} , maximum concentration; Vd, volume of distribution; I%, percentage of inhibition.						
*After exposure to 1 μmol/L MLN2238 or 1 μmol/L bortezomib for 30 min.						
[†] For MLN2238, blood <i>E</i> _{max} = 81.3% to 85.0% (<i>n</i> = 2) and AUE _{0–24h} = 554 to 882 (<i>n</i> = 2).						
[‡] For bortezomib, blood <i>E</i> _{max} = 86.8% to 89.8% (<i>n</i> = 2) and AUE _{0–24h} = 1,140 to 1,200 (<i>n</i> = 2).						

The effect of MLN2238 or bortezomib on β5 activity was determined *in situ* using the Proteasome-Glo cell-based assay. The *IC*₅₀ values determined by this assay following 1 hour of treatment with MLN2238 or bortezomib were in the low nanomolar range and comparable with those calculated with purified 20S proteasome. Recovery of pro-

teasome activity was determined by performing washout experiments with MLN2238 or bortezomib. Cells were treated with the drug for 4 hours, after which the drug was removed and proteasome activity was assessed. Proteasome activity in MLN2238-treated cells recovered to 69% of control cells, whereas activity in bortezomib-treated

cells recovered to only 20% (Table 1). The difference in recovery of proteasome activity between MLN2238 and bortezomib is consistent with the observed differences in proteasome $t_{1/2}$ between the two molecules.

Cell viability studies were performed in a variety of mammalian cell lines to compare the *in vitro* antiproliferative effects of MLN2238 with bortezomib. Studies performed with A375 (lung), H460 (lung), HCT-116 (colon), and HT-29 (colon) cells revealed similar LD₅₀ values for the two compounds, which ranged from 4 to 58 nmol/L (Table 1).

Taken together, these *in vitro* studies show that MLN2238 is a potent inhibitor of the $\beta 5$ site of the 20S proteasome and that MLN2238 dissociated more rapidly from the proteasome than bortezomib, consistent with faster recovery of proteasome activity observed in the Proteasome-Glo assay. Given the high concentrations of proteasome found in RBCs, we hypothesized that RBC partitioning would serve

as a drug sink for bortezomib and limit its distribution outside of the blood compartment; the shorter proteasome $t_{1/2}$ of MLN2238 should allow improved drug distribution into tissues. To address this issue directly, a series of pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy studies with MLN2238 and bortezomib were performed in different xenograft models.

Pharmacokinetics of MLN2238 and bortezomib. To determine the pharmacokinetic profile of MLN2238 and bortezomib, mice were administered a single dose of MLN2238 at 14 mg/kg i.v. and 11 mg/kg orally or bortezomib at 0.8 mg/kg i.v. These doses represent the maximum tolerated dose (MTD) for each drug for the specified route of administration. Exposures were determined by measuring the blood and plasma drug concentrations at various time points following the initial dose (Table 1). The concentration-versus-time curve of i.v. administered MLN2238 displayed a distinct biexponential profile with a steep ini-

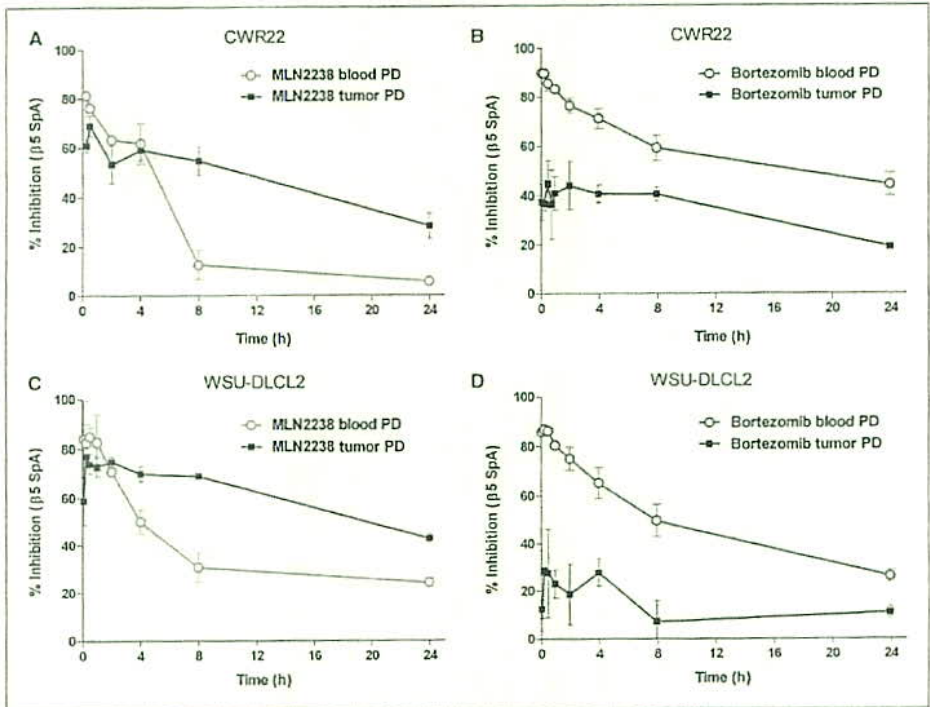


Figure 2. Blood and tumor proteasome inhibition versus time profile of MLN2238 (14 mg/kg; A and C) and bortezomib (0.8 mg/kg; B and D) following acute i.v. administration in CWR22 (A and B) and WSU-DLCL2 (C and D) tumor-bearing mice. Pharmacodynamic responses in blood and tumor were determined by measuring 20S proteasome $\beta 5$ enzyme inhibition in blood and tumor at different time points.

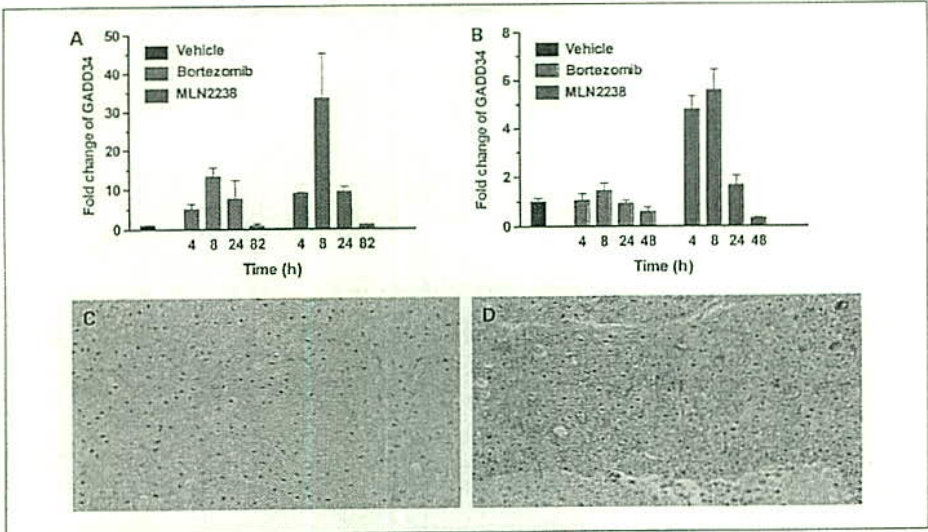


Figure 3. Pharmacodynamic responses in tumor were determined by measuring GADD34 protein levels at different time points via Western blot and quantitated with the Odyssey Infrared Imaging System. A and B, normalized GADD34 response versus time profile shown as fold change from vehicle control following acute i.v. administration of MLN2238 at 10 mg/kg and bortezomib at 0.8 mg/kg in CWR22 (A) and WSU-DLCL2 (B) tumor-bearing mice. Columns, mean of three tumors per group, except CWR22 vehicle group with four tumors and WSU-DLCL2 vehicle group with five tumors; bars, SD. Immunohistochemical staining (C and D) for GADD34 in CWR22 xenograft tumors 8 h following an acute i.v. dose of either vehicle (C) or MLN2238 at 14 mg/kg (D).

tial distribution phase and a long terminal $t_{1/2}$ (>24 hours; Fig. 1B). Due to extensive RBC partitioning, whole-body tissue distribution is most accurately reflected in blood volume distribution at steady state ($V_{d_{ss}}$) rather than

plasma volume distribution at steady state ($V_{d_{ss}}$). MLN2238 showed larger $V_{d_{ss}}$ (20.2 L/kg) compared with bortezomib (4.3 L/kg), providing supportive evidence that MLN2238 more easily moves from the blood compartment

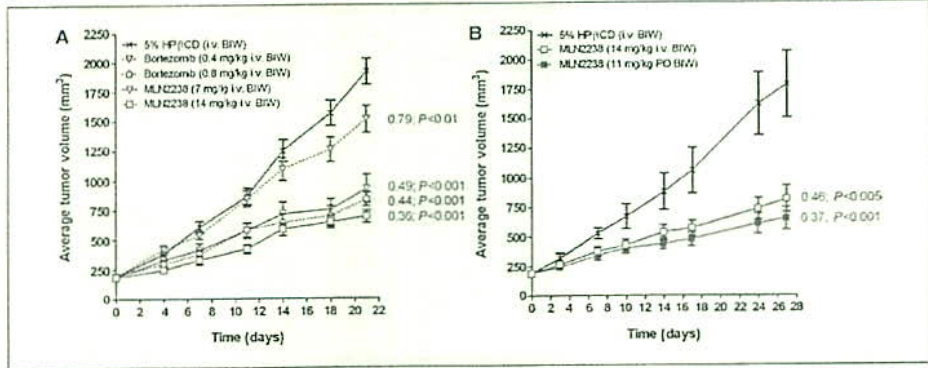


Figure 4. Antitumor activity of MLN2238 and bortezomib in CWR22 tumor-bearing mice ($n = 10$). A, animals were dosed i.v. twice weekly (BIW) with vehicle (5% HPβCD), bortezomib (0.4 and 0.8 mg/kg in 0.9% saline), and MLN2238 (7 and 14 mg/kg in 5% HPβCD). B, animals were dosed i.v. twice weekly with vehicle, i.v. twice weekly with MLN2238 (14 mg/kg), or orally twice weekly with MLN2238 (11 mg/kg). Points, average tumor volume in each treatment group; bars, SE. T/C and P values were calculated as described in Materials and Methods. A P value of ≤0.05 was considered significant.

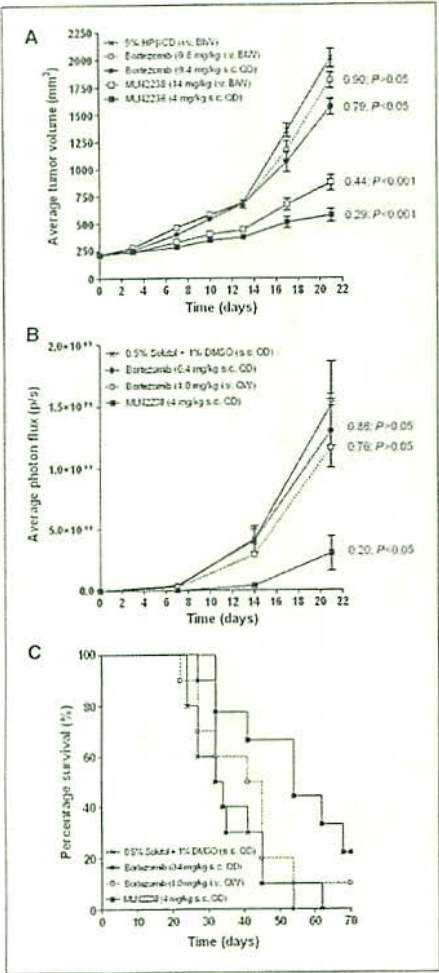


Figure 5. Antitumor activity of MLN2238 and bortezomib in two lymphoma xenograft models. Each treatment group consisted of 10 mice. A, antitumor activity in WSU-DLCL2 xenografts. Animals were dosed with vehicle (5% HPBCD i.v. twice weekly), bortezomib (0.8 mg/kg i.v. twice weekly or 0.4 mg/kg s.c. QD), or MLN2238 (14 mg/kg i.v. twice weekly or 4 mg/kg s.c. QD) for 3 consecutive weeks. B, antitumor activity in the OCI-Ly7-Luc disseminated lymphoma model. Animals were dosed with vehicle (0.5% Solutol + 1% DMSO s.c. QD), bortezomib (0.4 mg/kg in 0.9% saline s.c. QD), bortezomib (1.0 mg/kg in 0.9% saline i.v. QW), or MLN2238 (4 mg/kg in 0.5% Solutol + 1% DMSO s.c. QD) for 3 consecutive weeks. Points, average tumor volume; bars, SE. T/C and P values were calculated as described in Materials and Methods. A P value of ≤ 0.05 was considered significant. C, Kaplan-Meier survival profile.

into the tissue compartment. MLN2238 also showed moderate oral bioavailability (Table 1; Fig. 1C). To determine the pharmacokinetic profile of MLN2238 and bortezomib in a second species, Sprague-Dawley rats were administered a single i.v. dose of MLN2238 at either 0.3 or 0.2 mg/kg or bortezomib at 0.2 mg/kg. Both MLN2238 doses provided a greater plasma exposure (AUC_{0-48h} of 704 and 1,070 h·ng/mL for 0.2 and 0.3 mg/kg doses, respectively) compared with bortezomib (AUC_{0-48h} of 206 h·ng/mL), confirming that MLN2238 also has improved plasma exposure compared with bortezomib in rodents (Fig. 1D).

MLN2238 induces a greater pharmacodynamic response than bortezomib in xenograft tumors. To further evaluate the activity of MLN2238 *in vivo*, a series of pharmacodynamic studies were performed in CB17-SCID mice bearing human prostate (CWR22) or human lymphoma tumors (WSU-DLCL2). Pharmacodynamic responses were assessed by measuring (a) the degree of 20S proteasome inhibition and (b) the expression levels of the GADD34 protein.

Blood and tumor 20S proteasome inhibition versus time profiles were generated for MLN2238 and bortezomib from both CWR22 and WSU-DLCL2 xenografts (Fig. 2). The AUE was calculated from 0 to 24 hours (AUE_{0-24h}) for both blood and tumor (Table 1). These AUEs represent the summation of the pharmacodynamic effect over a defined period of time in a particular tissue compartment. Calculating the tumor to blood AUE ratio provided a functional reflection of the distribution and durable pharmacodynamic effect of the drug in different tissue compartments. The maximum level of blood proteasome inhibition (E_{max}) following an acute i.v. dose of either MLN2238 (83.1%) or bortezomib (88.3%) was nearly identical (Table 1). However, the duration of the effect differed between the two molecules, with bortezomib having a more sustained response and, therefore, a greater blood AUE than MLN2238 (Fig. 2B and D). In contrast to blood, MLN2238 showed both greater maximum and sustained tumor proteasome inhibition compared with bortezomib in both xenograft models (Table 1; Fig. 2A and C). The tumor to blood AUE ratio for MLN2238 in CWR22s and WSU-DLCL2s was 1.56 and 2.03, respectively, compared with 0.69 and 0.26 for bortezomib (Table 1). Consistent with the pharmacokinetic profiles described for these two molecules (i.e., MLN2238 has a greater $V_{d_{ss}}$), these results showed that MLN2238 had a greater pharmacodynamic effect in tumor compared with blood, whereas the opposite was true for bortezomib. Consistent with the improved tumor E_{max} in MLN2238-treated mice, these data confirm that MLN2238 had a greater overall tumor pharmacodynamic effect than bortezomib as assessed by 20S inhibition.

Additional pharmacodynamic markers were examined to study the downstream effects of proteasome inhibition. One of the consequences of proteasome inhibition is the accumulation of proteins associated with the endoplasmic reticulum (ER) stress pathway and the unfolded protein response (UPR) pathway (11, 45–50). One of these proteins is GADD34, a stress-inducible gene that is also upregulated in response to DNA damage, hypoxia, and energy depletion

(51). Western blot analyses were performed on tumors isolated from CWR22 and WSU-DLCL2 xenograft-bearing mice treated with either MLN2238 or bortezomib (Fig. 3). Increased GADD34 expression was seen in CWR22 xenograft tumors following MLN2238 or bortezomib treatment, whereas an even greater response was seen following MLN2238 treatment (Fig. 3A). Similarly, bortezomib treatment only led to a minor increase in GADD34 levels in WSU-DLCL2 xenograft tumors, whereas MLN2238 strongly induced its expression (Fig. 3B). To confirm these results, and to get a better understanding of the magnitude of response across individual cells within the tumor, immunohistochemical staining was performed using the anti-GADD34 antibody (Proteintech). Strong GADD34 staining, reflecting increases in GADD34 protein levels, was seen across the majority of tumor cells in CWR22 xenografts 8 hours after a single i.v. dose of MLN2238 at 14 mg/kg (Fig. 3D) compared with very low staining in vehicle-treated CWR22 xenografts (Fig. 3C). Approximately a 5-fold increase in the total number of GADD34-positive cells was seen at 8 and 24 hours following MLN2238 treatment compared with vehicle control-treated tumors (Supplementary Fig. S1). In WSU-DLCL2 xenograft tumors, bortezomib treatment led to only a minor increase in GADD34 levels measured by Western blot, whereas MLN2238 strongly induced its expression (Fig. 3B). In addition, examining levels of ATF3, another gene upregulated during ER stress and UPR activation (48, 52, 53), revealed a similar pattern, with a greater number of cells staining positively for ATF3 following treatment of WSU-DLCL2 xenograft tumors with MLN2238 compared with bortezomib (Supplementary Fig. S2). These results confirm that the improved tumor exposure seen with MLN2238 translated into an improved tumor pharmacodynamic response both at the level of and downstream from the proteasome.

MLN2238 shows antitumor activity in the CWR22 xenograft model. To confirm that the pharmacodynamic responses seen in CWR22 xenografts would translate into antitumor activity, a series of efficacy experiments were performed comparing MLN2238 with bortezomib.

The antitumor effects of MLN2238 dosed at 14 mg/kg i.v. or 7 mg/kg i.v. were compared with bortezomib dosed at 0.8 mg/kg i.v. or 0.4 mg/kg i.v. on a twice weekly regimen (Fig. 4A). The high dose for both MLN2238 and bortezomib showed similar antitumor activity in this model ($T/C = 0.36$ and 0.44 , respectively). However, MLN2238 (7 mg/kg) showed greater efficacy at a 0.5 MTD dose compared with a 0.5 MTD dose of bortezomib (0.4 mg/kg; $T/C = 0.49$ compared with $T/C = 0.79$, respectively; Fig. 4A).

MLN2238 has moderate orally bioavailability (Table 1). In Fig. 4B, we show that oral dosing of MLN2238 resulted in antitumor activity in the CWR22 xenograft model ($T/C = 0.37$). Taken together, these results show that the human prostate CWR22 model is responsive to proteasome inhibition. Furthermore, a direct comparison between MLN2238 and bortezomib revealed similar antitumor activity when dosed at their respective MTDs; however, when both compounds were dosed at their respective 0.5 MTDs, MLN2238 showed improved activity over bortezomib (Fig. 4A).

MLN2238 shows improved efficacy compared with bortezomib in two models of lymphoma. MLN2238 showed greater tumor pharmacodynamic responses in WSU-DLCL2 xenografts compared with bortezomib (Table 1; Figs. 2 and 3). To assess whether the more robust pharmacodynamic response translated to greater antitumor activity, an efficacy study was performed in WSU-DLCL2 tumor-bearing mice. The antitumor effects of MLN2238 [dosed at 14 mg/kg i.v. twice weekly or 4 mg/kg s.c. once daily (QD)] were directly compared with bortezomib (dosed at 0.8 mg/kg i.v. twice weekly or 0.4 mg/kg s.c. QD; Fig. 5A). In this experiment, neither of the bortezomib doses showed strong antitumor activity ($T/C = 0.79$ and 0.9 for 0.8 mg/kg i.v. and 0.4 mg/kg s.c., respectively). In contrast, both intermittent and continuous MLN2238 dosing regimens showed strong antitumor activity ($T/C = 0.44$ and 0.29 for 14 mg/kg i.v. and 4 mg/kg s.c., respectively) and generated a greater apoptotic response in tumor tissue as measured by levels of cleaved caspase-3 (Supplementary Fig. S3).

The antitumor activity of MLN2238 and bortezomib was evaluated in a disseminated model of lymphoma. The ability of both drugs to reduce tumor burden and improve overall survival was assessed in this systemic lymphoma model. NOD-SCID mice were inoculated with OCI-Ly7-Luc cells expressing a luciferase reporter gene. Bioluminescent scans, obtained via quantitative Xenogen imaging, allowed tumor growth to be tracked over time in live animals. The strongest antitumor response was seen following treatment with MLN2238 at 4.0 mg/kg s.c. QD ($T/C = 0.20$; Fig. 5B). This dosing regimen also significantly prolonged overall survival in this model compared with vehicle-treated controls (median survival was 54 versus 33 days, $P = 0.05$; Fig. 5C). Much weaker antitumor responses were seen following bortezomib treatment at 0.4 mg/kg s.c. QD or 1.0 mg/kg i.v. once weekly ($T/C = 0.86$ and 0.76 , respectively). These bortezomib dosing regimens also did not significantly prolong survival (median survival was 33 and 43 days, respectively; $P > 0.99$ for both; Fig. 5C).

In summary, we have identified a second-generation small-molecule inhibitor of the proteasome. It has different physicochemical properties compared with bortezomib, including a shorter proteasome dissociation $t_{1/2}$, which we believe plays a critical role in the ability of this molecule to distribute into tissues. Improved pharmacokinetic and tolerability allow this molecule to be administered at higher doses, resulting in greater blood and plasma exposures. Consistent with these findings, we found a greater pharmacodynamic response in multiple xenograft models treated with MLN2238 compared with bortezomib, particularly in tumor, supporting our hypothesis that MLN2238 has improved distribution characteristics. Superior bioavailability also allows this molecule to be dosed orally, whereas bortezomib is restricted to i.v. and s.c. dosing regimens to achieve acceptable exposure levels. Data generated from both s.c. and disseminated xenograft efficacy studies show that MLN2238 has greater antitumor activity when administered by either intermittent or continuous dosing regimens and improves overall survival compared with bortezomib. Taken together, these data support the clinical

development of MLN9708 for both hematologic and solid tumor indications.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 2008;14:1649-57.

2. Dalton WS. The proteasome. *Semin Oncol* 2004;31:3-9; discussion 33.

3. Delic J, Masdehors P, Omura S, et al. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF- α -initiated apoptosis [see comment]. *Br J Cancer* 1998;77:1103-7.

4. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002;62:4996-5000.

5. Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, et al. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 1998;58:4342-8.

6. Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, et al. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J* 1996;317:385-8.

7. Adams J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. *Curr Opin Oncol* 2002;14:628-34.

8. Adams J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2003;8:307-15.

9. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004;5:417-21.

10. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev* 2006;5:596-613.

11. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia* 2007;21:30-6.

12. Voorhees PM, Dees EC, O'Neill B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:6316-25.

13. Belch A, Kouroukis CT, Crump M, et al. A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150. *Ann Oncol* 2007;18:116-21.

14. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4867-74.

15. Goy A, Younes A, McLaughlin P, et al. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:667-75.

16. O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, et al. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:676-84.

17. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-7.

18. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:2609-17.

19. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer* 2006;106:1316-9.

20. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007;110:3557-60.

21. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005;352:2487-98.

22. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M, et al. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger *in vivo* synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2008;111:1654-64.

Acknowledgments

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 07/24/2009; revised 12/14/2009; accepted 12/15/2009; published OnlineFirst 02/16/2010.

23. Cusack JC, Jr., Liu R, Xia L, et al. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model. *Clin Cancer Res* 2006;12:6758-64.

24. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 2007;67:6383-91.

25. Dorsey BD, Iqbal M, Chatterjee S, et al. Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008;51:1068-72.

26. Mitsiades CS, Hayden PJ, Anderson KC, Richardson PG. From the bench to the bedside: emerging new treatments in multiple myeloma. *Best Pract Res* 2007;20:797-816.

27. Piva R, Ruggeri B, Williams M, et al. CEP-18770: a novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood* 2008;111:2765-75.

28. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, et al. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:879-95.

29. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potent activity of caflizomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3281-90.

30. Slapnes C, Doskeland AP, Hatfield K, et al. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2007;136:814-28.

31. Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7156-61.

32. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998;92:367-80.

33. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.

34. Helmeier W, Ramos PC, Dohmen RJ. The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1562-78.

35. Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:333-8.

36. Williamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ, et al. Comparison of biochemical and biological effects of ML858 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3052-61.

37. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 2000;46:673-83.

38. Elliott PJ, Soucy TA, Pien CS, Adams J, Lightcap ES. Assays for proteasome inhibition. *Methods Mol Med* 2003;85:163-72.

39. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7071-5.

40. Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGV-proteasome pathway. *Mol Cell* 2007;26:831-42.

41. Tambyrajah WS, Bowler LD, Medina-Palazon C, Sinclair AJ. Cell cycle-dependent caspase-like activity that cleaves p27(KIP1) is the β (1) subunit of the 20S proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2007;466:186-93.

42. Toulou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001;20:2367-75.

43. Ang XL, Harper JW. Interwoven ubiquitination oscillators and control of cell cycle transitions. *Sci STKE* 2004;2004:pe31.
44. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-7.
45. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9946-51.
46. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:9695-704.
47. Kraus M, Malenke E, Gogel J, et al. Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1940-8.
48. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2200-5.
49. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 2007;67:1783-92.
50. Qbeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 2006;107:4907-16.
51. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* 1997;272:13731-7.
52. Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 1999;7:321-35.
53. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, et al. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 2004;24:1365-77.



Correction

Correction: Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

In this article (Cancer Res 2010;70:1970–80), which was published in the March 1, 2010 issue of *Cancer Research* (1), Paul Hales (Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts) should have been included as the ninth author. The online article has been changed to reflect this correction and no longer matches the print.

Reference

1. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, Yang Y, Hales P, Bruzzese F, Liu J, Blank J, Garcia K, Tsu C, Dick L, Fleming P, Yu L, Manfredi M, Rolfe M, Balen J. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res* 2010;70:1970–80.

Published OnlineFirst 04/27/2010.
©2010 American Association for Cancer Research.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0973



Correction

Correction: Online Publication Dates for
Cancer Research April 15, 2010 Articles

The following articles in the April 15, 2010 issue of *Cancer Research* were published with an online publication date of April 6, 2010 listed, but were actually published online on April 13, 2010:

Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresch D, Ginsberg M, Varner JA. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res* 2010;70:3042–51. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3761.

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010;70:3052–61. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690.

Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A. Somatic hypermethylation of *MSH2* is a frequent event in Lynch syndrome colorectal cancers. *Cancer Res* 2010;70:3098–108. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3290.

He X, Ota T, Liu P, Su C, Chien J, Shridhar V. Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3109–18. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3557.

Fiorentino M, Judson G, Penney K, Flavin R, Stark J, Fiore C, Fall K, Martin N, Ma J, Sinnott J, Giovannucci E, Stampfer M, Sesso HD, Kantoff PW, Finn S, Loda M, Mucci L. Immunohistochemical expression of BRCA1 and lethal prostate cancer. *Cancer Res* 2010;70:3136–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4100.

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanasi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Queiroz P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Oncogenic role of *miR-483-3p* at the *IGF2/483* locus. *Cancer Res* 2010;70:3140–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4456.

Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG II, Huang Q, Gelovani JG, Li C. Tumor site-specific silencing of *NF- κ B p65* by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection. *Cancer Res* 2010;70:3177–88. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3379.

Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Harvey CT, Lafortune MC, Myrthue A, Garzotto M, Nelson PS, Beer TM, Qian DZ. ID1 enhances docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells through inhibition of p21. *Cancer Res* 2010;70:3239–48. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3186.

Yoo BK, Chen D, Su Z-z, Gredler R, Yoo J, Shah K, Fisher PB, Sarkar D. Molecular mechanism of chemoresistance by astrocyte elevated gene-1. *Cancer Res* 2010;70:3249–58. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4009.

Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, Fan D, Krajewski S, Chiang GG, Mills GB, Arbeit JM. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res* 2010;70:3287–98. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3467.

Correction

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mierköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 2010;70:3299–308. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.

Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung H-J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. Aberrant activation of the androgen receptor by NF- κ B2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3309–19. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3703.

Acú ID, Liu T, Suino-Powell K, Mooney SM, D'Assoro AB, Rowland N, Muotri AR, Correa RG, Niu Y, Kumar R, Salisbury JL. Coordination of centrosome homeostasis and DNA repair is intact in MCF-7 and disrupted in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3320–8. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3800.

McFärlane C, Kelvin AA, de la Vega M, Govender U, Scott CJ, Burrows JF, Johnston JA. The deubiquitinating enzyme USP17 is highly expressed in tumor biopsies, is cell cycle regulated, and is required for G₁-S progression. *Cancer Res* 2010;70:3329–39. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4152.

Dudka AA, Sweet SMM, Heath JK. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res* 2010;70:3391–401. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3033.

Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The effect of CXCL12 processing on CD34⁺ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res* 2010;70:3402–10. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3977.

Published OnlineFirst 05/11/2010.
©2010 American Association for Cancer Research.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1347

Cancer Research

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al.

Cancer Res 2010;70:1970-1980. Publicado en línea primero. Febrero 16 de 2010.

Versión actualizada: Acceda a la versión más reciente de este artículo en: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766.

Material complementario: Acceda al material suplementario más reciente en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/02/15/0008-5472.CAN-09-2766.DC1.html>

Artículos citados: Este artículo cita 53 artículos, a 28 de los cuales usted puede acceder gratis en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#ref-list-1>

Artículos que citan: Este artículo ha sido citado por 17 artículos de HighWire. Acceda a los artículos en <http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#related-urls>

Alertas de E-mail: Regístrese para recibir alertas de E-mail gratuitas relacionadas con este artículo o revista

Reimpresiones y suscripciones: Para ordenar reimpresiones de este artículo o para suscribirse a la revista, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de pubs@aacr.org.

Permisos: Para solicitar permiso para re utilizar todo o algunas partes de este artículo, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de permissions@aacr.org.

Terapéutica, metas y biología química.

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, Bret Bannerman, Michael Fitzgerald, Allison Berger, Jie Yu, Yu Yang, Paul Hales, Frank Bruzzese, Jane Liu, Jonathan Blank, Khristofer Garcia, Christopher Tsu, Larry Dick, Paul Fleming, Li Yu, Mark Manfredi, Mark Rolfe, y Joe Bolen.

Resumen

La proteasoma fue validada como un blanco de la oncología luego del éxito clínico de VELCADE (bortezomib) para inyección para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma de células de manto recurrente. En consecuencia, diversos grupos están detrás del desarrollo de inhibidores de proteasoma de moléculas pequeñas adicionales tanto para indicaciones hematológicas como de tumores sólidos. En el presente artículo describimos el MLN9708, un inhibidor de proteasoma selectivo, biodisponible oralmente, de segunda generación que se encuentra en la fase I de desarrollo clínico. MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta, así como farmacocinética, farmacodinámica y actividad antitumor mejorada en comparación con el bortezomib. MLN9708 tiene una mayor distribución de volumen de sangre en estado estable, y los análisis de la inhibición de la proteasoma 20S, así como los marcadores de la respuesta de proteína desplegada confirmaron que MLN9708 tiene mayores efectos farmacodinámicos en los tejidos a comparación con el bortezomib. MLN9708 mostró actividad tanto en tumores sólidos como en modelos de xenoinjertos hematológicos, y encontramos una correlación entre mayores respuestas farmacodinámicas y actividad antitumor mejorada. Por otro lado, la actividad antitumor fue evidenciada a través de múltiples rutas de dosificación, incluyendo sonda oral. En conjunto, esta información soporta el desarrollo clínico de MLN9708 tanto para indicaciones hematológicas y de tumores sólidos. Cancer Res; 70(5); 1970-80. ©2010 AACR.

45

Cancer Research

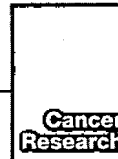


Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al.

Cancer Res 2010;70:1970-1980. Published OnlineFirst February 16, 2010.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/02/15/0008-5472.CAN-09-2766.DC1.html
Cited Articles	This article cites by 53 articles, 28 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 17 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#related-urls
E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .



Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, Bret Bannerman, Michael Fitzgerald, Allison Berger, Jie Yu, Yu Yang, Paul Hales, Frank Bruzzese, Jane Liu, Jonathan Blank, Khristofer Garcia, Christopher Tsu, Lary Dick, Paul Fleming, Li Yu, Mark Manfredi, Mark Rolfe, and Joe Bolen

Abstract

The proteasome was validated as an oncology target following the clinical success of VELCADE (bortezomib) for injection for the treatment of multiple myeloma and recurring mantle cell lymphoma. Consequently, several groups are pursuing the development of additional small-molecule proteasome inhibitors for both hematologic and solid tumor indications. Here, we describe MLN9708, a selective, orally bioavailable, second-generation proteasome inhibitor that is in phase I clinical development. MLN9708 has a shorter proteasome dissociation half-life and improved pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity compared with bortezomib. MLN9708 has a larger blood volume distribution at steady state, and analysis of 20S proteasome inhibition and markers of the unfolded protein response confirmed that MLN9708 has greater pharmacodynamic effects in tissues than bortezomib. MLN9708 showed activity in both solid tumor and hematologic preclinical xenograft models, and we found a correlation between greater pharmacodynamic responses and improved antitumor activity. Moreover, antitumor activity was shown via multiple dosing routes, including oral gavage. Taken together, these data support the clinical development of MLN9708 for both hematologic and solid tumor indications. *Cancer Res* 70(5): 1970–80. ©2010 AACR.

Introduction

The ubiquitin-proteasome system processes the majority of cellular proteins and is the principal manner by which cells regulate protein homeostasis. During normal protein homeostasis, specific proteins are targeted for destruction via the attachment of ubiquitin. These proteasome substrates include misfolded proteins and highly regulated members of critical signaling cascades, including proteins involved in growth control, cell cycle regulation, and apoptosis. Proteasome inhibition results in the stabilization and accumulation of these substrates, leading to the activation of antiproliferative signals, cell cycle disruption, activation of apoptotic pathways, and, ultimately, cell death (1, 2). Rapidly growing malignant cells, already deficient in normal cell cycle checkpoint mechanisms, seem to be highly susceptible to proteasome inhibition (3–6). Therefore, the proteasome emerged as an attractive target for anticancer

therapeutics. The success of the first-in-class small-molecule proteasome inhibitor VELCADE (bortezomib) for injection (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) validated the proteasome as a therapeutic target for the treatment of human cancer (1, 7–12). VELCADE is approved for the treatment of patients with multiple myeloma and previously treated mantle cell lymphoma (13–21). At present, there are multiple groups in the process of developing small-molecule proteasome inhibitors for various oncology indications. These include both reversible inhibitors, such as CEP-18770, and irreversible inhibitors, such as carfilzomib and NPI-0052. Both CEP-18770 and NPI-0052 are orally active, and all three compounds have shown antitumor activity in preclinical models and are currently in various stages of clinical development (22–30).

The 26S proteasome consists of a 20S multicatalytic core capped on either end with 19S regulatory subunits. The 20S proteasome is a chambered, barrel-like structure containing two heptameric rings made from α subunits and two heptameric rings made from β subunits. The α rings perform capping and gating functions, whereas three of the β subunits ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$) contain the NH_2 -terminal threonines responsible for the different proteasome proteolytic activities. The $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$ subunits are referred to as caspase-like, trypsin-like, and chymotrypsin-like, respectively, because the preferred cleavage site of each subunit is similar to those of other well-known proteases (2, 31–34).

Bortezomib shows time-dependent inhibition of the 20S proteasome by binding to the NH_2 -terminal threonine side chain of the catalytic β subunits. Bortezomib exhibits

Authors' Affiliation: Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

E. Kupperman and E.C. Lee contributed equally to this work.

Corresponding Author: Erik Kupperman, Millennium Pharmaceuticals, Inc., 35 Landsdowne Street, Cambridge, MA 02139. Phone: 617-551-3767; Fax: 617-444-1448; E-mail: erik.kupperman@mpi.com.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2766

©2010 American Association for Cancer Research.

inhibitory activity against all three β subunits but preferentially binds to and inhibits the $\beta 5$ site (35). Although bortezomib has shown clinical efficacy in multiple myeloma and mantle cell lymphoma, to date, it has yet to exhibit strong activity in solid tumor indications, perhaps due to its inability to penetrate into tissues and achieve therapeutically relevant concentrations at those target sites. Therefore, there is a strong rationale for identifying proteasome inhibitors that have different physicochemical or pharmacokinetic properties. Here, we describe the biochemical and preclinical pharmacology data that support the development of MLN9708. MLN9708 is a second-generation small-molecule proteasome inhibitor being developed for the treatment of a broad range of human malignancies. MLN9708 was selected from a large pool of boron-containing proteasome inhibitors based on a physicochemical profile that was distinct from bortezomib. MLN9708 has a shorter 20S proteasome dissociation half-life than bortezomib, which we believe plays an important role in its improved tissue distribution. Direct comparison with bortezomib revealed that MLN9708 has an improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profile and shows superior antitumor activity in both solid tumor and hematologic xenograft models, and shows antitumor activity when administered via multiple dosing routes and regimens. MLN9708 is currently being evaluated in multiple phase I clinical studies for both solid- and hematologic-based tumors.

Materials and Methods

Cell Culture

WSU-DLCL2, OCI-Ly7, A375, H460, HCT-116, HT-29, MDA-MB-231, HEK293, and Calu-6 cells were obtained from the American Type Culture Collection and maintained as recommended by the supplier.

In vitro Assays

Kinetic analysis of 20S proteasome inhibition. Kinetic analysis of 20S proteasome inhibition was performed as previously described by Williamson and colleagues (36).

NF- κ B-Luc and 4xUb-Luc cell-based reporter assays. NF- κ B-Luc and 4xUb-Luc cell-based reporter assays were performed as previously described by Williamson and colleagues (36).

Proteasome-Glo IC₅₀ and inhibitor washout cell-based assays. Calu-6 cells were cultured in MEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin and plated 1 d before the start of the experiment at 10,000 cells per well in a 384-well plate. For IC₅₀ determinations, cells were treated with varying concentrations of bortezomib or MLN2238 in DMSO (0.5% final, v/v) for 1 h at 37°C. For reversibility experiments, cells were treated with either 1 μ mol/L bortezomib or MLN2238 for 30 min at 37°C and then washed thrice in medium to remove the compounds. Cells were incubated for an additional 4 h at 37°C, after which the medium was removed and replaced with fresh medium. Proteasome activity was assessed by monitoring hydrolysis of the chymo-

trypsin-like substrate Suc-LLVY-aminoluciferin in the presence of luciferase using the Proteasome-Glo assay reagents according to the manufacturer's instructions (Promega Corp.). Luminescence was measured using a LEADseeker instrument (GE Healthcare Life Sciences).

Pharmacokinetic Studies

Blood and tumor samples were collected before dose and numerous time points after dosing. Each time point represents the average value of three animals. MLN2238 or bortezomib concentrations in blood and plasma samples were determined using a non-good laboratory practice liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)-based method. MLN2238 or bortezomib was isolated from 50 μ L of plasma or blood using a liquid-liquid extraction procedure. Sample (50 μ L) was mixed with 50 μ L of internal standard solution, 50 μ L of 0.5 mol/L HCl, and 500 μ L of methyl tertiary butyl ether. The supernatant (300 μ L) was then transferred to a clean 96-well plate, evaporated, reconstituted in 100 μ L of acetonitrile/water (5:95) containing 0.1% formic acid, and injected onto the LC/MS/MS system for analysis. A reverse-phase gradient method provided sample stacking and separation. Pharmacokinetic analysis of the blood and plasma concentration data was performed using WinNonlin version 5.2 (Pharsight Corp.). Kinetic parameters were estimated using a noncompartmental model using sparse sampling mode (model 201 for plasma and blood). Area under the concentration versus time curve (AUC) and area under the effect versus time curve (AUE) values were calculated using the linear trapezoidal rule.

Pharmacodynamic Studies

Approximately 200 μ L of whole blood were collected from each animal and processed for the 20S blood proteasome inhibition assay. Subcutaneous tumors (approximately 600–800 mm³ in size) were harvested and divided into two or three parts. One was processed for the 20S tissue proteasome inhibition assay, one for Western blot analysis, and one for immunohistochemistry.

Tumor processing for 20S tissue proteasome assays. Frozen samples were pulverized in the Tissue CryoPrep (Covaris) and transferred to glass tubes. After addition of 1 mL of cold tissue lysis buffer [50 mmol/L HEPES (pH 8.0), 1 mmol/L DTT], samples were placed on ice and homogenized as per the manufacturer's instructions using the Covaris E200.

Tumor processing for Western blot assays. Tumors were processed as described above in the Covaris E200. M-PER lysis buffer (Pierce) was supplemented with the following: 1 $\times$ protease inhibitor cocktail set (Calbiochem), 2 mmol/L sodium orthovanadate (Sigma), 25 mmol/L sodium fluoride, and 25 mmol/L β -glycerophosphate. Cold lysis buffer (300–800 μ L) was added to the tumors just before sonication. After sonication, supernatants were transferred to new tubes and protein concentrations were determined.

Western blot analysis. Tumor lysate (50 μ g) was loaded onto 4% to 12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Proteins were transferred to PVDF-FL membranes (Millipore) using a

semidry transfer apparatus. After transfer and blocking, membranes were incubated with primary antibody overnight at 4°C. Membranes were washed thrice with TBS-Tween 20 (TBST) and incubated with Alexa Fluor 680-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G (Molecular Probes) for 1 h. Membranes were washed five times with TBST and once with TBS while protected from light. Membranes were dried and scanned with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). The following primary antibodies were used: anti-tubulin (rabbit polyclonal, 1:15,000 dilution; Abcam) and anti-growth arrest DNA damage 34 (GADD34; Proteintech Group, Inc.). Secondary antibody was used at 1:20,000 for tubulin and 1:2,000 for GADD34. Quantitation of Western blot signals was performed with Odyssey software.

20S β 5 proteasome tumor and blood assays. 20S β 5 proteasome tumor and blood assays were performed as previously described (36–38).

Immunohistochemical studies. Formalin-fixed, paraffin-embedded CWR22 and WSU-DLCL2 xenograft tumor sections (5 μ m) were stained with primary antibodies to GADD34, activating transcription factor 3 (ATF3), and cleaved caspase-3 (Proteintech Group, Santa Cruz Biotechnology, and Cell Signaling Technology). The GADD34 and ATF3 antibodies were detected with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (UltraMap anti-rabbit, Ventana Medical Systems) and incubated with the Chromo-Map 3.3'-diaminobenzidine (DAB) kit (Ventana Medical Systems). The cleaved caspase-3 antibody was detected with Alexa Fluor 594-labeled secondary antibody (Invitrogen). Slides were counterstained with hematoxylin for GADD34 and ATF3 assays and 4',6-diamidino-2-phenylindole for cleaved caspase-3 assay. Images were captured using an Eclipse E800 microscope (Nikon Instruments), 20 $\times$ objective, and Retiga EXi color digital camera (QImaging). Five fields of view were captured per sample, and images were processed using MetaMorph software (Molecular Devices). Pharmacodynamic marker levels were measured by color thresholding on the DAB or fluorescent signal and measuring area of thresholded signal. Percent positive area was calculated by normalizing with the total area of the field of view.

Animal Care

CB17-severe combined immunodeficient (SCID) and non-obese diabetic (NOD)-SCID mice were housed and maintained in a controlled environment and received food and water *ad libitum*. Veterinary care for the animals was provided in accordance with Millennium Institutional Animal Care and Use Committee.

Efficacy Studies

CWR22 xenografts. Male CB17-SCID mice (Charles River Laboratories), approximately 8 to 11 wk of age, were inoculated s.c. with freshly dissected CWR22 tumor fragments (~20 mg) in the right dorsal flank. Mean tumor volume (MTV) was calculated using the following formula: $0.5 \times (\text{length} \times \text{width}^2)$. When MTV reached approximately

150 to 200 mm³, animals were randomized into treatment groups ($n = 10$ per group) before dosing. Antitumor activity was determined at the end of the study by calculating the treatment over control (T/C) ratio of their MTVs at the end of the study.

WSU-DLCL2 xenografts. Female CB17-SCID mice, ~6 wk of age, were inoculated s.c. with 4×10^6 WSU-DLCL2 tumor cells suspended in 0.1 mL RPMI 1640 in the right dorsal flank. Animals were randomized, and the MTV and T/C ratio were calculated as described above.

OCI-Ly7-Luc disseminated xenografts. Female NOD-SCID mice, ~9 wk of age, were inoculated i.v. via the tail vein with 1.0×10^6 OCI-Ly7-Luc tumor cells. Mice were randomized into treatment groups ($n = 10$ per group) on day 7 after inoculation. For each imaging session, animals received 150 mg/kg of luciferin (Caliper Life Sciences) via i.p. injection. Animal dorsal and ventral views were imaged to determine total photon flux. Images were captured by the Xenogen IVIS imaging system (Xenogen Corp.), and data were collected with Xenogen Living Image software (Living Image 3.0.2.2). Antitumor activity was determined by calculating the T/C ratio of the mean photon flux measurements at the end of the study. Survival curves were generated using the Kaplan-Meier method.

Statistical Analyses

Efficacy data were analyzed using a linear mixed-effect regression model. Differences among mice were treated as random effects, and a compound symmetry covariance structure was used to model the variability between repeated tumor measurements for each mouse. Treatment comparisons were performed by taking fitted curves from the model to calculate Δ AUCs. The significance of the Δ AUC was assessed using permutation testing. P values of ≤ 0.05 were considered significant. For the OCI-Ly7-Luc study, differences in total photon flux among mice were compared using one-way ANOVA and pairwise comparisons were adjusted by the Tukey-Kramer method. Survival curves generated using the Kaplan-Meier methods were compared using the log-rank (Mantel-Cox) test and pairwise comparisons were adjusted with the Bonferroni correction.

Results and Discussion

MLN2238 is a selective, potent, and reversible inhibitor of the proteasome. MLN9708 was identified in screens for small-molecule proteasome inhibitors with an improved pharmacologic profile compared with bortezomib (Fig. 1). In preclinical studies, MLN9708 immediately hydrolyzed to MLN2238 (see Supplementary Data), the biologically active form, on exposure to aqueous solutions or plasma. In studies where a solution of MLN9708 was added directly into rat, dog, or human plasma and immediately extracted and analyzed by high-performance liquid chromatography, only MLN2238 could be identified. MLN2238 is an N-capped dipeptidyl leucine boronic acid and preferentially bound to and inhibited the chymotrypsin-like proteolytic (β 5) site

of the 20S proteasome with an IC_{50} value of 3.4 nmol/L (K_i of 0.93 nmol/L; Table 1). At higher concentrations, it also inhibited the caspase-like ($\beta 1$) and trypsin-like ($\beta 2$) proteolytic sites (IC_{50} of 31 and 3,500 nmol/L, respectively). Although the selectivity and potency of MLN2238 were similar to that of bortezomib, the proteasome binding kinetics for these two molecules are different. Both MLN2238 and bortezomib showed time-dependent reversible proteasome inhibition; however, the proteasome dissociation half-life ($t_{1/2}$) for MLN2238 was determined to be ~6-fold faster than that of bortezomib ($t_{1/2}$ of 18 and 110 minutes, respectively).

MLN2238 is a potent inhibitor of the proteasome in tumor cells. To build on the biochemistry results, a series of cell-based experiments were performed to confirm potent proteasome inhibition in cells. Proteasome inhibition results in the stabilization and accumulation of ubiquitinated proteins, which have been targeted for destruction.

This leads to cell cycle disruption, activation of apoptotic pathways, and active cell death (39–43). Initial studies examined the effects of MLN2238 treatment on an exogenous proteasome substrate. MDA-MB-231 cells expressing a 4xUb-Luc reporter (36) were treated with increasing concentrations of MLN2238 and bortezomib. Both compounds strongly inhibited proteasome activity, resulting in accumulation of the luciferase reporter with similar EC_{50} values (Table 1). The effect of bortezomib and MLN2238 on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced activation of the NF- κ B pathway was also examined (44). Proteasome inhibition prevents the degradation of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B, resulting in a decrease in NF- κ B-driven gene expression. HEK293 cells stably expressing a NF- κ B-Luc reporter were treated with increasing concentrations of MLN2238 and bortezomib. Both compounds strongly inhibited TNF- α -induced activation of the NF- κ B pathway, resulting in similar EC_{50} values (Table 1).

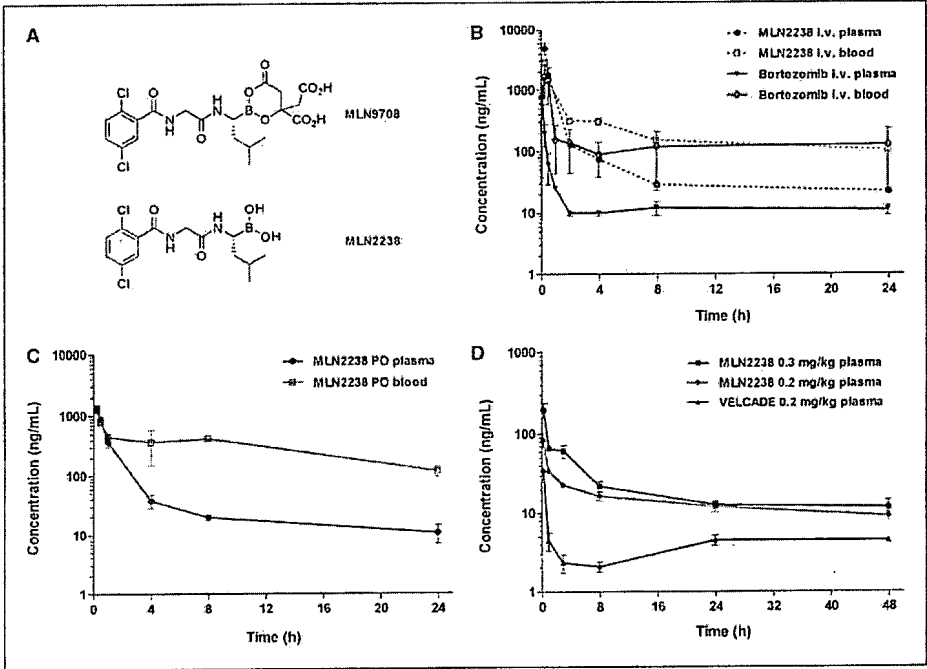


Figure 1. Structure of MLN9708. A, blood and plasma concentration versus time profile of MLN2238 and bortezomib in CB17-SCID mice following an acute i.v. administration (100 μ L per mouse) at 14 or 0.8 mg/kg, respectively. B, blood and plasma concentration versus time profile following an acute oral administration of MLN2238 in CB17-SCID mice at 11 mg/kg (100 μ L per mouse). C, plasma concentration versus time profile following an acute i.v. administration (200 μ L per rat) of MLN2238 and bortezomib in nude rats at 0.3, 0.2, and 0.2 mg/kg, respectively. D, bars, SD, $n = 3$ for all time points, except 0.5 h after dose in plasma for MLN2238 i.v., 1 h after dose in plasma for bortezomib i.v., and 0.5 and 8 h after dose in blood for MLN2238 orally (PO), where $n = 2$.

Table 1. Summary of MLN2238 and bortezomib enzymology, pharmacokinetic, and pharmacodynamic parameters

		MLN2238		Bortezomib	
Biochemical assays					
β5 K _i (nmol/L)		0.93 (0.64–1.4, n = 3)		0.55 (0.34–0.89, n = 3)	
β5 IC ₅₀ (nmol/L)		3.4 (2.8–4.1, n = 3)		2.4 (2.0–2.9, n = 45)	
β2 IC ₅₀ (nmol/L)		3,500		1,200	
β1 IC ₅₀ (nmol/L)		31		24 (14.5–40, n = 12)	
β5 dissociation half-life (min)		18 (6.8–30, n = 3)		110 (71–150, n = 3)	
Cell-based assays					
MDA-MB-231 4xUb-Luc EC ₅₀ (nmol/L)		525 (330–840, n = 4)		310 (230–400, n = 29)	
E _{max} (fold stimulation)		265 (160–370, n = 4)		370 (330–410, n = 29)	
HEK293 NF-κB-Luc EC ₅₀ (nmol/L)		55 (33–91, n = 7)		33 (27–40, n = 23)	
E _{max} (% maximum inhibition)		99.3 (99.0–99.6, n = 7)		99.6 (99.3–100, n = 23)	
Calu-6 Proteasome-Glo IC ₅₀ (nmol/L)		9.7 (n = 7)		4.8 (n = 12)	
Calu-6 Proteasome-Glo (% activity),* t = 4 h, no washout		7.1 (3.6–10.6, n = 5)		3.45 (2.0–4.9, n = 5)	
Calu-6 Proteasome-Glo (% Activity),* t = 4 h, washout		69 (66–71, n = 5)		20 (18–23, n = 5)	
A375 ATPite LD ₅₀ (nmol/L)		20		6.5	
H460 ATPite LD ₅₀ (nmol/L)		58		13	
HCT-116 ATPite LD ₅₀ (nmol/L)		19		4	
HT-29 ATPite LD ₅₀ (nmol/L)		52		7	
Pharmacokinetic parameters					
Agent	Dose and route	Matrix	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0–24h} (h·ng/mL)	Vd (L/kg) F%
MLN2238	14 mg/kg i.v.	Plasma	17,000	8,090	20.2 27.8 59.5
	14 mg/kg i.v.	Blood	10,500	9,660	
	11 mg/kg orally	Plasma	1,630	1,810	
	11 mg/kg orally	Blood	1,710	6,310	
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Plasma	321	485	4.3
	0.8 mg/kg i.v.	Blood	548	4422	
Pharmacodynamic parameters					
Agent	Dose and route	Matrix	E _{max} (%)	AUE _{0–24h} (%I·h)	AUE ratio (tumor/blood)
MLN2238	14 mg/kg i.v.	Blood	83.1 [†]	718 [†]	1.56 2.03
	14 mg/kg i.v.	Tumor (CWR22)	69.1	1120	
	14 mg/kg i.v.	Tumor (WSU-DLCL2)	77.0	1460	
Bortezomib	0.8 mg/kg i.v.	Blood	88.3 [‡]	1170 [‡]	0.69 0.26
	0.8 mg/kg i.v.	Tumor (CWR22)	44.8	804	
	0.8 mg/kg i.v.	Tumor (WSU-DLCL2)	27.6	306	

NOTE: Results are reported as mean (95% confidence interval, number of experiments).
Abbreviations: K_i, inhibition dissociation constant; E_{max}, maximum effect; F%, oral bioavailability; t = time; AUC_{0–24 h}, AUC from 0 to 24 h; C_{max}, maximum concentration; Vd, volume of distribution; %I, percentage of inhibition.
*After exposure to 1 μmol/L MLN2238 or 1 μmol/L bortezomib for 30 min.
[†]For MLN2238, blood E_{max} = 81.3% to 85.0% (n = 2) and AUE_{0–24h} = 554 to 882 (n = 2).
[‡]For bortezomib, blood E_{max} = 86.8% to 89.8% (n = 2) and AUE_{0–24h} = 1,140 to 1,200 (n = 2).

The effect of MLN2238 or bortezomib on β5 activity was determined *in situ* using the Proteasome-Glo cell-based assay. The IC₅₀ values determined by this assay following 1 hour of treatment with MLN2238 or bortezomib were in the low nanomolar range and comparable with those calculated with purified 20S proteasome. Recovery of pro-

teasome activity was determined by performing washout experiments with MLN2238 or bortezomib. Cells were treated with the drug for 4 hours, after which the drug was removed and proteasome activity was assessed. Proteasome activity in MLN2238-treated cells recovered to 69% of control cells, whereas activity in bortezomib-treated

cells recovered to only 20% (Table 1). The difference in recovery of proteasome activity between MLN2238 and bortezomib is consistent with the observed differences in proteasome $t_{1/2}$ between the two molecules.

Cell viability studies were performed in a variety of mammalian cell lines to compare the *in vitro* antiproliferative effects of MLN2238 with bortezomib. Studies performed with A375 (lung), H460 (lung), HCT-116 (colon), and HT-29 (colon) cells revealed similar LD₅₀ values for the two compounds, which ranged from 4 to 58 nmol/L (Table 1).

Taken together, these *in vitro* studies show that MLN2238 is a potent inhibitor of the $\beta 5$ site of the 20S proteasome and that MLN2238 dissociated more rapidly from the proteasome than bortezomib, consistent with faster recovery of proteasome activity observed in the Proteasome-Glo assay. Given the high concentrations of proteasome found in RBCs, we hypothesized that RBC partitioning would serve

as a drug sink for bortezomib and limit its distribution outside of the blood compartment; the shorter proteasome $t_{1/2}$ of MLN2238 should allow improved drug distribution into tissues. To address this issue directly, a series of pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy studies with MLN2238 and bortezomib were performed in different xenograft models.

Pharmacokinetics of MLN2238 and bortezomib. To determine the pharmacokinetic profile of MLN2238 and bortezomib, mice were administered a single dose of MLN2238 at 14 mg/kg i.v. and 11 mg/kg orally or bortezomib at 0.8 mg/kg i.v. These doses represent the maximum tolerated dose (MTD) for each drug for the specified route of administration. Exposures were determined by measuring the blood and plasma drug concentrations at various time points following the initial dose (Table 1). The concentration-versus-time curve of i.v. administered MLN2238 displayed a distinct biexponential profile with a steep ini-

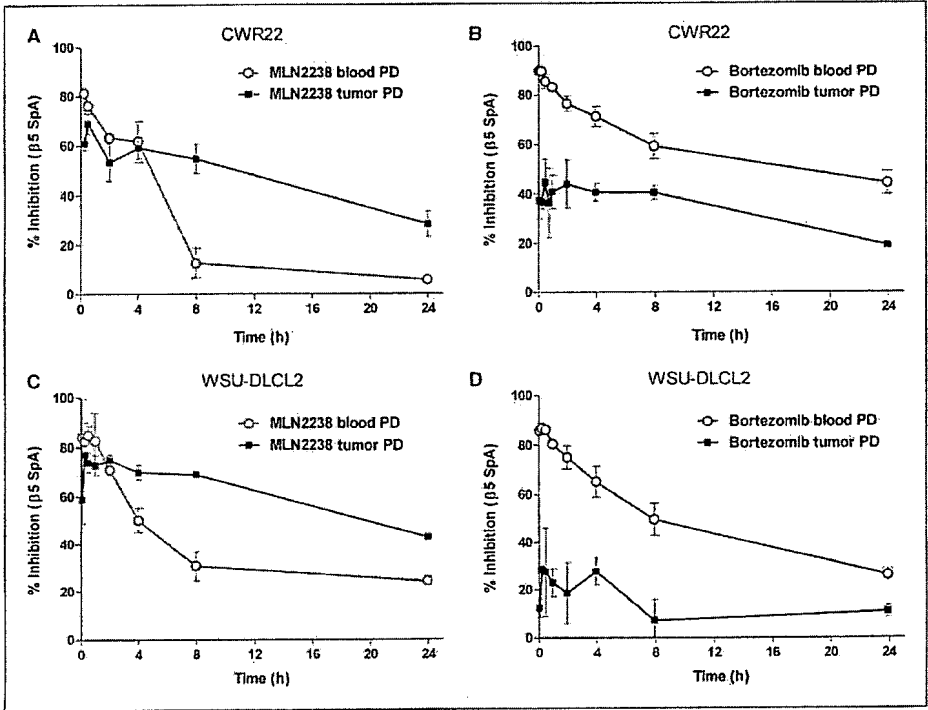


Figure 2. Blood and tumor proteasome inhibition versus time profile of MLN2238 (14 mg/kg; A and C) and bortezomib (0.8 mg/kg; B and D) following acute i.v. administration in CWR22 (A and B) and WSU-DLCL2 (C and D) tumor-bearing mice. Pharmacodynamic responses in blood and tumor were determined by measuring 20S proteasome $\beta 5$ enzyme inhibition in blood and tumor at different time points.

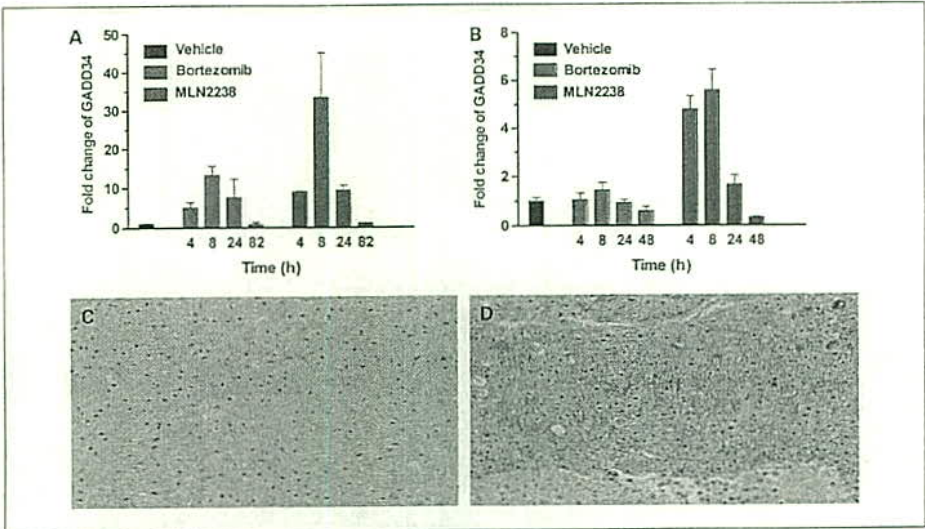


Figure 3. Pharmacodynamic responses in tumor were determined by measuring GADD34 protein levels at different time points via Western blot and quantitated with the Odyssey Infrared Imaging System. A and B, normalized GADD34 response versus time profile shown as fold change from vehicle control following acute i.v. administration of MLN2238 at 10 mg/kg and bortezomib at 0.8 mg/kg in CWR22 (A) and WSU-DLCL2 (B) tumor-bearing mice. Columns, mean of three tumors per group, except CWR22 vehicle group with four tumors and WSU-DLCL2 vehicle group with five tumors; bars, SD. Immunohistochemical staining (C and D) for GADD34 in CWR22 xenograft tumors 8 h following an acute i.v. dose of either vehicle (C) or MLN2238 at 14 mg/kg (D).

tial distribution phase and a long terminal $t_{1/2}$ (>24 hours; Fig. 1B). Due to extensive RBC partitioning, whole-body tissue distribution is most accurately reflected in blood volume distribution at steady state ($V_{d_{ss}}$) rather than

plasma volume distribution at steady state ($V_{d_{ss,p}}$). MLN2238 showed larger $V_{d_{ss,b}}$ (20.2 L/kg) compared with bortezomib (4.3 L/kg), providing supportive evidence that MLN2238 more easily moves from the blood compartment

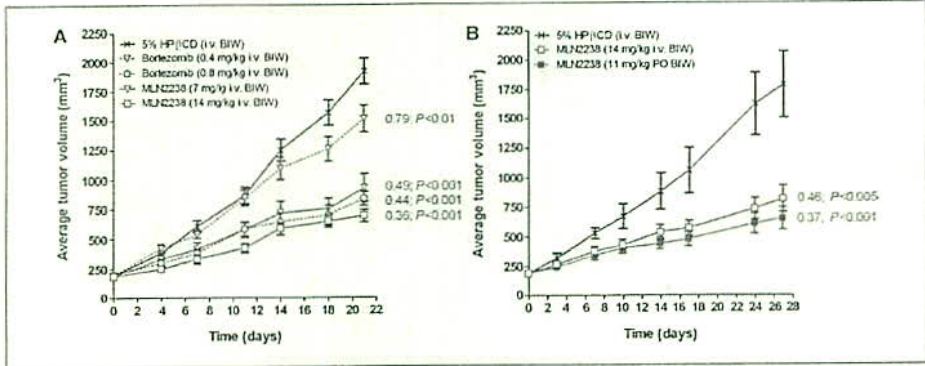


Figure 4. Antitumor activity of MLN2238 and bortezomib in CWR22 tumor-bearing mice ($n = 10$). A, animals were dosed i.v. twice weekly (BIW) with vehicle (5% HPβCD), bortezomib (0.4 and 0.8 mg/kg in 0.9% saline), and MLN2238 (7 and 14 mg/kg in 5% HPβCD). B, animals were dosed i.v. twice weekly with vehicle, i.v. twice weekly with MLN2238 (14 mg/kg), or orally twice weekly with MLN2238 (11 mg/kg). Points, average tumor volume in each treatment group; bars, SE. T/C and P values were calculated as described in Materials and Methods. A P value of ≤ 0.05 was considered significant.

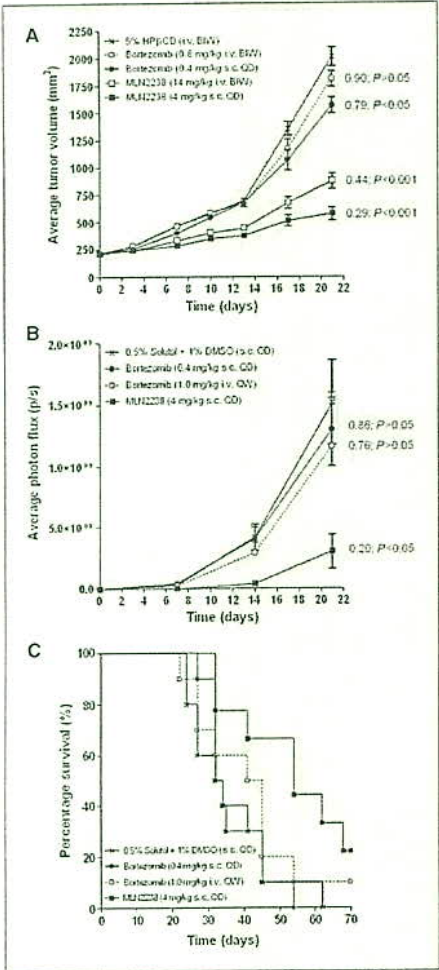


Figure 5. Antitumor activity of MLN2238 and bortezomib in two lymphoma xenograft models. Each treatment group consisted of 10 mice. A, antitumor activity in WSU-DLCL2 xenografts. Animals were dosed with vehicle (5% HPβCD i.v. twice weekly), bortezomib (0.8 mg/kg i.v. twice weekly or 0.4 mg/kg s.c. QD), or MLN2238 (14 mg/kg i.v. twice weekly or 4 mg/kg s.c. QD) for 3 consecutive weeks. B, antitumor activity in the OCI-Ly7-Luc disseminated lymphoma model. Animals were dosed with vehicle (0.5% Solutol + 1% DMSO i.v. twice weekly), bortezomib (0.4 mg/kg in 0.9% saline i.v. QW), bortezomib (1.0 mg/kg in 0.9% saline i.v. QW), or MLN2238 (4 mg/kg in 0.5% Solutol + 1% DMSO s.c. QD) for 3 consecutive weeks. Points, average tumor volume; bars, SE. T/C and P values were calculated as described in Materials and Methods. A P value of ≤ 0.05 was considered significant. C, Kaplan-Meier survival profile.

into the tissue compartment. MLN2238 also showed moderate oral bioavailability (Table 1; Fig. 1C). To determine the pharmacokinetic profile of MLN2238 and bortezomib in a second species, Sprague-Dawley rats were administered a single i.v. dose of MLN2238 at either 0.3 or 0.2 mg/kg or bortezomib at 0.2 mg/kg. Both MLN2238 doses provided a greater plasma exposure (AUC_{0-48h} of 704 and 1,070 h-ng/mL for 0.2 and 0.3 mg/kg doses, respectively) compared with bortezomib (AUC_{0-48h} of 206 h-ng/mL), confirming that MLN2238 also has improved plasma exposure compared with bortezomib in rodents (Fig. 1D).

MLN2238 induces a greater pharmacodynamic response than bortezomib in xenograft tumors. To further evaluate the activity of MLN2238 *in vivo*, a series of pharmacodynamic studies were performed in CB17-SCID mice bearing human prostate (CWR22) or human lymphoma tumors (WSU-DLCL2). Pharmacodynamic responses were assessed by measuring (a) the degree of 20S proteasome inhibition and (b) the expression levels of the GADD34 protein.

Blood and tumor 20S proteasome inhibition versus time profiles were generated for MLN2238 and bortezomib from both CWR22 and WSU-DLCL2 xenografts (Fig. 2). The AUE was calculated from 0 to 24 hours (AUE_{0-24h}) for both blood and tumor (Table 1). These AUEs represent the summation of the pharmacodynamic effect over a defined period of time in a particular tissue compartment. Calculating the tumor to blood AUE ratio provided a functional reflection of the distribution and durable pharmacodynamic effect of the drug in different tissue compartments. The maximum level of blood proteasome inhibition (E_{max}) following an acute i.v. dose of either MLN2238 (83.1%) or bortezomib (88.3%) was nearly identical (Table 1). However, the duration of the effect differed between the two molecules, with bortezomib having a more sustained response and, therefore, a greater blood AUE than MLN2238 (Fig. 2B and D). In contrast to blood, MLN2238 showed both greater maximum and sustained tumor proteasome inhibition compared with bortezomib in both xenograft models (Table 1; Fig. 2A and C). The tumor to blood AUE ratio for MLN2238 in CWR22s and WSU-DLCL2s was 1.56 and 2.03, respectively, compared with 0.69 and 0.26 for bortezomib (Table 1). Consistent with the pharmacokinetic profiles described for these two molecules (i.e., MLN2238 has a greater Vd_{ss}), these results showed that MLN2238 had a greater pharmacodynamic effect in tumor compared with blood, whereas the opposite was true for bortezomib. Consistent with the improved tumor E_{max} in MLN2238-treated mice, these data confirm that MLN2238 had a greater overall tumor pharmacodynamic effect than bortezomib as assessed by 20S inhibition.

Additional pharmacodynamic markers were examined to study the downstream effects of proteasome inhibition. One of the consequences of proteasome inhibition is the accumulation of proteins associated with the endoplasmic reticulum (ER) stress pathway and the unfolded protein response (UPR) pathway (11, 45–50). One of these proteins is GADD34, a stress-inducible gene that is also upregulated in response to DNA damage, hypoxia, and energy depletion

(51). Western blot analyses were performed on tumors isolated from CWR22 and WSU-DLCL2 xenograft-bearing mice treated with either MLN2238 or bortezomib (Fig. 3). Increased GADD34 expression was seen in CWR22 xenograft tumors following MLN2238 or bortezomib treatment, whereas an even greater response was seen following MLN2238 treatment (Fig. 3A). Similarly, bortezomib treatment only led to a minor increase in GADD34 levels in WSU-DLCL2 xenograft tumors, whereas MLN2238 strongly induced its expression (Fig. 3B). To confirm these results, and to get a better understanding of the magnitude of response across individual cells within the tumor, immunohistochemical staining was performed using the anti-GADD34 antibody (Proteintech). Strong GADD34 staining, reflecting increases in GADD34 protein levels, was seen across the majority of tumor cells in CWR22 xenografts 8 hours after a single i.v. dose of MLN2238 at 14 mg/kg (Fig. 3D) compared with very low staining in vehicle-treated CWR22 xenografts (Fig. 3C). Approximately a 5-fold increase in the total number of GADD34-positive cells was seen at 8 and 24 hours following MLN2238 treatment compared with vehicle control-treated tumors (Supplementary Fig. S1). In WSU-DLCL2 xenograft tumors, bortezomib treatment led to only a minor increase in GADD34 levels measured by Western blot, whereas MLN2238 strongly induced its expression (Fig. 3B). In addition, examining levels of ATF3, another gene upregulated during ER stress and UPR activation (48, 52, 53), revealed a similar pattern, with a greater number of cells staining positively for ATF3 following treatment of WSU-DLCL2 xenograft tumors with MLN2238 compared with bortezomib (Supplementary Fig. S2). These results confirm that the improved tumor exposure seen with MLN2238 translated into an improved tumor pharmacodynamic response both at the level of and downstream from the proteasome.

MLN2238 shows antitumor activity in the CWR22 xenograft model. To confirm that the pharmacodynamic responses seen in CWR22 xenografts would translate into antitumor activity, a series of efficacy experiments were performed comparing MLN2238 with bortezomib.

The antitumor effects of MLN2238 dosed at 14 mg/kg i.v. or 7 mg/kg i.v. were compared with bortezomib dosed at 0.8 mg/kg i.v. or 0.4 mg/kg i.v. on a twice weekly regimen (Fig. 4A). The high dose for both MLN2238 and bortezomib showed similar antitumor activity in this model ($T/C = 0.36$ and 0.44 , respectively). However, MLN2238 (7 mg/kg) showed greater efficacy at a 0.5 MTD dose compared with a 0.5 MTD dose of bortezomib (0.4 mg/kg; $T/C = 0.49$ compared with $T/C = 0.79$, respectively; Fig. 4A).

MLN2238 has moderate orally bioavailability (Table 1). In Fig. 4B, we show that oral dosing of MLN2238 resulted in antitumor activity in the CWR22 xenograft model ($T/C = 0.37$). Taken together, these results show that the human prostate CWR22 model is responsive to proteasome inhibition. Furthermore, a direct comparison between MLN2238 and bortezomib revealed similar antitumor activity when dosed at their respective MTDs; however, when both compounds were dosed at their respective 0.5 MTDs, MLN2238 showed improved activity over bortezomib (Fig. 4A).

MLN2238 shows improved efficacy compared with bortezomib in two models of lymphoma. MLN2238 showed greater tumor pharmacodynamic responses in WSU-DLCL2 xenografts compared with bortezomib (Table 1; Figs. 2 and 3). To assess whether the more robust pharmacodynamic response translated to greater antitumor activity, an efficacy study was performed in WSU-DLCL2 tumor-bearing mice. The antitumor effects of MLN2238 [dosed at 14 mg/kg i.v. twice weekly or 4 mg/kg s.c. once daily (QD)] were directly compared with bortezomib (dosed at 0.8 mg/kg i.v. twice weekly or 0.4 mg/kg s.c. QD; Fig. 5A). In this experiment, neither of the bortezomib doses showed strong antitumor activity ($T/C = 0.79$ and 0.9 for 0.8 mg/kg i.v. and 0.4 mg/kg s.c., respectively). In contrast, both intermittent and continuous MLN2238 dosing regimens showed strong antitumor activity ($T/C = 0.44$ and 0.29 for 14 mg/kg i.v. and 4 mg/kg s.c., respectively) and generated a greater apoptotic response in tumor tissue as measured by levels of cleaved caspase-3 (Supplementary Fig. S3).

The antitumor activity of MLN2238 and bortezomib was evaluated in a disseminated model of lymphoma. The ability of both drugs to reduce tumor burden and improve overall survival was assessed in this systemic lymphoma model. NOD-SCID mice were inoculated with OCI-Ly7-Luc cells expressing a luciferase reporter gene. Bioluminescent scans, obtained via quantitative Xenogen imaging, allowed tumor growth to be tracked over time in live animals. The strongest antitumor response was seen following treatment with MLN2238 at 4.0 mg/kg s.c. QD ($T/C = 0.20$; Fig. 5B). This dosing regimen also significantly prolonged overall survival in this model compared with vehicle-treated controls (median survival was 54 versus 33 days, $P = 0.05$; Fig. 5C). Much weaker antitumor responses were seen following bortezomib treatment at 0.4 mg/kg s.c. QD or 1.0 mg/kg i.v. once weekly ($T/C = 0.86$ and 0.76 , respectively). These bortezomib dosing regimens also did not significantly prolong survival (median survival was 33 and 43 days, respectively; $P > 0.99$ for both; Fig. 5C).

In summary, we have identified a second-generation small-molecule inhibitor of the proteasome. It has different physicochemical properties compared with bortezomib, including a shorter proteasome dissociation $t_{1/2}$, which we believe plays a critical role in the ability of this molecule to distribute into tissues. Improved pharmacokinetic and tolerability allow this molecule to be administered at higher doses, resulting in greater blood and plasma exposures. Consistent with these findings, we found a greater pharmacodynamic response in multiple xenograft models treated with MLN2238 compared with bortezomib, particularly in tumor, supporting our hypothesis that MLN2238 has improved distribution characteristics. Superior bioavailability also allows this molecule to be dosed orally, whereas bortezomib is restricted to i.v. and s.c. dosing regimens to achieve acceptable exposure levels. Data generated from both s.c. and disseminated xenograft efficacy studies show that MLN2238 has greater antitumor activity when administered by either intermittent or continuous dosing regimens and improves overall survival compared with bortezomib. Taken together, these data support the clinical

development of MLN9708 for both hematologic and solid tumor indications.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 2008;14:1649-57.

2. Dalton WS. The proteasome. *Semin Oncol* 2004;31:3-9; discussion 33.

3. Delic J, Masdehors P, Omura S, et al. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF- α -initiated apoptosis [see comment]. *Br J Cancer* 1998;77:1103-7.

4. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002;62:4996-5000.

5. Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, et al. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 1998;58:4342-8.

6. Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, et al. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J* 1996;317:385-8.

7. Adams J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. *Curr Opin Oncol* 2002;14:628-34.

8. Adams J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* 2003;8:307-15.

9. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004;5:417-21.

10. Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev* 2006;5:596-613.

11. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia* 2007;21:30-6.

12. Voorhees PM, Dees EC, O'Neill B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:6316-25.

13. Belch A, Kouroukis CT, Crump M, et al. A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150. *Ann Oncol* 2007;18:116-21.

14. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4667-74.

15. Goy A, Younes A, McLaughlin P, et al. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:667-75.

16. O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, et al. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:676-84.

17. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-7.

18. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:2609-17.

19. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer* 2006;106:1316-9.

20. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007;110:3557-60.

21. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005;352:2487-98.

22. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M, et al. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger *in vivo* synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2008;111:1654-64.

Acknowledgments

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 07/24/2009; revised 12/14/2009; accepted 12/15/2009; published OnlineFirst 02/16/2010.

23. Cusack JC, Jr., Liu R, Xia L, et al. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model. *Clin Cancer Res* 2006;12:6758-64.

24. Dermo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 2007;67:6383-91.

25. Dorsey BD, Iqbal M, Chatterjee S, et al. Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008;51:1068-72.

26. Mitsiades CS, Hayden PJ, Anderson KC, Richardson PG. From the bench to the bedside: emerging new treatments in multiple myeloma. *Best Pract Res* 2007;20:797-816.

27. Piva R, Ruggeri B, Williams M, et al. CEP-18770: a novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood* 2008;111:2765-75.

28. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, et al. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:879-95.

29. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3281-90.

30. Siapnes C, Doskeland AP, Hatfield K, et al. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2007;136:814-28.

31. Arendt CS, Hochstrasser M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7156-61.

32. Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998;92:367-80.

33. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.

34. Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ. The ultimate nanoscale minicore: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1562-78.

35. Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:333-8.

36. Williamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ, et al. Comparison of biochemical and biological effects of MLN58 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3052-61.

37. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 2000;46:673-83.

38. Elliott PJ, Soucy TA, Pien CS, Adams J, Lightcap ES. Assays for proteasome inhibition. *Methods Mol Med* 2003;85:163-72.

39. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7071-5.

40. Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REG-1 proteasome pathway. *Mol Cell* 2007;26:831-42.

41. Tambyrajah WS, Bowler LD, Medina-Palazon C, Sinclair AJ. Cell cycle-dependent caspase-like activity that cleaves p27(KIP1) is the p41 subunit of the 20S proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2007;466:186-93.

42. Toulou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* 2001;20:2367-75.

58

43. Ang XL, Harper JW. Interwoven ubiquitination oscillators and control of cell cycle transitions. *Sci STKE* 2004;2004:pe31.

44. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-7.

45. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9946-51.

46. Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:9695-704.

47. Kraus M, Malenke E, Gogel J, et al. Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1940-8.

48. Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2200-5.

49. Meister S, Schubert U, Neubert K, et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 2007;67:1783-92.

50. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 2006;107:4907-16.

51. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* 1997;272:13731-7.

52. Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 1999;7:321-35.

53. Jiang HY, Wak SA, McGrath BC, et al. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 2004;24:1365-77.



Correction

Correction: Evaluation of the Proteasome Inhibitor MLN9708 in Preclinical Models of Human Cancer

In this article (Cancer Res 2010;70:1970–80), which was published in the March 1, 2010 issue of *Cancer Research* (1), Paul Hales (Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Massachusetts) should have been included as the ninth author. The online article has been changed to reflect this correction and no longer matches the print.

Reference

1. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, Yang Y, Hales P, Bruzzese F, Liu J, Blank J, Garcia K, Tsu C, Dick L, Fleming P, Yu L, Manfredi M, Rolfe M, Bolen J. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res* 2010;70:1970–80.

Published OnlineFirst 04/27/2010.
©2010 American Association for Cancer Research.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0973

Correction

**Correction: Online Publication Dates for
Cancer Research April 15, 2010 Articles**

The following articles in the April 15, 2010 issue of *Cancer Research* were published with an online publication date of April 6, 2010 listed, but were actually published online on April 13, 2010:

Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellices LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresch D, Ginsberg M, Varner JA. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res* 2010;70:3042–51. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3761.

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010;70:3052–61. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690.

Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A. Somatic hypermethylation of *MSH2* is a frequent event in Lynch syndrome colorectal cancers. *Cancer Res* 2010;70:3098–108. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3290.

He X, Ota T, Liu P, Su C, Chien J, Shridhar V. Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3109–18. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3557.

Fiorentino M, Judson G, Penney K, Flavin R, Stark J, Fiore C, Fall K, Martin N, Ma J, Sinnott J, Giovannucci E, Stampfer M, Sesso HD, Kantoff PW, Finn S, Loda M, Mucci L. Immunohistochemical expression of BRCA1 and lethal prostate cancer. *Cancer Res* 2010;70:3136–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4100.

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanasi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Oncogenic role of *miR-483-3p* at the *IGF2/483* locus. *Cancer Res* 2010;70:3140–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4456.

Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG II, Huang Q, Gelovani JG, Li C. Tumor site-specific silencing of *NF- κ B p65* by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection. *Cancer Res* 2010;70:3177–88. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3379.

Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Harvey CT, Lafortune MC, Myrthue A, Garzotto M, Nelson PS, Beer TM, Qian DZ. ID1 enhances docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells through inhibition of p21. *Cancer Res* 2010;70:3239–48. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3186.

Yoo BK, Chen D, Su Z-z, Gredler R, Yoo J, Shah K, Fisher PB, Sarkar D. Molecular mechanism of chemoresistance by astrocyte elevated gene-1. *Cancer Res* 2010;70:3249–58. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4009.

Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, Fan D, Krajewski S, Chiang GG, Mills GB, Arbeit JM. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res* 2010;70:3287–98. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3467.

Correction

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mierköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 2010;70:3299-308. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.

Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung H-J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. Aberrant activation of the androgen receptor by NF- κ B2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3309-19. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3703.

Acu ID, Liu T, Suino-Powell K, Mooney SM, D'Assoro AB, Rowland N, Muotri AR, Correa RG, Niu Y, Kumar R, Salisbury JL. Coordination of centrosome homeostasis and DNA repair is intact in MCF-7 and disrupted in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3320-8. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3800.

McFarlane C, Kelvin AA, de la Vega M, Govender U, Scott CJ, Burrows JF, Johnston JA. The deubiquitinating enzyme USP17 is highly expressed in tumor biopsies, is cell cycle regulated, and is required for G₁-S progression. *Cancer Res* 2010;70:3329-39. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4152.

Dudka AA, Sweet SMM, Heath JK. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res* 2010;70:3391-401. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3033.

Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The effect of CXCL12 processing on CD34⁺ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res* 2010;70:3402-10. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3977.

Published OnlineFirst 05/11/2010.
©2010 American Association for Cancer Research.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1347

Cancer Research

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, et al.

Cancer Res 2010;70:1970-1980. Publicado en línea primero. Febrero 16 de 2010.

Versión actualizada: Acceda a la versión más reciente de este artículo en:
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2766

Material complementario: Acceda al material suplementario más reciente en:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/02/15/0008-5472.CAN-09-2766.DC1.html>

Artículos citados: Este artículo cita 53 artículos, a 28 de los cuales usted puede acceder gratis en:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#ref-list-1>

Artículos que citan: Este artículo ha sido citado por 17 artículos de HighWire. Acceda a los artículos en
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/5/1970.full.html#related-urls>

Alertas de E-mail: Regístrese para recibir alertas de E-mail gratuitas relacionadas con este artículo o revista

Reimpresiones y suscripciones: Para ordenar reimpresiones de este artículo o para suscribirse a la revista, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de pubs@aacr.org.

Permisos: Para solicitar permiso para re utilizar todo o algunas partes de este artículo, contacte el Departamento de Publicaciones de la AACR a través de permissions@aacr.org.

Terapéutica, metas y biología química.

Evaluación del inhibidor de proteasoma MLN9708 en Modelos Preclínicos de cáncer humano

Erik Kupperman, Edmund C. Lee, Yueying Cao, Bret Bannerman, Michael Fitzgerald, Allison Berger, Jie Yu, Yu Yang, Paul Hales, Frank Bruzzese, Jane Liu, Jonathan Blank, Khristofer Garcia, Christopher Tsu, Larry Dick, Paul Fleming, Li Yu, Mark Manfredi, Mark Rolfe, y Joe Bolen.

Resumen

La proteasoma fue validada como un blanco de la oncología luego del éxito clínico de VELCADE (bortezomib) para inyección para el tratamiento de mieloma múltiple y linfoma de células de manto recurrente. En consecuencia, diversos grupos están detrás del desarrollo de inhibidores de proteasoma de moléculas pequeñas adicionales tanto para indicaciones hematológicas como de tumores sólidos. En el presente artículo describimos el MLN9708, un inhibidor de proteasoma selectivo, biodisponible oralmente, de segunda generación que se encuentra en la fase I de desarrollo clínico. MLN9708 tiene una vida media de disociación de proteasoma más corta, así como farmacocinética, farmacodinámica y actividad antitumor mejorada en comparación con el bortezomib. MLN9708 tiene una mayor distribución de volumen de sangre en estado estable, y los análisis de la inhibición de la proteasoma 20S, así como los marcadores de la respuesta de proteína desplegada confirmaron que MLN9708 tiene mayores efectos farmacodinámicos en los tejidos a comparación con el bortezomib. MLN9708 mostró actividad tanto en tumores sólidos como en modelos de xenoinjertos hematológicos, y encontramos una correlación entre mayores respuestas farmacodinámicas y actividad antitumor mejorada. Por otro lado, la actividad antitumor fue evidenciada a través de múltiples rutas de dosificación, incluyendo sonda oral. En conjunto, esta información soporta el desarrollo clínico de MLN9708 tanto para indicaciones hematológicas y de tumores sólidos. *Cancer Res*; 70(5); 1970-80. ©2010 AACR.