



No. 07-062278- -00000-0000

Fecha: 2007-06-20 16:57:03 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

145

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ◆ Descripción de la invención [X] 32
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X] 114
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado I []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

6 JUN. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-062278- -00000-0000

Fecha: 2007-06-20 16:57:03 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **DANA FARBER CANCER INSTITUTE**

Dirección: Office of Patent Counsel, 44 Binney Street, Boston, MA 02115, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Boston, Estado de Massachusetts, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **ANDERSON, Kenneth, C. y CHAUHAN, Dharminder.**

Dirección: 264 Weston Road, Wellesley, Massachusetts 02481 y 8 Wedgewood Road, Natick, Massachusetts 01760.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/043668

Fecha: 02/12/05

Publicación Internacional No. WO 2006/060676 A1

Fecha: 08/06/06

⑥

Título (54)

"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS"

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 31/397

// A61K 31/337 // A61P 35/00

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

03/12/04

60/633,161

⑨

Comprobante de Pago No. 07 - 45.771

Fecha: 06/06/07

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión de los inventores
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción y opinión escrita con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquéen T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-062278- -00000-0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha: 2007-06-20 16:57:03 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 146

NIT : 800176067-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 45,771
FECHA : JUNIO 6 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55092733	06/06/2007	7,588,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

N: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

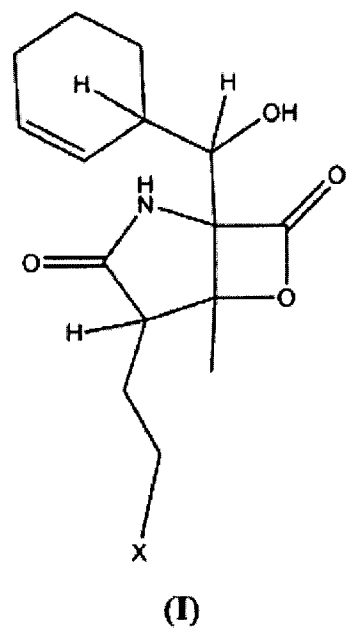
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 31/397	
(22) Fecha de solicitud: 20-06-07		(71) Solicitante(s) DANA FARBER CANCER INSTITUTE	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/633,161	(32) Fecha 03-12-04	(33) País US
		(72) Inventor(es) ANDERSON, Kenneth, C. y CHAUHAN, Dharminder	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 03-07-07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 08-06-06	
Fecha de presentación de la solicitud: 02-12-05		No. publicación: WO 2006/060676 A1	
No. de solicitud PCT/US2005/043668			
(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 25.-

Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende:
un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo:



en donde X es seleccionado del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo o yodo; y
por lo menos un agente quimioterapéutico adicional.

4.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente NEREUS.109VP	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US2005/043668	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 02/12/2005	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 03/12/2004
Solicitante NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 5 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo sobre la base de:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, el cual es el idioma de la traducción presentada para la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b))

b. ☐ Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, ver Recuadro No. I.

2. ☒ **Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse** (Ver Recuadro II).

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III).

4. Respecto al **título**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

5. Respecto al **resumen**,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los **dibujos** que se publicará con el resumen es la Figura No. 10F

☒ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☐ Ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

5 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/043668

A. CLASIFICACION DE MATERIA

INV. A61K31/397 A61P35/00

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

A61K A61P

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 2004/138196 A1 (FENICAL WILLIAM ET AL) 15 de Julio de 2004 (2004-07-15) página 4, columna izquierda, paragrafo 2 - columna derecha, paragrafo 1	12-30
Y	página 3, columna derecha, paragrafo 2-4 página 4, columna derecha, paragrafo 4 - página 5, columna izquierda, paragrafo 1 ----- -/--	1-37

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

11 de Abril de 2006

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

12/05/2006

Nombre y dirección del correo de ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL-2280 HV Rijswijk

Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Young, A

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/043668

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	FELING ROBERT H ET AL: "Salinosporamida A: un inhibidor del proteasoma altamente citotóxico, a partir de una fuente microbiana, una bacteria marina del nuevo género salinospira" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 42, no. 3, 20 de Enero de 2003 (2003-01-20), páginas 355-357, XP002304842 ISSN: 1433-7851 página 356, columna derecha, paragrafo 3 -----	1-37
Y	ELLIOTT P J ET AL: "El proteasoma: un nuevo blanco para la terapia con fármacos" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 116, no. 5, Noviembre 2001 (2001-11), páginas 637-646, XP008007324 ISSN: 0002-9173 todo el documento -----	1-37
P, X	WO 2005/002572 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC; PALLADINO, MICHAEL; NEUTEBOOM, SASKIA, TH) 13 de Enero de 2005 (2005-01-13) página 64, líneas 4-6 ejemplos 18, 20, 34, 41, 42 reivindicaciones 1-24 -----	1-37
P, X	WILLIAMS PHILIP G ET AL: "Novedosas salinosporamidas citotóxicas del actinomiceto marino Salinispota tropica" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 70, no. 16, Agosto 2005 (2005-08), páginas 6196-6203, XP002376431 ISSN: 0022-3263 página 6197, columna izquierda, paragrafo 1 -----	1-37
P, X	MACHERLAV ENKATR ET AL: "Estudios de la relación estructura - actividad de salinosporamida a (NPI-0052), un novedoso inhibidor del proteasoma derivado del mar" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 11, Junio 2005 (2005-06), páginas 3684-3687, XP002376432 ISSN: 0022-2623 página 3684, columna izquierda -----	1-37

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US2005/043668**Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 1-24 y 31-37 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/la composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

- Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante y, donde aplique, el pago de derechos de protesta.
- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante pero el derecho de la protesta del solicitante no se pagó dentro del límite de tiempo especificado en la invitación.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/043668

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
US 2004138196	A1	15-07-2004	US	2004259856 A1	23-12-2004
WO 2005002572	A	13-01-2005	AU	2004253478 A1	13-01-2005
			CA	2532066 A1	13-01-2005
			EP	1638552 A2	29-03-2006

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference NEREUS.109VP	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/043668	International filing date (day/month/year) 02/12/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 03/12/2004
Applicant NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 10f
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/043668A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/397 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/138196 A1 (FENICAL WILLIAM ET AL) 15 July 2004 (2004-07-15) page 4, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1	12-30
Y	page 3, right-hand column, paragraph 2-4 page 4, right-hand column, paragraph 4 - page 5, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2006

Date of mailing of the international search report

12/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Young, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/043668

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FELING ROBERT H ET AL: "Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospira" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, WILEY VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 42, no. 3, 20 January 2003 (2003-01-20), pages 355-357, XP002304842 ISSN: 1433-7851 page 356, right-hand column, paragraph 3	1-37
Y	ELLIOTT P J ET AL: "The proteasome: A new target for novel drug therapies" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 116, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 637-646, XP008007324 ISSN: 0002-9173 the whole document	1-37
P,X	WO 2005/002572 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC; PALLADINO, MICHAEL; NEUTEBOOM, SASKIA, TH) 13 January 2005 (2005-01-13) page 64, lines 4-6 examples 18,20,34,41,42 claims 1-24	1-37
P,X	WILLIAMS PHILIP G ET AL: "New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete Salinispora tropica" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 70, no. 16, August 2005 (2005-08), pages 6196-6203, XP002376431 ISSN: 0022-3263 page 6197, left-hand column, paragraph 1	1-37
P,X	MACHERLA VENKAT R ET AL: "Structure-activity relationship studies of salinosporamide a (NPI-0052), a novel marine derived proteasome inhibitor" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 11, June 2005 (2005-06), pages 3684-3687, XP002376432 ISSN: 0022-2623 page 3684, left-hand column	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/043668

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-24 and 31-37 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/043668

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004138196 A1	15-07-2004	US 2004259856 A1	23-12-2004
WO 2005002572 A	13-01-2005	AU 2004253478 A1	13-01-2005
		CA 2532066 A1	13-01-2005
		EP 1638552 A2	29-03-2006

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

8 de Junio de 2006 (08.06.2006)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT WO-2006/060676 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/397 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2005/043668

(22) Fecha de Registro Internacional: 2 de Diciembre de 2005
(02.12.2005)

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:

60/633,161 3 de Diciembre de 2004 (03.12.2004) US

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto EU): DANA FARBER CANCER INSTITUTE [US/US]; Office of Patent Counsel, 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para los EU únicamente): ANDERSON, Kenneth, C. [US/US]; 264 Weston Road, Wellesley, Massachusetts 02481 (US). CHAUHAN, Dharminder [IN/US]; 8 Wedgewood Road, Natick, Massachusetts 01760 (US).

(74) Agente: MALLON, Joseph, J.; KNOBBE MARTENS OLSON & BEAR LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine, California 92614 (US).

(81) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

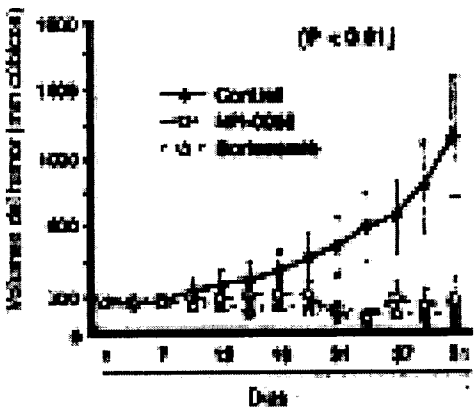
(84) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS



(57) Resumen: Se revelan en la presente composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Se incluyen composiciones y métodos que son efectivos contra células de mieloma múltiple resistentes al tratamiento convencional y de bortezomib. Además, se muestra que el tratamiento de combinación con dos inhibidores de proteosoma diferentes es sinérgico para el tratamiento de mieloma múltiple.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 June 2006 (08.06.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/060676 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 31/397 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/043668

(22) International Filing Date:
2 December 2005 (02.12.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/633,161 3 December 2004 (03.12.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): DANA FARBER CANCER INSTITUTE [US/US]; Office of Patent Counsel, 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ANDERSON, Kenneth, C. [US/US]; 264 Weston Road, Wellesley, Massachusetts 02481 (US). CHAUHAN, Dharminder [IN/US]; 8 Wedgwood Road, Natick, Massachusetts 01760 (US).

(74) Agent: MALLON, Joseph, J.; KNOBBE MARTENS OLSON & BEAR LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine, California 92614 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

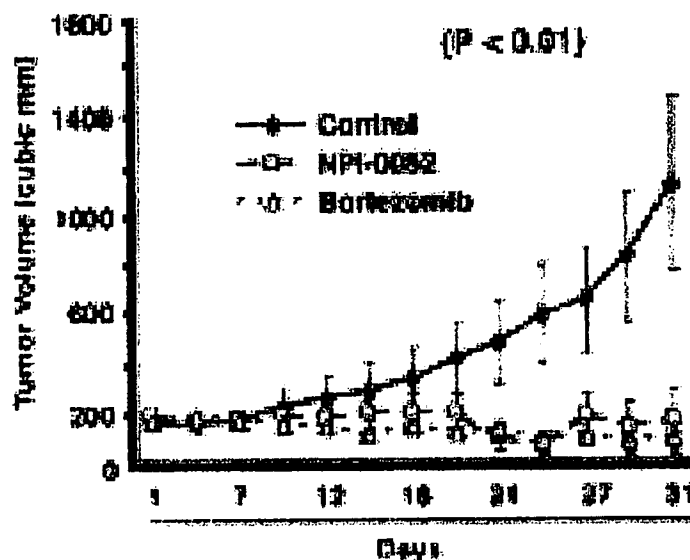
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING NEOPLASTIC DISEASES



(57) Abstract: Disclosed herein are compositions and methods for treating neoplastic diseases. Included are compositions and methods that are effective against multiple myeloma cells resistant to conventional and bortezomib treatment. Furthermore, combination treatment with two different proteasome inhibitors is shown to be synergistic for treating multiple myeloma.

WO 2006/060676 A1

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

ver forma PCT/ISA/220

PCT

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)

Fecha de envío por correo
(día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda página)

Registro de referencia del solicitante
o agente
ver forma PCT/ISA/220

PARA FUTURAS ACCIONES
Ver el párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.

Fecha de registro internacional
(día/mes/año)
02.12.2005

Fecha de prioridad
(día/mes/año)
03.12.2004

PCT/US2005/043668

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV. A61K31/397 A61P35/00

Solicitante
NEREUS PHARMACEUTICALS, I NC.

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Casilla No. I Bases del Reporte
- ☐ Casilla No. II Prioridad
- ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial.
- ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación.
- ☒ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2. ACCIONES FUTURAS

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220

Nombre y dirección de correo de ISA: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49- 89) 2399- 4465	Fecha de la terminación de esta opinión ver forma PCT/ISA/220	Funcionario Autorizado Young, A Teléfono No. +49 89 2399-7811
---	---	---

Forma (PCT/ISA/237) (Portada) (Abril de 2005)

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida con base en:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó
- ☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, la cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☐ un listado de secuencia
- ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☐ en formato escrito
- ☐ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
- ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
- ☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1 - 24 y 31-37

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
 - ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles.

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 43bis.1 (a) (i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones	1-11, 31-37
	No: Reivindicaciones	12-30
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	1-11, 37
	No: Reivindicaciones	12-36
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	25-30
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VI Algunos documentos citados

1. Algunos documentos publicados (Reglas 43bis. 1 y 70.10)
y/o
2. Escritos no revelados (Reglas 43bis.1 y 70.9)

ver forma 210

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (HOJA
SEPARADA)

Solicitud Internacional No.
PCT/US2005/043668

Re Item III

1. Las reivindicaciones 1-24 y 31-37 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

2. Los documentos considerados en el procesamiento presente están numerados consecutivamente D1-D6; esta numeración resulta de las citas D1-D6 encontradas en el Reporte de Búsqueda Internacional (ISR) de la solicitud PCT correspondiente. Se adherirá al resto del procedimiento. El texto(s) citado para cada citación será considerado a menos que se especifique lo contrario.
3. La solicitud se refiere a un método para tratar una enfermedad neoplástica con un compuesto de fórmula (I), preferiblemente salinosporamida A, donde la enfermedad neoplástica es susceptible a resistencia a al menos otro agente quimioterapéutico. Además, se reivindica un método para tratar una enfermedad neoplástica con un compuesto de fórmula (I) en combinación con al menos un agente quimioterapéutico adicional y una combinación farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) en combinación con al menos un agente quimioterapéutico adicional. Finalmente, se reivindica un método para tratar una enfermedad neoplástica que comprende una combinación sinérgica de al menos dos inhibidores de proteosoma.
4. Novedad, Artículo 33(2) PCT
- 4.1 Se considera que a la materia objeto de las reivindicaciones 12-30 le falta novedad sobre la revelación de D1 dentro del significado del Artículo 33(2) PCT por las siguientes razones:

D1 revela salinosporamida A, que está comprendida por la fórmula (I), para el tratamiento de enfermedades neoplásticas, v.g. cáncer de pulmón o cáncer de próstata de células no pequeñas. También se revela la combinación de quimioterapia de compuestos de salinosporamida con otros agentes neoplásticos, v.g. doxorubicin, tamoxifen.

- 4.2 La materia objeto de las reivindicaciones 1-11 y 31-37 es novedosa sobre la técnica anterior citada dentro del significado del Artículo 33(2) PCT.

Ninguna de las referencias citadas revela un método para tratar una enfermedad neoplástica con un compuesto de fórmula (I), preferiblemente salinosporamida A, donde la enfermedad neoplástica es susceptible a resistencia a al menos otro agente quimoterapéutico.

Tampoco se encuentra un método para tratar una enfermedad neoplástica que comprende una combinación sinérgica de al menos dos inhibidores de proteosoma en la técnica anterior citada.

5. Paso inventivo, Artículo 33(3) PCT

5.1 El objeto implícito en la presente solicitud es la provisión de un método para tratar una enfermedad neoplástica, donde la enfermedad neoplástica es susceptible a resistencia a al menos otro agente quimoterapéutico.

La solución propuesta es el uso de un compuesto de fórmula (I), preferiblemente salinosporamida A.

El uso de salinosporamida A para el tratamiento de enfermedades neoplásticas es conocido de la técnica anterior citada.

El documento D2 revela la citotoxicidad in vitro de la salinosporamida A en diferentes líneas de células de cáncer.

Sin embargo, el uso de una salinosporamida para el tratamiento de una enfermedad neoplástica, donde la enfermedad neoplástica es susceptible a resistencia a al menos otro agente quimoterapéutico no es conocido y tampoco se sugiere en la técnica anterior citada.

Por lo tanto, puede reconocerse un paso inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 1-11 dentro del significado del Artículo 33(3) PCT.

5.2 La materia objeto de las reivindicaciones 31-37 se relaciona con un método para tratar una enfermedad neoplástica que comprende una combinación sinérgica de al menos dos inhibidores de proteosoma.

Por lo tanto, el objeto implícito en estas reivindicaciones es la provisión de un método para tratar una enfermedad neoplástica.

La solución propuesta es una combinación sinérgica de al menos dos inhibidores de proteosoma.

La solicitud muestra un efecto sinérgico para la combinación de salinosporamida A y bortezomib.

Sin embargo, no puede generalizarse un efecto sinérgico a todas las posibles combinaciones de al menos dos inhibidores de proteosoma.

En conclusión, se reconoce un paso inventivo para la materia objeto de la reivindicación 37 dentro del significado del Artículo 33(3) PCT.

La materia objeto de las reivindicaciones 31-36 no comprende un paso inventivo bajo el Artículo 33(3) PCT.

6. Ciertos documentos publicados (Regla 70.10)

D4: WO 2005/002572 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC; PALLADINO, MICHAEL; NEUTEBOOM, SASKIA, TH) 13 de enero de 2005 (2005-01-13)

D5: WILLIAMS PHILIP G ET AL: "New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinospora tropica*" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 70, no. 16, agosto de 2005 (2005-08), páginas 6196-6203, XP002376431 ISSN: 0022-3263

D6: MACHERLA VENKAT R ET AL: "Structure-activity relationship studies of salinosporamida a (NPI-0052) a novel marine derived proteasome inhibitor" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 11, junio de 2005 (2005-06), páginas 3684-3687, XP002376432 ISSN: 0022-2623

Los documentos citados anteriormente podrían ser relevantes entrando en la fase europea regional.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/043668

International filing date (day/month/year)
02.12.2005

Priority date (day/month/year)
03.12.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K31/397 A61P35/00

Applicant
NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Young, A

Telephone No. +49 89 2399-7811



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/043668

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2005/043668

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 1-24 and 31-37

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. with respect to Industrial Applicability relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13 *ter*.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/043668

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-11, 31-37
	No: Claims	12-30
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-11, 37
	No: Claims	12-36
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	25-30
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

- 1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)
and / or
- 2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)
see form 210

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2005/043668

Re Item III:

1. Claims 1-24 and 31-37 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V:

2. The documents considered in the present processing are consecutively numbered D1-D6; this numbering results from the citations D1-D6 found in the International Search Report (ISR) of the corresponding PCT application. It will be adhered to in the rest of the procedure. The cited passage(s) for each citation will be considered unless otherwise specified.
3. The application refers to a method of treating a neoplastic disease with a compound of formula (I), preferably salinosporamide A, wherein the neoplastic disease is susceptible to resistance to at least one other chemotherapeutic agent. Further, a method of treating a neoplastic disease with a compound of formula (I) in combination with at least one additional chemotherapeutic agent and a pharmaceutical composition comprising a compound of formula (I) in combination with at least one additional chemotherapeutic agent is claimed. Finally, a method of treating a neoplastic disease comprising a synergistic combination of at least two proteasome inhibitors is claimed.
4. Novelty, Article 33(2) PCT
 - 4.1 The subject-matter of claims 12-30 is considered to lack novelty over the disclosure of D1 within the meaning of Article 33(2) PCT for the following reasons:

D1 discloses salinosporamide A, which is encompassed by formula (I), for the treatment of neoplastic diseases, e.g. non-small-cell lung cancer or prostate cancer. Also the combination chemotherapy of salinosporamide compounds with other neoplastic agents, e.g. doxorubicin, tamoxifen is disclosed.
 - 4.2. The subject-matter of claims 1-11 and 31-37 is novel over the cited prior art within the meaning of Article 33(2) PCT.

None of the cited references discloses a method of treating a neoplastic disease with a compound of formula (I), preferably salinosporamide A, wherein the neoplastic disease is susceptible to resistance to at least one other chemotherapeutic agent.

Also a method of treating a neoplastic disease comprising a synergistic combination of at least two proteosome inhibitors is not found in the cited prior art.

5. Inventive step, Article 33(3) PCT

- 5.1 The object underlying the present application is the provision of a method of treating a neoplastic disease, wherein the neoplastic disease is susceptible to resistance to at least one other chemotherapeutic agent.

The posed solution is the use of a compound of formula (I), preferably salinosporamide A.

The use of salinosporamide A for the treatment of neoplastic diseases is known from the cited prior art.

Document D2 discloses the in vitro cytotoxicity of salinosporamide A in different cancer cell lines.

However, the use for a salinosporamide for the treatment of a neoplastic disease, wherein the neoplastic disease is susceptible to resistance to at least one other chemotherapeutic agent is not known and also not suggested in the cited prior art.

Thus, an inventive step can be acknowledged for the subject-matter of claims 1-11 within the meaning of Article 33(3) PCT.

- 5.2 The subject-matter of claims 31-37 relates to a method of treating a neoplastic disease comprising a synergistic combination of at least two proteosome inhibitors.

Thus, the object underlying these claims is the provision of a method of treating a neoplastic disease.

The posed solution is a synergistic combination of at least two proteosome

inhibitors.

The application shows a synergistic effect for the combination of salinosporamide A and bortezomib.

However, a synergistic effect cannot be generalized to all possible combinations of at least two proteasome inhibitors.

In conclusion, an inventive step is acknowledged for the subject-matter of claim 37 within the meaning of Article 33(3) PCT.

The subject-matter of claims 31-36 does not involve an inventive step under Article 33(3) PCT.

6. Certain published documents (Rule 70.10)

D4: WO 2005/002572 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC; PALLADINO, MICHAEL; NEUTEBOOM, SASKIA, TH) 13 January 2005 (2005-01-13)

D5: WILLIAMS PHILIP G ET AL: "New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 70, no. 16, August 2005 (2005-08), pages 6196-6203, XP002376431 ISSN: 0022-3263

D6: MACHERLA VENKAT R ET AL: "Structure-activity relationship studies of salinosporamide a (NPI-0052), a novel marine derived proteasome inhibitor" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 11, June 2005 (2005-06), pages 3684-3687, XP002376432 ISSN: 0022-2623

The above cited documents could become relevant by entering the regional European phase.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEOPLÁSICAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

Se revelan en la presente composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Se incluyen composiciones y métodos que son efectivos contra células de mieloma múltiple resistentes al tratamiento convencional y de
10 bortezomib. Además, se muestra que el tratamiento de combinación con dos inhibidores de proteosoma diferentes es sinérgico para el tratamiento de mieloma múltiple.

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
NEOPLÁSICAS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención es concerniente con los campos
5 de química y medicina. Más en particular, la presente invención
es concerniente con el tratamiento de enfermedades neoplásicas,
tales como cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer es una causa principal de muerte en los
Estados Unidos de América. A pesar de esfuerzos significativos
para encontrar nuevos procedimientos para tratamiento de
cáncer, las opciones de tratamiento primario siguen siendo
cirugía, quimioterapia y terapia de radiación, ya sea solas o
15 en combinación. La cirugía y terapia de radiación, sin embargo,
son en general útiles solamente para tipos definidos
lejanamente de cáncer y son de uso limitado para tratamiento de
pacientes con enfermedad diseminada. La quimioterapia es el
método que es en general útil en el tratamiento de pacientes
20 con cáncer metastático o cánceres difusos tales como leucemias.
Aunque la quimioterapia puede proporcionar un beneficio
terapéutico, frecuentemente falla en dar como resultado cura de
la enfermedad debido a que las células de cáncer del paciente
se vuelven resistentes al agente quimioterapéutico.

25 Por consiguiente, existe la necesidad de

quimioterapéuticos adicionales para tratar cáncer. Se hace un esfuerzo continuo por investigadores individuales, academias y compañías para identificar nuevos agentes quimioterapéuticos y antimicrobianos potencialmente útiles.

5 El desarrollo exitoso de la terapia de Bortezomib/PS-341 para el tratamiento de mieloma múltiple (MM) de recaída/refractario ha establecido la inhibición de proteosoma como una estrategia terapéutica efectiva. El dipéptido análogo de ácido borónico Bortezomib es un inhibidor de proteosoma
10 potente, altamente selectivo y reversible, que apunta al complejo 26S de proteosoma e inhibe su función. La 26S proteosoma es una proteasa multicatalítica trifosfato de adenosina (ATP)-dependiente que modera la degradación de la proteína intracelular. La degradación proteosomal de las
15 proteínas mal plegadas o dañadas procede mediante reconocimiento de las proteínas poliubiquitinadas por la subunidad reguladora 19S de la 26S proteasa, e hidrólisis subsecuente a polipéptidos pequeños. El Bortezomib inhibe principalmente el quimiotríptico, sin alterar la actividad de
20 proteosoma tríptica o semejante a caspasa. Además de inhibir NF-kB, el Bortezomib tiene efectos pleiotrópicos sobre la biología de MM mediante apuntamiento de: (1) proteínas reguladoras del ciclo celular; (2) ruta UPR vía modulación de actividad transcripcional de la proteína de enlace del factor
25 X-caja de diferenciación de célula de plasma (XBP-1); (3)

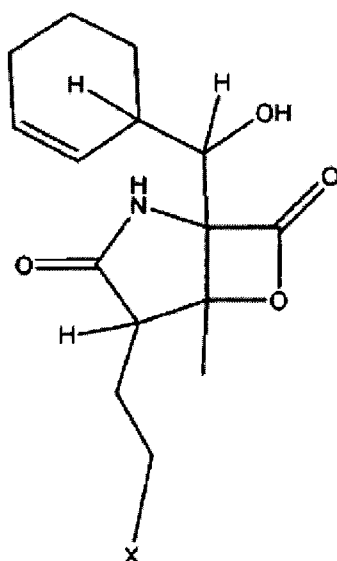
apóptosis p53-moderada/MDM2; (4) mecanismos de reparación de ADN; (5) rutas de respuesta de esfuerzo clásicas vía cascadas de muerte celular tanto intrínsecas (moderadas por caspasa-9) y extrínsecas (moderadas por caspasa-8). Específicamente, el Bortezomib activa JNK, que dispara la señalización apoptótica mitocondrial: liberación de citocromo-c (cito-c) y segundo activador mitocondrial de caspasas (Smac) de mitocondria a citosol, seguida por activación de caspasa-9 y caspasa-3. Sin embargo, se ha observado tanto resistencia intrínseca como resistencia adquirida y no hay terapias que superen la resistencia de Bortezomib en el presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un paciente inflingido con la enfermedad neoplásica un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo:

20

25



(I)

en donde X es seleccionado del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo o yodo y en donde la enfermedad neoplásica es susceptible a resistencia a por lo menos one otro agente quimioterapéutico.

Otro aspecto de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un paciente inflingido con la enfermedad neoplásica un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo, en donde X es seleccionado del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo o yodo, en combinación con por lo menos un agente quimioterapéutico adicional.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo, en donde X es seleccionado del grupo que consiste de

flúor, cloro, bromo o yodo, y por lo menos un agente quimioterapéutico adicional.

Otro aspecto de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, que comprende
5 administrar a un paciente inflingido con la enfermedad neoplásica una combinación sinérgica de por lo menos dos inhibidores de proteosoma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La figura 1 ilustra la inhibición de actividades de proteosoma semejante a quimiotripsina, semejante a caspasa y semejante a tripsina en proteosoma 20S derivada de eritrocitos humanos mediante NPI-0052.

La figura 2 ilustra la actividad semejante a
15 quimotripsina in vivo de NPI-0052 en ratones.

La figura 3 ilustra la autoradiografía obtenida después de tratamiento de células de mieloma múltiple (MM) MM.1S con NPI-0052 (7 nM) e incubación de extractos de proteína con AdaY(¹²⁵I)Ahx₃L₃VS a 37°C.

20 La figura 4 ilustra pruebas inmunológicas obtenidas después del tratamiento de células MM.1S con NPI-0052 y luego incubación con Dansil-Ahx₃L₃VS.

La figura 5A ilustra la viabilidad celular de varias líneas de célula de mieloma múltiple tratadas con las dosis
25 indicadas de NPI-0052 durante 24 horas.

La figura 5B ilustra análisis de fragmentación de ADN de apóptosis después de tratamiento con NPI-0052 de células MM obtenidas de pacientes.

La figura 6 ilustra análisis de fragmentación de ADN de apóptosis después de tratamiento con NPI-0052 de células estromales de médula ósea obtenida de pacientes.

La figura 7 ilustra el análisis de MTT de viabilidad de célula de MM.1S después de tratamiento con NPI-0052 o Dex en presencia o ausencia de IL-6 o IGF-I.

La figura 8 ilustra el efecto de NPI-0052 sobre la migración inducida por VEGF de células MM.1S.

La figura 9 ilustra el efecto de NPI-0052 sobre la viabilidad de MM.1S que sobreexpresa Bcl2.

Las figuras 10A y 10B ilustran el efecto de NPI-0052 sobre el crecimiento de tumor cuando es administrado oralmente a ratones.

La figura 10C ilustra el efecto de NPI-0052 sobre la sobrevivencia cuando es administrado oralmente a ratones.

La figura 10D ilustra el efecto de NPI-0052 sobre el peso corporal cuando es administrado oralmente a ratones.

La figura 10E ilustra secciones de tejido de sitios de inoculación de ratones tratados con NPI-0052 y ratones tratados con control.

La figura 10F compara el efecto de NPI-0052 y Bortezomib sobre el crecimiento del tumor cuando es

administrado i.v. a ratones.

La figura 10G compara el efecto de NPI-0052 y Bortezomib sobre la sobrevivencia cuando es administrado i.v. a ratones.

5 La figura 11A ilustra el efecto de NPI-0052 sobre el potencial de membrana mitocondrial en células MM.1S incubadas con CMXRos.

La figura 11B ilustra el efecto de NPI-0052 sobre la generación de superóxido en células MM.1S teñidas con tinte
10 permeable a membrana de dihidroetidio (HE).

La figura 11C ilustra pruebas inmunológicas de fracciones de proteína mitocondriales y citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052.

La figura 11D ilustra pruebas inmunológicas de
15 proteínas citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052 y analizadas con Abs de anti-caspasa-9.

La figura 11E ilustra pruebas inmunológicas de proteínas citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052 y analizadas con Abs de anti-caspasa-8.

20 La figura 11F ilustra pruebas inmunológicas de células MM.1S o células MM.1R MM tratadas con NPI-0052 y analizadas en cuanto a apoptosis tanto mediante análisis de PARP y análisis de escisión de caspasa-3.

La figura 12A ilustra la viabilidad de células MM.1S
25 después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib en presencia o

ausencia de inhibidor de caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9.

La figura 12B ilustra la viabilidad de célula MM.1S para células transfectadas con vector solo, DN-caspasa-8, y DN-caspasa-9 después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

5 La figura 12C ilustra pruebas inmunológicas de extractos citosólicos de células MM.1S transfectadas con DN-caspasa-8 y DN-caspasa-9 tratadas con dexametasona o MoAb anti-Fas.

La figura 12D ilustra la viabilidad de célula MM.1S para el vector o células transfectadas con DN-FADD después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

La figura 12E ilustra pruebas inmunológicas de extractos de proteína mitocondriales de células MM.1S MM tratadas con la concentración indicada ya sea de NPI-0052 o Bortezomib y analizadas con anti-Bax o Abs anti-Hsp60.

La figura 12F ilustra la viabilidad de célula de células de fibroblastos embriónicos de ratón (MEF) ya sea con Bax tipo silvestre o cancelado (expulsado) tratadas con las concentraciones indicadas de NPI-0052 o Bortezomib.

20 La figura 13 ilustra la viabilidad de linfocitos normales de cinco donadores saludables tratados con las concentraciones indicadas de NPI-0052 o Bortezomib.

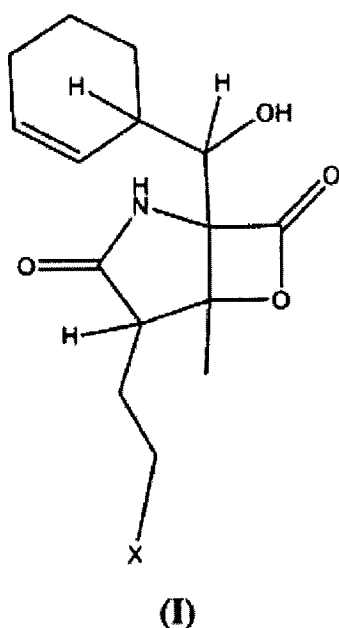
La figura 14A ilustra la viabilidad de célula MM.1S para células transfectadas con vector solo o Bcl-2 después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

La figura 14B ilustra pruebas inmunológicas de extractos citosólicos de células MM.1S transfectadas con vector o Bcl-2-transfectadas tratadas con NPI-0052 o Bortezomib.

La figura 15 ilustra la viabilidad celular de células MM.1S y células MM.1R MM tratadas con la concentración indicada de NPI-0052, Bortezomib o NPI-0052 + Bortezomib.

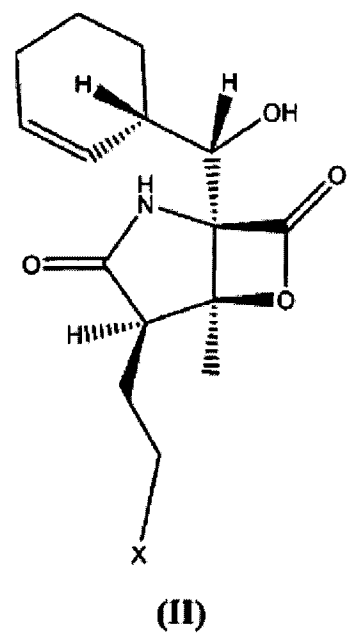
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

En una modalidad, se proporciona un compuesto de acuerdo con formula (1) para uso como se describe en la presente:



en donde X puede ser flúor, cloro, bromo o yodo. En una modalidad, x es cloro. En una modalidad, el compuesto de fórmula (I) tiene estereoquímica de acuerdo con la formula (II):

5



10

El compuesto de fórmula (II) en donde X=Cl es también denominado en la presente como NPI-0052. Los compuestos de acuerdo con las fórmulas (I) o (II) pueden ser derivados de la fermentación de Salinospora, un actinomiceto gram-positivo marino.

En algunas modalidades, profármacos, metabolitos, estereoisómeros and sales aceptables farmacéuticamente de los compuestos revelados en la presente son proporcionados para uso como se describe en la presente.

20

A "profármaco" se refiere a un agente que es convertido al fármaco original in vivo. Los profármacos son frecuentemente útiles debido a que, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco original. pueden por ejemplo, estar biodisponibles mediante administración oral mientras que el original no. El profármaco

25

puede también tener solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas con respecto al fármaco original. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto que es administrado como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular, en donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad, pero que luego es hidrolizado metabólicamente al ácido carboxílico, la entidad activa una vez al interior de la célula en donde la solubilidad en agua es benéfica. Un ejemplo adicional de un profármaco podría ser un péptido corto (poliaminoácido) enlazado a un grupo ácido en donde el péptido es metabolizado para revelar la porción activa. Procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados de profármaco apropiados son descritos, por ejemplo en *Design de Prodrugs*, (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985), que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad.

El término "éster de pro-fármaco" se refiere a derivados de los compuestos revelados en la presente formados mediante la adición de cualquiera de varios grupos formadores de éster que son hidrolizados bajo condiciones fisiológicas. Ejemplos de grupos éster de pro-fármaco incluyen pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo, también como otros de tales grupos conocidos en el arte, en los que se incluyen un grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo. Otros ejemplos de grupos de éster de pro-

fármaco se pueden encontrar, por ejemplo en T. Higuchi and V. Stella, en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", editado por E. B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (que proporcionan ejemplos de ésteres útiles como profármacos para compuestos que contienen grupos carboxilo). Cada una de las referencias mencionadas anteriormente es incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

Metabolitos de los compuestos revelados en la presente incluyen especies activas que son producidos después de la introducción de los compuestos al medio biológico.

En donde los compuestos revelados en la presente tienen por lo menos un centro quiral, pueden existir como un racemato o como enantiómeros. Se debe notar que todos de tales isómeros y mezclas de los mismos están incluidos en el alcance de la presente invención. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos revelados en la presente pueden existir como polimorfos. Tales polimorfos están incluidos en una modalidad de la presente invención. Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua (esto es, hidratos) o solventes orgánicos comunes. Tales solvatos están incluidos en una modalidad de la presente invención.

El término "sal aceptable farmacéuticamente" se refiere a una sal de un compuesto que no provoca irritación significativa a un organismo al cual es administrada y no abroga la actividad biológica y propiedades del compuesto. En algunas modalidades, la sal es una sal de adición de ácido del compuesto. Sales farmacéuticas pueden ser obtenidas al hacer reaccionar un compuesto con ácidos inorgánicos tales como ácido hidrohálico (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y los semejantes. Sales farmacéuticas pueden también ser obtenidas al hacer reaccionar un compuesto con un ácido orgánico tal como ácidos carboxílicos o sulfónicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metansulfónico, etansulfónico, p-toluensulfónico, salicílico o naftalensulfónico. Sales farmacéuticas pueden también ser obtenidas al hacer reaccionar un compuesto con una base para formar una sal tal como una sal de amonio, una sal de metal alcalino, tal como una sal de sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, tal como una sal de calcio o magnesio, una sal de bases orgánicas tales como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, C₁-C₇ alquilamina, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina and sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y los semejantes.

Si la manufactura de formulaciones farmacéuticas

involucra el mezclado íntimo de los excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo en su forma de sal, puede entonces ser deseable usar excipientes farmacéuticos que no son básicos, esto es, ya sea excipientes ácidos o neutros.

5 En varias modalidades, los compuestos revelados en la presente pueden ser usados solos, en combinación con otros compuestos revelados en la presente o en combinación con uno o más de otros agentes activos en las áreas terapéuticas descritas en la presente.

10 El término "átomo de halógeno", como se usa en la presente, significa cualquiera de los átomos radio-estables de la columna 7 de la tabla periódica de los elementos, por ejemplo flúor, cloro, bromo o yodo, flúor y cloro son preferidos.

15 El término "éster" se refiere a una porción química de formula $-(R)_n-COOR'$, en donde R y R' son seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (enlazado por medio de un átomo del anillo) y heteroalícíclico (enlazado por medio de un
20 carbono del anillo), y en donde n es 0 ó 1.

 Una "amida" es una porción química de formula $-(R)_n-C(O)NHR'$ o $-(R)_n-NHC(O)R'$, en donde R y R' son seleccionados independientemente del grupo que consiste de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (enlazado por medio de un
25 carbono del anillo) y heteroalícíclico (enlazado por medio de

un carbono del anillo), y en donde n es 0 ó 1. Una amida puede ser una molécula de aminoácido o péptido anexada a una molécula de la presente invención, formando mediante esto un profármaco.

Cualquier cadena lateral de amina, hidroxilo o carboxilo sobre los compuestos de la presente invención puede ser esterificada o amidificada. Los procedimientos y grupos específicos a ser usados para obtener este fin son conocidos para aquellos de habilidad en el arte y pueden ser encontrados fácilmente en fuentes de referencia tales como Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Síntesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, que es incorporado en la presente en su totalidad.

Los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado" como se usa en la presente se refiere a compuestos revelados en la presente estando libre de otros compuestos disimilares con los cuales los compuestos de la invención están normalmente asociados en su estado natural, de tal manera que los compuestos de la invención comprenden por lo menos 0.5%, 1%, 5%, 10% ó 20%, y más preferiblemente por lo menos 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada.

Métodos de uso

Como se demuestra por los ejemplos presentados en la presente, el compuesto de fórmula (I) inhibe las actividades de proteasoma semejantes a quimiotripsina, semejantes a tripsina,

y semejantes a caspasa. En contraste, se ha demostrado que Bortezomib inhibe solamente la actividad de proteasoma semejante a quimiotripsina. Véase Goldberg, A. L. & Rock, K. (2002) Nat Med 8, 338-40 y Adams, J. (2004) Nat Rev Cancer 4, 349-60; ambas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Se demuestra además que los compuestos de fórmula (I) tienen un mecanismo de acción diferente que el bortezomib. Además, el compuesto de fórmula (I) induce apoptosis en varias líneas de células de mieloma múltiple en las que se incluyen, pero no limitadas a, MM.1S sensible a dexametasona, MM.1R resistentes a dexametasona, RPMI-8226, OPM2, U266 y Dox-40 resistente a doxorubicina. El compuesto de fórmula I también induce apoptosis en líneas celulares obtenidas de pacientes con mieloma múltiple humanos que tuvieron recaída después de múltiples terapias previas con dexametasona, bortezomib y talidomida. Así, el compuesto de fórmula (I) es efectivo contra células MM que son resistentes a otros agentes quimioterapéuticos, en los que se incluyen dexametasona, doxorubicina, bortezomib/PS-341 y talidomida.

Así, en una modalidad, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica que es susceptible a resistencia a por lo menos un agente quimioterapéutico, que comprende administrar a un paciente, tal como un humano, un compuesto de fórmula (I) o una sal o éster de profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo. "Resistencia a por lo

menos un agente quimioterapéutico", significa que la administración del agente quimioterapéutico al paciente no da como resultado mejora significativa de los síntomas de la enfermedad neoplásica. En algunas modalidades en donde la enfermedad neoplásica está caracterizada por un tumor, "resistencia a por lo menos un agente quimioterapéutico" significa que la administración del agente quimioterapéutico no da como resultado inhibición apreciable del crecimiento del tumor o reducción en el tamaño del tumor. "Resistencia a por lo menos un agente quimioterapéutico" puede también significar que cuando el agente es expuesto a células de tumor resistentes, no se induce apoptosis apreciable. "Susceptible a" resistencia a por lo menos un agente quimioterapéutico, significa que la enfermedad neoplásica actualmente es resistente al por lo menos un agente quimioterapéutico o desarrollará resistencia después de la administración repetida del agente quimioterapéutico.

Los ejemplos en la presente también demuestran que los compuestos de fórmula (I) cuando son combinados bortezomib disparan la apoptosis sinérgica en células MM. Así, un compuesto de fórmula (I) puede ser administrado en combinación con Bortezomib/PS-341 para obtener la apoptosis utilizando dosis más bajas de cada agente que si los agentes fueran administrados separadamente, reduciendo así la toxicidad de los agentes. Sorprendentemente, estos resultados demuestran que se puede obtener un resultado sinérgico al administrar dos

inhibidores de proteasoma diferentes. "Sinérgico", significa que la combinación de dos o más agentes produce un índice de combinación (CI) < 1.0 . También se ha demostrado que la combinación del compuesto de fórmula (I) con agentes
5 inhibidores sin proteasoma proporcionan un efecto aditivo.

"Aditivo" significa que la combinación de dos o más agentes produce un CI aproximadamente igual a uno. El CI puede ser determinado, por ejemplo, mediante el método de Chou-Talalay método de acuerdo con la siguiente ecuación: "CI = (D)₁/(Dx)₁ +
10 (D)₂/(Dx)₂ + (D)₁(D)₂/(Dx)₁(Dx)₂", en donde (D)₁ y (D)₂ son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 que tienen x efecto cuando son usados en combinación y (Dx)₁ y (Dx)₂ son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 que tienen el mismo efecto x cuando son usados solos.

15 Así, en una modalidad, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica que comprende administrar dos o más inhibidores de proteasoma en combinación sinérgica. Ejemplos no limitantes de clases de inhibidores de proteasoma que pueden ser combinados incluyen inhibidores de
20 proteasoma de boronato de péptido, inhibidores de proteasoma de aldehído péptido e inhibidores de proteasoma sin péptido. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de proteasoma de boronato de péptido es bortezomib. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de proteasoma de aldehído de péptido es MG-132.
25 Ejemplos no limitantes de inhibidores de proteasoma sin péptido

incluyen omuralide y el compuesto de fórmula (I). En una modalidad, por lo menos uno de los inhibidores de proteasoma es un compuesto de fórmula (I) o bortezomib. Mediante administración en "combinación", significa que los dos o más
5 agentes pueden ser encontrados en la cor sanguínea del paciente al mismo tiempo, sin consideración de cuándo o cómo son realmente administrados. En una modalidad, los agentes son administrados simultáneamente. En tal modalidad, la administración en combinación se lleva a cabo al combinar los
10 agentes en una forma de dosificación individual. En otra modalidad, los agentes son administrados secuencialmente. En una modalidad, los agentes son administrados a través de la misma ruta, tal como oralmente. En otra modalidad, los agentes son administrados a través de diferentes rutas, tal como uno
15 siendo administrado oralmente y otro siendo administrado i.v. En una modalidad ventajosa, la farmacocinética de los dos o más agentes es sustancialmente la misma.

En una modalidad, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica que comprende la
20 administración de un compuesto de fórmula (I) en combinación con otro agente quimioterapéutico. En una modalidad, el agente quimioterapéutico es dexametasona, doxorubicina o talidomida. En una modalidad, el otro agente quimioterapéutico es otro inhibidor de proteasoma tal como bortezomib. En una modalidad,
25 se proporciona una composición farmacéutica que combina un

compuesto de fórmula (I) con el agente quimioterapéutico adicional.

En algunas modalidades, la enfermedad neoplásica tratada por cualquiera de los métodos anteriores puede ser un
5 cáncer seleccionado de cáncer de pecho, sarcoma, leucemia, cáncer de ovarios, cáncer de uretra, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer
10 endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer del cerebro o sistema nervioso central (CNS). En una modalidad, la enfermedad neoplásica es un mieloma múltiple.

Composiciones farmacéuticas

15 En otro aspecto, la presente revelación es concerniente con una composición farmacéutica que comprende agentes tensioactivos aceptables fisiológicamente, portadores, diluyentes, excipientes, agentes calmantes, agentes de suspensión, sustancias formadoras de película y asistentes de
20 recubrimiento o una combinación de los mismos; y un compuesto o combinación revelada en la presente. Portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en el arte farmacéutico, y son descritos por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton,
25 PA (1990), que es incorporado en la presente por referencia en

su totalidad. Conservadores, estabilizantes, tintes, endulzantes, fragancias, agentes saborizantes y los semejantes pueden ser provistos en la composición farmacéutica. Por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico pueden ser agregados como conservadores. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. En varias modalidades, alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y los semejantes pueden ser usados como agentes tensioactivos; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, fosfato hidrógeno de calcio, carboximetil celulosa de calcio y los semejantes pueden ser usados como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y los semejantes pueden ser usados como agentes suavizantes; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soya pueden ser usados como agentes de suspensión o lubricantes; acetato ftalato de celulosa como derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar o copolímero de metilacetato-metacrilato como un derivado de polivinilo pueden ser usado como agentes de suspensión; y plastificantes tales como éster ftalatos y los semejantes pueden ser usados como agentes de suspensión.

El término "composición farmacéutica" se refiere a

una mezcla de un compuesto o combinación de compuestos
revelados en la presente con otros componentes químicos, tales
como diluyentes o portadores. La composición farmacéutica
facilita la administración del compuesto a un organismo.
5 Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en
el arte en las que se incluyen, pero no limitadas a,
administración oral, inyección, aerosol, parenteral y tópica.
Las composiciones farmacéuticas pueden también ser obtenidas al
hacer reaccionar compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos
10 tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido
sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido
metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico,
ácido salicílico y los semejantes.

El término "portador" define un compuesto químico que
15 facilita la incorporación de un compuesto a células o tejidos.
Por ejemplo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) es un portador
utilizado comúnmente ya que facilita la absorción de muchos
compuestos orgánicos a las células o tejidos de un organismo.

El término "diluyente" define compuesto químicos
20 diluidos en agua que disolverán el compuesto de interés también
como estabilizarán la forma biológicamente activa del
compuesto. Sales disueltas en soluciones de pH regulado son
utilizadas como diluyentes en el arte. Una solución de pH
regulado usada comúnmente es solución salina de pH regulado de
25 fosfato debido a que imita las condiciones de sal de la sangre

humana. Puesto que las sales reguladoras del pH pueden controlar el pH de una solución a bajas concentraciones, un diluyente de pH regulado raramente modifica la actividad biológica de un compuesto.

5 El término "aceptable fisiológicamente" define un portador o diluyente que no abroga la actividad biológica y propiedades del compuesto.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser administradas a un paciente humano per se o
10 en composiciones farmacéuticas, en donde son mezcladas con portadores o excipiente(s) apropiados. Técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente invención pueden ser encontradas en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990.

15 Rutas apropiadas de administración pueden incluir, por ejemplo oral, rectal, transmucosal, topical o administración intestinal; administración parenteral, en las que se incluyen inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, también como inyecciones
20 intratecales, intraventricular directa, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Los compuestos pueden también ser administrados como formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, en las que se incluyen inyecciones de depósito, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (en
25 los que se incluyen electrotransporte) y los semejantes, para

CA

administración pulsada prolongada y/o sincronizada a una velocidad predeterminada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser manufacturadas de una manera que es en sí misma conocida, por ejemplo por medio de procesos de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o formación de tabletas convencionales.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden así ser formuladas de manera convencional utilizando uno o más portadores aceptables fisiológicamente que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos a preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración escogida. Cualquiera de las técnicas bien conocidas, portadores y excipientes pueden ser usados como sea apropiado y como se entiende en el arte; por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, anterior.

Inyectables pueden ser preparados en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas apropiadas para solución o suspensión en líquido antes de inyección o como emulsiones. Excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de

SC

5

cisteína y los semejantes. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes reguladores del pH y los semejantes. Soluciones reguladoras del pH fisiológicamente compatibles incluyen, pero no están limitadas a, solución de Hanks, solución de Ringer o solución reguladora del pH salina fisiológica. Si se desea, se pueden utilizar preparaciones que mejoran la absorción (por ejemplo, liposomas).

10 Para la administración transmucosal, los penetrantes apropiados a la barrera a ser permeada pueden ser usados en la formulación.

Formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua, incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, suspensiones de los compuestos activos pueden ser preparados como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo u otros aceites orgánicos tales como aceites de soya, uva o almendra o ésteres de ácido grado sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrana.

15
20
25

57

Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizadores o agentes apropiados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Formulaciones para inyección
5 pueden ser presentadas en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampolletas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservador agregado. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación
10 tales como agentes de suspensión, agentes estabilizadores y/o agentes de dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

15 Para la administración oral, los compuestos pueden ser formulados fácilmente al combinar los compuestos activos con portadores aceptables farmacéuticamente bien conocidos en el arte. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención sean formulados como tabletas, píldoras, grageas,
20 cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas aguadas, suspensiones y los semejantes, para ingestión oral por un paciente a ser tratado. Preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden ser obtenidas al combinar los compuestos activos con excipiente sólido, opcionalmente molienda de una mezcla
25 resultante y procesamiento de la mezcla de gránulos, después de

agregar auxiliares apropiados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de gragea. Excipientes apropiados son, en particular, rellenos o cargas tales como azúcares, en los que se incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; 5 preparaciones de celulosa tales como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar 10 agentes desintegrantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos tales como alginato de sodio. Núcleos de grageas son provistos con recubrimientos apropiados. Para este propósito, soluciones de azúcar concentradas pueden ser usadas, que pueden contener 15 opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Tintes o pigmentos pueden ser agregado a las tabletas o recubrimientos de gragea para identificación o para 20 caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo. Para este propósito, soluciones de azúcar concentradas pueden ser usadas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y 25 solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Tintes o

pigmentos pueden ser agregados a las tabletas o recubrimientos de gragea para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Preparaciones farmacéuticas que pueden ser usadas
5 oralmente incluyen cápsulas de empuje-encaje fabricadas de gelatina, también como cápsulas selladas blandas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de empuje-encaje pueden contener los ingredientes activos en mezcla con relleno o carga tales como lactosa,
10 aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y opcionalmente estabilizantes. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida o líquido polietilenglicoles
15 líquidos. Además, se pueden agregar estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones apropiadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o trocizcos formulados de manera
20 convencional.

Para administración mediante inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención son administrados convenientemente en forma de una presentación de atomización en aerosol de paquetes presurizados o un
25 nebulizador, con el uso de un propelente apropiado, por

ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada al proporcionar una válvula para administrar una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en inhalador o insuflador pueden ser formulados que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

Se revelan además en la presente varias composiciones farmacéuticas bien conocidas en el arte farmacéutico para usos que incluyen administración intraocular, intranasal e intraauricular. Penetrantes apropiados para estos usos son en general conocidos en el arte. Composiciones farmacéuticas para administración intraocular incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, tales como colirios o en goma gelana (Shedden et al., Clin. Ther., 23(3):440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2): 101-3 (1996)); pomadas oftálmicas; suspensiones oftálmicas, tales como micropartículas, partículas poliméricas pequeñas que contienen fármaco que están suspendidas en un medio portador líquido (Joshi, A., J. Ocul. Pharmacol, 10(1):29-45 (1994)), formulaciones solubles en lípido (Alm et al., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58 (1989)), y microesferas (Mordenti, Toxicol. Sci., 52(1): 101-6 (1999)); e insertos oculares. Todas las referencias mencionadas

anteriormente, son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Tales formulaciones farmacéuticas apropiadas son más frecuentemente y de preferencia formuladas para ser estériles, isotónicas y de pH regulado por estabilidad y confort. Las composiciones farmacéuticas para administración intranasal pueden también incluir gotas y atomizaciones frecuentemente preparadas para simular en muchos aspectos secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se revela en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), que es incorporada en la presente por referencia en su totalidad, y bien conocido para aquellos experimentados en el arte, formulaciones apropiadas son más frecuentemente y de preferencia isotónicas, ligeramente de pH regulado para mantener un pH de 5.5 a 6.5, y más frecuentemente y de preferencia incluyen conservadores antimicrobianos y estabilizadores de fármaco apropiados. Formulaciones farmacéuticas para administración intraauricular incluye suspensiones y pomadas para aplicación tópica en el oído. Solventes comunes para tales formulaciones aurales incluyen glicerina y agua.

Los compuestos pueden también ser formulados en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos pueden también ser formulados como una proporción de depósito. Tales formulaciones de larga acción pueden ser administradas mediante implante (por ejemplo
5 subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden ser formulados con materiales polímeros o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados escasamente
10 soluble, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Para compuestos hidrofóbicos, un portador farmacéutico aceptable puede ser un sistema de cosolventes que comprende alcohol bencílico, un surfactante no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. Un
15 sistema de cosolvente común usado es del sistema de cosolvente de VPD, que es una solución de 3% en peso/volumen de alcohol bencílico, 8% en peso/volumen de el surfactante no polar Polisorbate 80™, y 65% en peso/volumen de polietilenglicol 300, compensado al volumen en etanol absoluto. Naturalmente, las
20 proporciones de un sistema de co-solvente se pueden hacer variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes del co-solvente se pueden hacer variar: por ejemplo, otros surfactantes no polares de baja toxicidad pueden
25 ser usados en lugar de POLYSORBATE 80™; el tamaño de fracción

de polietilenglicol se puede hacer variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar el polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituirse por dextrosa.

5 Alternativamente, otros sistemas de administración para compuestos farmacéuticos hidrofóbicos pueden ser empleados. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos ejemplos de vehículos de administración o portadores para fármacos hidrofóbicos. Ciertos solventes orgánicos tales como
10 dimetilsulfóxido también pueden ser empleados, aunque usualmente a costo de mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden ser administrados utilizando un sistema de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente
15 terapéutico. Varios materiales de liberación sostenida han sido establecidos y son bien conocidos por aquellos experimentados en el arte. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos por unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la
20 naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, estrategias adicionales para la estabilización de proteína pueden ser empleadas.

Los agentes diseñados para ser administrados intracelularmente pueden ser administrados utilizando técnicas
25 bien conocidas para aquellos de habilidad ordinaria en el arte.

Por ejemplo, tales agentes pueden ser encapsulados en liposomas. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa al tiempo de la formación del liposoma son incorporadas al interior acuoso. El contenido liposomal son ambos protegidos
5 del microambiente externo y debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, son administradas eficientemente al citoplasma de la célula. El liposoma puede ser recubierto con un anticuerpo específico del tejido. Los liposomas serán apuntados a y absorbidos selectivamente por el
10 órgano deseado. Alternativamente, moléculas orgánicas hidrofóbicas pequeñas pueden ser administradas de manera directa intracelularmente.

Agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales pueden ser incorporados a las composiciones farmacéuticas.
15 Alternativa o adicionalmente, composiciones farmacéuticas pueden ser combinadas con otras composiciones que contienen otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Métodos de Administración

20 Los compuestos o composiciones farmacéuticas pueden ser administrados al paciente mediante cualesquier medio apropiado. Ejemplos no limitantes de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) administración por medio de rutas orales, tal administración incluye administración en formas de
25 cápsula, tableta, gránulo, atomización, jarabe u otras de tales

formas; (b) administración por medio de rutas no orales, tales como administración rectal, vaginal, intrauretal, intraocular, intranasal o intraauricular, tal administración incluye administración como una suspensión acuosa, una preparación
5 aceitosa o los semejantes o como un goteo, atomización, supositorio, salva, pomada o los semejantes; (c) administración via inyección, subcutánea, interaperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternalmente o los semejantes, en las que
10 se incluyen administración de bomba de infusión; (d) administración localmente tal como mediante inyección directamente al área renal o cardiaca, por ejemplo mediante implante de depósito; también como (e) administración tópicamente; como se considere apropiado por aquellos de
15 habilidad en el arte para traer el compuesto de la invención en contacto con el tejido viviente.

Composiciones farmacéuticas apropiadas para
administración incluyen composiciones en donde los ingredientes
activos están contenidos en una cantidad efectiva para obtener
20 su propósito planeado. La cantidad terapéuticamente efectiva de
los compuestos revelados en la presente requerida como una
dosis dependerá de la ruta de administración, el tipo de animal, en los que se incluyen humanos, que es tratado y las características físicas del animal específico bajo
25 consideración. La dosis puede ser adaptada para obtener un

efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que aquellos experimentados en las artes médicas reconocerán. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva
5 significa una cantidad de compuesto efectiva para impedir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la sobrevivencia del sujeto que es tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de aquellos experimentados en el arte, especialmente
10 a la luz de la revelación detallada proporcionada en la presente.

Como será fácilmente evidente para aquel de habilidad en el arte, la dosificación in vivo útil a ser administrada y el modo de administración particular variarán dependiendo de la
15 edad, peso y especie del mamífero que es tratado, los compuestos particulares empleados y el uso específico para el cual estos compuestos son usados. La determinación de niveles de dosificación efectivos, esto es, los niveles de dosificación necesarios para obtener el resultado deseado, se puede efectuar
20 por aquel de habilidad en el arte utilizando métodos farmacológicos sistemáticos. Comúnmente, las aplicaciones clínicas humanas de productos son comenzadas a niveles de dosificación más bajos, el nivel de dosificación es incrementado hasta que se obtiene el efecto deseado.
25 Alternativamente, se pueden usar estudios in vitro aceptables

para establecer dosis y rutas de administración útiles de las composiciones identificadas por los métodos presentes utilizando métodos farmacológicos establecidos.

En estudios en animales no humanos, las aplicaciones
5 de productos potenciales son comenzadas a niveles de dosificación más altos, la dosificación es incrementada hasta que el efecto deseado ya no se obtiene o los efectos secundarios adversos desaparecen. La dosificación puede fluctuar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la
10 indicación terapéutica. Comúnmente, las dosificaciones pueden ser de entre aproximadamente 10 microgramos/Kg y 100 mg/De de peso corporal, preferiblemente entre alrededor de 100 microgramos/Kg y 10 mg/Kg de peso corporal. Alternativamente las dosificaciones pueden estar basadas y calculadas sobre el
15 área superficial del paciente, como se comprenderá por aquellos de habilidad en el arte.

La formulación exacta, ruta de administración y dosificación para las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser escogidas por el médico
20 individual en vista de la condición del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl et al. 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad, con referencia particular al Capítulo 1, página 1). Comúnmente, el intervalo de dosificación de la
25 composición administrada al paciente puede ser de

aproximadamente 0.5 a 1000 mg/Kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede ser una sola o una serie de dos o más dadas en el curso de uno o más días, como sea necesario por el paciente. En instancias en donde dosificaciones humanas para compuestos han sido establecidos para por lo menos alguna condición, la presente invención usará estas mismas dosificaciones o dosificaciones que están entre aproximadamente 0.1% y 500%, más preferiblemente entre alrededor de 25% y 250% de la dosificación humana establecida. En donde ninguna dosificación humana está establecida, como será el caso para compuestos farmacéuticos recién descubiertos, una dosificación humana apropiada puede ser inferida a partir de valores de ED_{50} o ID_{50} , u otros valores apropiados derivados a partir de estudios in vitro o in vivo, tal como sea calificado por estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Se debe notar que el médico que atiende sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o disfunciones de órganos. Inversamente, el médico que atiende también sabría ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera apropiada (precluyendo toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo de la alteración de interés variará con la severidad de la condición a ser tratada y a la ruta de administración. La severidad de la condición puede por ejemplo ser evaluada, en parte mediante métodos de evaluación de pronóstico estándares.

Además, la dosis y quizás frecuencia de dosis, también variarán de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta de paciente individual. Un programa comparable a aquel discutido anteriormente puede ser usado en medicina veterinaria.

5 Aunque la dosificación exacta será determinada en una base de formación en fármaco, en la mayoría de los casos, se pueden hacer algunas generalizaciones con respecto a la dosificación. El régimen de dosificación diario para un paciente humano adulto puede ser por ejemplo, una dosis oral de
10 entre 0.1 mg y 2000 mg de cada ingrediente activo, preferiblemente entre 1 mg y 500 mg, por ejemplo 5 a 200 mg. En otras modalidades, una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de cada ingrediente activo de entre 0.01 mg y 100 mg, preferiblemente entre 0.1 mg y 60 mg, por ejemplo 1 a 40 mg
15 es usada. En casos de administración de una sal aceptable farmacéuticamente, las dosificaciones pueden ser calculadas como la base libre. En algunas modalidades, la composición es administrada 1 a 4 veces por día. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden ser administradas mediante
20 infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada ingrediente activo hasta 1000 mg por día. Como se comprenderá por aquellos de habilidad en el arte, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar los compuestos revelados en la presente en cantidades que exceden o aún
25 exceden bastante, el intervalo de dosificación preferido

afirmado anteriormente con el fin de tratar efectiva y agresivamente enfermedades o infecciones particularmente agresivas. En algunas modalidades, los compuestos serán administrados por un período de terapia continuo, por ejemplo
5 por una semana o más o por meses o años.

La cantidad e intervalo de dosificación pueden ser ajustados individualmente para proporcionar niveles en el plasma de la porción activa que son suficientes para mantener los efectos moduladores o concentración efectiva mínima (MEC).
10 La MEC variará para cada compuesto pero puede ser estimada a partir de datos in vitro. Dosificaciones necesarias para obtener la MEC dependerán de las características individuales y ruta de administración. Sin embargo, análisis de HPLC o bioanálisis pueden ser usados para determinar concentraciones
15 en el plasma.

Los intervalos de dosificación pueden también ser determinados utilizando el valor de MEC. Las composiciones deben ser administradas utilizando un régimen que mantiene niveles en el plasma por encima de la MEC por 10-90% del
20 tiempo, preferiblemente entre 30-90% y más preferiblemente entre 50-90%.

En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en el plasma.

25 La cantidad de composición administrada será por

supuesto dependiente del sujeto que es tratado, del peso del sujeto, la severidad de la aflicción, la manera de administración y el juicio del médico que prescribe.

Los compuestos revelados en la presente pueden ser
5 evaluados en cuando a eficacia y toxicidad utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicidad de un compuesto particular o de un subconjunto de los compuestos, que comparten ciertas porciones químicas, puede ser establecida al determinar toxicidad in vitro hacia una línea celular, tal como una línea
10 celular de mamífero y preferiblemente humana. Los resultados de tales estudios son frecuentemente predictivos de toxicidad en animales, tales como mamíferos o más específicamente humanos. Alternativamente, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo de animal, tales como ratones, ratas, conejos o changos
15 puede ser determinada utilizando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede ser establecida utilizando varios métodos reconocidos, tales como métodos in vitro, modelos de animal o pruebas clínicas humanas. Existen modelos in vitro reconocidos para casi cada clase de condición en las
20 que se incluyen pero no limitadas a cáncer, enfermedad cardiovascular y varia disfunción inmune. Similarmente, modelos de animales aceptables pueden ser usados para establecer la eficacia de químicos para tratar tales condiciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el
25 experimentado en el arte puede ser guiado por el estado del

arte para escoger un modelo, dosis y ruta de administración y régimen apropiado. Por supuesto, pruebas clínicas humanas pueden también ser usadas para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

5 La composición puede se presentada, si se desea, en un paquete o dispositivo surtidor que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender por ejemplo hoja de metal o plástico, tal como un paquete vesicular. El paquete o
10 dispositivo surtidor puede estar acompañado por instrucciones para administración. El paquete o surtidor puede también estar acompañado con una notificación asociada con el recipiente en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la manufactura, uso o venta de farmacéuticos, tal notificación
15 refleja la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para administración humana o veterinaria. Tal notificación por ejemplo, puede ser la etiqueta aprobada por la administración de alimentos y fármacos de los Estados Unidos de América para fármacos de prescripción o el inserto de producto aprobado.
20 Composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulados en un portador farmacéutico compatible pueden también ser preparadas, colocadas en un recipiente apropiado y etiquetadas para tratamiento de una condición indicada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Procedimientos generales

Cultivo celular y reactivos. Líneas de células MM.1S y Dex-sensibles y MM humanas MM.1R Dex-resistentes fueron
5 obtenidas del Dr. Steven Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). Véase Moalli, P. A., Pillay, S., Weiner, D., Leikin, R. & Rosen, S. T. (1992) Blood 79, 213-22 y Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R. L., Podar, K.,
10 Weller, E., Munshi, N. & Anderson, K. C. (2002) Blood 100, 2187-94; ambos de los cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Células RPMI-8226 y doxorubicina (Dox)-resistentes (Dox-40) fueron obtenidas del Dr. William Dalton (Moffit Cancer Center, Tampa, FL). Las
15 líneas de células MM U266 y OPM2 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las líneas celulares de tumor humano DU 145, HT-29, Jurkat, LoVo, MDA-MB-231, MIA PaCa-2, NCI-H292, OVCAR-3, PANC-1, y PC-3 fueron compradas de ATCC (Manassas, VA). Líneas de células MM fueron
20 cultivadas en medio RPMI-1640 complementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2 mM L-glutamina. Células MM fueron aisladas recientemente de pacientes recurrentes después de múltiples terapias previas en las que se
25 incluyen dexametasona (Dex), melfalana, talidomida o

bortezomib. Células MM fueron purificadas de muestras de espina dorsal del paciente mediante método de selección positivo CD138 utilizando microperlas CD138 (Syndecan-1) y el clasificador celular magnético Auto MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA).

5 Véase Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R. L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. & Anderson, K. C. (2002) Blood 100, 2187-94; que son incorporados en la presente por referencia en su totalidad. Fibroblastos de piel humano

10 normales CCD-27sk fueron obtenidos de ATCC y cultivados en DMEM complementado con FBS inactivado por calor al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, L-glutamina 4 mM y piruvato de sodio 1 mM. Las células fueron tratadas con varias concentraciones del compuesto de fórmula II

15 (X=Cl) (Nereus Pharmaceuticals, Inc, San Diego, CA), Bortezomib o Dex (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO).

Viabilidad celular y análisis de apoptosis. La viabilidad celular fue determinada mediante el análisis de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

20 (MTT; Chemicon International Inc., Temecula, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN), y como se describe en Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R. L., Podar, K.,

25 Weller, E., Munshi, N. & Anderson, K. C. (2002) Blood 100,

2187-94; que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Se utilizó ELISApplus de detección de muerte celular para cuantificar la muerte celular, según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Sciences, Indianápolis, IN).

5

Ejemplo 2 - Análisis de actividad de proteasoma 20S in vitro

La actividad semejante a quimotripsina de la proteasoma 20S fue medida como se describe en Stein, R. L., Melandri, F. & Dick, L. (1996) Biochemistry 35, 3899-908 and
10 Lightcap, E. S., McCormack, T. A., Pien, C. S., Chau, V., Adams, J. & Elliott, P. J. (2000) Clin Chem 46, 673-83; ambos de los cuales son incorporados en la presente por referencia en su totalidad. El proteasoma 20S derivado de eritrocito humano purificado fue obtenido de Biomol, Plymouth Meeting, PA. Las
15 actividades semejantes a quimotripsina, semejantes a caspasa y semejantes a tripsina del proteosoma 20S fueron determinadas utilizando Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC (Boston Biochem, Cambridge, MA) y Boc-LRR-AMC (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA) como sustratos de péptido, respectivamente. La fluorescencia del
20 sustrato de péptido escindido fue medido utilizando un lector de microplacas de 96 cavidades Fluoroskan Ascent (Thermo Electron, Waltham, MA). Los valores de EC_{50} fueron calculados mediante Prism (GraphPad Software) utilizando un modelo de pendiente variable de respuesta de dosis sigmoidal. Los valores
25 de EC_{50} fueron definidos como la concentración del fármaco a la

cual se inhibe el 50% de la fluorescencia relativa máxima. Los resultados, graficados en la figura 1, indicaron que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) inhibe todas las tres actividades de proteasoma, aunque a diferentes concentraciones.

5

Ejemplo 3 - Análisis de actividad de proteasoma 20S ex vivo en células de sangre entera en ratones (una sola administración i.v. u oral)

Para determinar directamente si el compuesto de
10 fórmula (II) (X=Cl) inhibe la actividad de proteasoma in vivo,
el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) fue disuelto en DMSO al
100% y diluido serialmente con Solutol al 5% (Solutol® HS 15;
polietilenglicol 660 12-hidroxiestearato, BASF, Shreveport, LA)
produciendo una concentración final de 2% de DMSO. El control
15 de vehículo consistió de 2% de DMSO y 98% (5% Solutol® HS 15).
Ratones macho Swiss-Webster (cinco por grupo, 20-25 gramos en
peso) fueron tratados en Bolder BioPATH, Inc. (Boulder, CO) con
varias concentraciones del compuesto ya sea intravenosa u
oralmente a un volumen de 10 mL/Kg. Un grupo de animales estuvo
20 sin tratar para establecer una referencia de la actividad de
proteasoma. Noventa minutos después de la administración del
compuesto, los animales fueron anestesiados y se extrajo sangre
mediante punción cardiaca. Células de sangre entera empacadas
fueron recolectadas mediante centrifugación, lavadas con PBS, y
25 congeladas sobre hielo seco para la determinación de la

actividad de proteasoma ex vivo. La actividad semejante a quimiotripsina del proteasoma del proteasoma 20S en lisados de célula de sangre blancas (WBC) fue determinada utilizando el sustrato de péptido suc-LLVY-AMC. Las unidades de fluorescencia
5 relativas (RFU) fueron normalizadas utilizando las concentraciones de proteína de los lisados celulares. La actividad de proteasoma 20S de los ratones individuales es mostrada en la figura 2 con la barra horizontal que representa la actividad promedio. La referencia representa la actividad de
10 proteasoma 20S observado en lisados de WBC preparados a partir de ratones sin tratar. Los resultados, ilustrados en la figura 2, indican que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) inhiben la actividad semejante a quimiotripsina de proteosomas 20S en células de sangre blancas de manera dependiente de la dosis.
15 Importantemente, estos hallazgos establecen que el compuesto es oralmente activo e inhibe la actividad de proteasoma in vivo.

Ejemplo 4 - Determinación de alteraciones disparadas en actividad de proteasoma en células MM (in vitro)

20 La determinación de si el compuesto de fórmula II (X=Cl) afecta la actividad de proteasoma en células de mieloma múltiple in vitro fue realizada utilizando un experimento de competencia con AdaY¹²⁵Iahx₃L₃VS. En este análisis, los sitios que no son apuntados por el compuesto de fórmula II (X=Cl) son
25 marcados mediante AdaY(¹²⁵I)Ahx₃L₃VS y visualizados mediante

autoradiografía, en tanto que los sitios que son apuntados por el compuesto de fórmula II ($X=Cl$) no pueden ser vistos en el autoradiograma. Células MM.1S fueron incubadas con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (7 nM) durante 30 minutos, 1 hora, 3
5 horas o 6 horas, y se efectuó lisis celular con perlas de vidrio. 60 μg de extractos de proteína fueron incubados durante 2 horas con el inhibidor de proteasoma yodado $AdaY^{125}Iahx_3L_3VS$ a 37°C. Luego las proteínas fueron desnaturalizadas mediante ebullición en solución reguladora del pH de muestra reductora y
10 separadas sobre un gel de SDS-PAGE al 12.5%, seguido por autoradiografía. Como se puede ver en la figura 3, la subunidad beta-5 ($\beta-5$) del proteasoma está notablemente menos marcada por $AdaY(^{125}I)Ahx_3L_3VS$ en células tratadas que las células de control. Dado que la subunidad $\beta-5$ modera la actividad
15 semejante a quimiotripsina, estos resultados sugieren que el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) se enlaza a la subunidad $\beta-5$, inhibiendo mediante esto la actividad semejante a quimiotripsina en células MM.1S. Además, el tratamiento de células MM.1S con el compuesto (7 nM) durante 6 horas también
20 disminuye la marcación de la subunidad $\beta-2$ (actividad tríptica) y las subunidades $\beta-1$ (actividad semejante a caspasa) (datos no mostrado)

Ejemplo 5 - Determinación de alteraciones disparadas en actividad de proteasoma en células MM (in vivo)

La determinación in vivo de actividad de proteasoma se llevó a cabo utilizando un experimento de competencia con Dansyl-Ahx₃L₃VS, que modifica covalentemente de todas las subunidades de proteasoma activas. Este inhibidor contiene un hapteno de hexanoil sulfonamida dansil que puede ser visualizado mediante prueba inmunológica utilizando anticuerpos contra la porción de dansilo. Células MM.1S fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 30 minutos, 1 hora o 3 horas, seguido por incubación de 1 hora con Dansil-Ahx₃L₃VS 5 μ M a 37°C. Las células fueron sometidas a lisis al incubarlas durante 30 minutos en solución reguladora del pH de lisis NP-40 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, 1% NP-40), seguido por centrifugación de 5 minutos para remover las fracciones de membrana, núcleos, y desechos celulares desechos celulares. 60 μ g del extracto de proteína fueron separados mediante gel de SDS-PAGE al 12.5%, seguido por análisis de prueba inmunológica utilizando Ab policlonal anti-dansilo policlonal (1:7500, conejo, Molecular Probes) y anticuerpo secundario anti-conejo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Southern Biotech). Las inmunoabsorciones fueron desarrolladas mediante quimioluminiscencia mejorada (Western Lightning, Perkin-Elmer). Como se puede ver en la figura 4, el tratamiento de células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl)

disminuye la marcación con dansil-Ahx₃L₃VS en las subunidades β -5. Además, el compuesto también disminuye la marcación de dansylAhx₃L₃VS de las subunidades β -1 y β -2, aunque a concentraciones más altas: 1 nM y 20 nM, respectivamente. En 5 contraste, el tratamiento de células MM.1S con dosis aún más altas de bortezomib no inhibe las subunidades β -2 (datos no mostrados). Tomados conjuntamente, estos hallazgos demuestran la habilidad del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) para inhibir todas las tres actividades de proteasoma en células MM.

10

Ejemplo 6 - Efecto sobre la viabilidad de células MM

La viabilidad celular fue determinada mediante análisis de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Chemicon International Inc., Temecula, 15 CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN), y como se describe en Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R. L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. & Anderson, K. C. (2002) 20 Blood 100, 2187-94; que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad. La viabilidad celular después del tratamiento de células MM.1S (-■-), MM.1R Dex-resistentes (-□-), RPMI-8226 (-●-), Dox-40 doxorubicina-resistentes (-◆-), OPM2 (-○-), y células U266 (-○-) con el compuesto de fórmula 25 (II) (X=Cl) durante 24 horas es ilustrado en la figura 5A. Los

resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de tres experimentos independientes ($P < 0.005$; $n = 3$ para todas las líneas celulares). Se observa una disminución significativa dependiente de la dosis en la viabilidad celular en todas las
5 líneas celulares (intervalo de IC_{50} 7-24 nM).

La viabilidad celular fue también determinada sobre células MM de paciente purificadas. Células de tumor recién aisladas de nueve pacientes MM que recaen después de múltiples terapias previas en las que se incluyen Dex, bortezomib, y
10 talidomida fueron tratados con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (10 nM) durante 24 horas y analizados en cuanto a apoptosis. Como se ve en la figura 5B, se observa apoptosis significativa en estas células tal como se mide mediante análisis de fragmentación de ADN ($P < 0.005$; $n = 2$). Los
15 valores graficados son la media $\pm$ Desviación Estándar de muestras por triplicado. Importantemente, 4 de 9 pacientes examinados fueron refractarios a la terapia de bortezomib y 5 pacientes fueron resistentes a terapias de talidomida and Dex. Estos datos sugieren que (1) el compuesto de fórmula (II)
20 ($X=Cl$) induce apoptosis en células MM sensibles y resistentes a terapias convencionales y de bortezomib; y (2) la IC_{50} del compuesto para células MM está dentro de la concentración nanomolar.

Ejemplo 7 - Efecto sobre la viabilidad de célula estromal de médula espinal (BMSC)

Las células MM se localizan predominantemente en el microambiente de médula ósea y su interacción con BMSC induce producción de citocinas que moderan el crecimiento de células MM, también como protegen contra apoptosis inducida por fármaco. Véase Anderson, K. C. (2003) Cancer 97, 796-801; que es incorporado por referencia en la presente en su totalidad. Por consiguiente, el efecto del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) sobre cinco pacientes BMSC derivado de MM fue determinado. Como se ve en la figura 6, el tratamiento de BMSC (Paciente # 1-5) con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (20 nM) durante 24 horas no induce apoptosis en estas células, como se evidencia por el análisis de fragmentación de ADN. El control positivo mostrado es un control interno para el análisis. Células MM purificadas (CD 138+) de dos de los cinco pacientes MM fueron también examinadas en los mismos experimentos. Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de muestras por triplicado. El compuesto disparó un incremento significativo (10-12 veces) en la apoptosis de células de MM de paciente purificadas (CD138-positivas). Estos resultados sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) actúa directamente sobre células MM, pero no BMSC.

Ejemplo 8 - Efecto de anti-apoptóticos de interleucina-6 humano recombinante (rhIL-6) y factor-I de crecimiento semejante a insulina humano recombinante (rhIGF-I)

La adhesión de células MM a BMSC induce la secreción
5 de IL-6 e IGF-I de BMSC, que no solamente regula el crecimiento
de células MM, sino también protege contra quimioterapia. Véase
Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I., Chang, R., Barlogie,
B., Xiao, H. & Epstein, J. (1994) Blood 84, 3063-70 y Chauhan,
D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G.,
10 Robertson, M., Kufe, D. W. & Anderson, K. C. (1997) Blood 89,
227-234; ambos de los cuales son incorporados en la presente
por referencia en su totalidad. Así, se evalúa si rhIL-6 o
rhIGF-I inhibe la apoptosis en células MM inducida por el
compuesto de fórmula (II) (X=Cl). Células MM.1S fueron tratadas
15 con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) o Dex (0.5 μ M)
durante 24 horas, en presencia y ausencia de rhIL-6 (10 ng/ml) o
rhIGF (50 ng/ml). A 24 horas, las células fueron cosechadas y
la viabilidad analizada mediante análisis de MTT. Como se ve en
la figura 7, la viabilidad celular media fue $47 \pm 2.3\%$ después
20 del tratamiento con el compuesto solo; $51.2 \pm 3.2\%$ con el
compuesto + rhIL-6 ($P = 0.26$, Wilcoxon test), y $50.3\% \pm 2.0\%$
con el compuesto + rhIGF-I ($P = 0.28$). La viabilidad media fue
 $51 \pm 2.1\%$ después de tratamiento con Dex y $92 \pm 5.5\%$ para Dex +
rhIL-6 ($P = 0.05$, como se determina mediante la prueba de suma
25 de rangos de Wilcoxon de un lado). Los resultados son la media

+ Desviación Estándar de tres experimentos independientes. Estos hallazgos sugieren que ni IL-6 ni IGF-1 bloquean la actividad anti-MM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl). En contraste y como en otros estudios, tanto IL-6 e IGF-I bloquean la viabilidad celular MM.1S disminuida inducida Dex. Véase Chauhan, D., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) Int J Hematol 78, 114-20 y Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S. P., Munshi, N. C., Richardson, P. G. & Anderson, K. C. (2002) Oncogen 21, 5673-83; ambos de los cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Así, los datos sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) supera el crecimiento y efectos protectores de IL-6 e IGF-I sobre células MM, e indican mecanismos de acción distintos para el compuesto y Dex contra células MM. Reportes de que los altos niveles en el suero de IL-6 contribuyen a quimioresistencia clínica y falla de tratamiento, acoplados con la actividad del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) para inducir apoptosis de células MM aún en presencia de IL-6 o IGF-I, sugieren que el compuesto puede superar la resistencia al fármaco en pacientes con MM avanzada. Véase Kyrstsonis, M. C, Dedoussis, G., Baxevanis, C, Stamatelou, M. & Maniatis, A. (1996) Br J Haematol 92, 420-422; que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad.

Ejemplo 9 – Efecto sobre la migración inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de células MM

El VEGF es elevado en el microambiente de médula ósea y dispara la migración, crecimiento y angiogénesis en células MM. Véase Podar, K., Tai, Y. T., Lin, B. K., Narsimhan, R. P., Sattler, M., Kijima, T., Salgia, R., Gupta, D., Chauhan, D. & Anderson, K. C. (2002) J Biol Chem 277, 7875-81; que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Así, si el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) altera la migración VEGF-inducida de células MM fue evaluado. La migración inducida por VEGF fue examinada en presencia o ausencia del compuesto (7 ó 10 nM). La migración celular fue analizada como se describe previamente en Podar, K., Tai, Y. T., Davies, F. E., Lentzsch, S., Sattler, M., Hideshima, T., Lin, B. K., Gupta, D., Shima, Y., Chauhan, D., Mitsiades, C., Raje, N., Richardson, P. & Anderson, K. C. (2001) Blood 98, 428-35; que es incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Como se muestra en Figura 8, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye significativamente ($P < 0.05$) la migración inducida por VEGF de células MM MM.1S. Estos hallazgos indican que el compuesto puede regular negativamente tanto el alojamiento de células MM a la médula ósea y su salida a la sangre periférica.

Ejemplo 10 - Efecto sobre efectos protectores moderados por Bcl2

Bcl2 confiere resistencia a terapias convencionales en células de cáncer, en las que se incluyen MM. Véase Cory, S. & Adams, J. M. (2002) Nat Rev Cancer 2, 647-56 y Gazitt, Y., Fey, V., Thomas, C. & Alvarez, R. (1998) Int J Oncol 13, 397-405; ambas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Bcl2 puede atenuar moderadamente la apoptosis inducida por bortezomib. Así, si la expresión ectópica de Bcl2 en células MM.1S afecta la sensibilidad al compuesto de fórmula (II) (X=Cl) fue evaluada. Células MM.1S fueron transfectadas de manera estable con constructo de Bcl2 y analizadas en cuanto a alteraciones en viabilidad celular utilizando un análisis de MTT. Como se ve en la figura 5, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye significativamente la viabilidad celular de células MM.1S transfectadas con Bcl2 ($P < 0.005$) de manera dependiente de la dosis. No obstante, el compuesto indujo $15 \pm 1.1\%$ menos muerte celular en células transfectadas con Bcl2 en comparación con células MM.1S vector-transfectadas vacías. Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de tres experimentos independientes. Estos hallazgos sugieren que el compuesto puede superar la protección moderada por Bcl2.

Ejemplo 11 - Evaluación in vivo en modelo de tumor murino

Ratones beige-desnudos-xid (BNX) inmuno-deficientes triples de seis semanas fueron obtenidos de Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MD). Todos los estudios de animales fueron conducidos de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Animales del Instituto de Cáncer de Dana-Farber. Los ratones fueron observados diariamente en cuanto a signos de toxicidad. La sangría terminal fue efectuada bajo anestesia utilizando inhalación de isoflourano y los animales fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂. Para determinar la actividad de anti-MM in vivo del compuesto de fórmula (II) (X=Cl), 21 ratones BNX fueron inoculados subcutáneamente en el flanco con 3x10⁷ células de MM RPMI 8226 en 100 µl de medio RPMI-1640. Cuando los tumores se hicieron mensurables, los ratones fueron asignados a grupos de tratamiento que reciben el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) 0.25 mg/kg (n = 7), 0.5 mg/kg (n = 7) o a grupos de control (n = 7) que reciben el vehículo solamente. El tratamiento con el fármaco fue iniciado después del desarrollo de tumor mensurable. El fármaco (0.25 mg/Kg o 0.5 mg/Kg) fue administrado oralmente dos veces a la semana. Mediciones de calibre seriales de diámetros perpendiculares fueron realizadas un día y un día no para calcular el volumen del tumor, utilizando la siguiente fórmula: $\frac{4}{24} \times (\text{diámetro más corto})^2 \times (\text{diámetro más largo})$. Los animales fueron sacrificados si el

tumor era > 2 cm o necrótico. Para estudios de crecimiento de tumor, 7 ratones fueron usados en cada grupo.

Como se ve en las figura 10A-C, el tratamiento de ratones que llevan tumor con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl), pero no con el vehículo solo, inhibe significativamente el crecimiento de tumor de MM y prolonga la supervivencia de estos ratones. Todos los ratones en el grupo de control desarrollaron tumores progresivos, mientras que se observó regresión completa de tumores en 70% de ratones tratados. El ratón en el panel superior de la figura 10B recibió dosis orales de vehículo solo, mientras que el ratón en el panel inferior recibió el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (0.25 mg/Kg). Los paneles izquierdos en la figura 10B son ampliaciones de plasmacitomas subcutáneos que crecen en los flancos derechos del ratón. La sobrevivencia fue evaluada a partir del primer día del tratamiento hasta la muerte; los ratones fueron sacrificados cuando sus diámetros de tumor llegaron a 2 cm o se volvieron moribundos (figura 10C). Además, no se observaron cambios en comportamiento neurológico aún después de 12 semanas de tratamiento. Las concentraciones de compuesto administrado fueron bien toleradas por ratones, sin evidencia de pérdida de peso. Los ratones tanto en el grupo sin tratar como en el grupo tratado fueron pesados cada semana. Los cambios promedios en el peso corporal de ratón son mostrados en la figura 10D.

El análisis al día 300 no mostró recurrencia del tumor en 57% de los ratones tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (figura 10C). Además, análisis histológicos efectuados sobre los sitios de inoculación confirmaron la desaparición de células de plasma en los ratones tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl)- contra ratones tratados con vehículo (figura 10E, paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Estos datos muestran que el compuesto fue oralmente activo; inhibe el crecimiento de tumor MM in vivo; y prolonga la sobrevivencia.

Ejemplo 12 - Análisis comparativo de actividad anti-tumor in vivo

Para comparar la actividad in vivo del compuesto de fórmula (II) y bortezomib, los modelos de ratones como se describe anteriormente fueron tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (0.15 mg/Kg i.v.) o bortezomib (1.0 mg/Kg i.v.) dos veces a la semana. Ambos agentes redujeron significativamente el avance del tumor ($p < 0.01$) y prolongaron la sobrevivencia ($p = 0.0137$) (figuras 10F y 10G).

Ejemplo 13 - Mecanismos que moderan la actividad anti-MM

La mitocondria juega un papel crítico en la inducción de apoptosis durante el esfuerzo. Véase Bossy-Wetzel, E. & Green, D. R. (1999) Mutat Res 434, 243-51 y Chauhan, D. &

Anderson, K. C. (2003) Apoptosis 8, 337-43; ambas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Células MM.1S deficientes de suero fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (7 nM) durante 12 horas e
5 incubadas con CMXRos por los últimos 20 minutos; teñidas con tinte catiónico lipofílico CMXRos (Mitotracker Red) (Molecular Probes, Eugene, OR) en solución salina de pH regulado de fosfato (PBS) durante 20 minutos a 37°C; y analizados mediante citometría de flujo para análisis en cuanto a alteraciones en
10 $\Delta\psi_m$ (potencial de membrana mitocondrial). La producción de superóxido (O_2^-) fue medida al teñir las células con tinte permeable a membrana dihidroetidio (HE) por los últimos 15 minutos. Los aniones de superóxido oxidan HE a etidio fluorescente, permitiendo el análisis mediante citometría de
15 flujo.

Como se ve en las figuras 11A y 11B, el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) disminuye $\Delta\psi_m$, como se hace evidente por un número incrementado de células negativas CMXRos ($P < 0.005$, $n = 2$), y dispara la producción de O_2^- en células MM.1S. Los
20 resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de dos experimentos independientes. Las alteraciones en $\Delta\psi_m$ están asociadas con la liberación de proteínas mitocondriales cito-c y Smac al citosol, disparando mediante esto la caspasa 9 y caspasa-3. Véase Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X.
25 (2000) Cell 102, 33-42 y Liu, X., Naekyung Kim, C., Yang, J.,

Jemmerson, R. & Wang, X. (1996) Cell 86, 147-157; ambas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

Como se ve en la figura 11C, el tratamiento de
5 células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) dispara una disminución en cito-c mitocondrial (panel superior izquierdo) y smac (panel superior derecho), y un incremento concurrente de estas proteínas en las fracciones citosólicas (paneles medio, izquierdo y derecho, respectivamente). La
10 prueba otra vez de las inmunoabsorciones con Abs anti-Hsp60 (panel inferior izquierdo) y anti-tubulina (panel inferior derecho) confirma la pureza de los extractos mitocondriales e igual carga de proteína. La liberación de proteínas apoptogénicas mitocondriales cito-c y Smac/DIABLO inducen la
15 activación de caspasas-9 y -3. Células MM.1S fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (7 nM) durante 24 horas y cosechadas; las fracciones de proteína mitocondriales y citosólicas fueron separadas mediante SDS-PAGE 12.5% y analizadas mediante prueba inmunológica con Abs anti-cito-c
20 (panel superior) o anti-Smac (panel medio). Como control para carga igual de proteínas y pureza de fracciones mitocondriales, los filtros también fueron vueltos a probar con Abs anti-tubulina (panel inferior derecho) y anti-Hsp60 (panel inferior izquierdo), respectivamente. Las inmunoabsorciones son
25 representativas de tres experimentos independientes.

Células MM.1S fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 24 horas y cosechadas; proteínas citosólicas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12.5% y analizadas mediante prueba inmunológica con Abs anti-caspasa-8 y Abs anti-caspasa-9. Como se ve en la figura 11D, el tratamiento de células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) induce la escisión proteolítica de caspasa-9. Además, el compuesto también activa caspasa-8 (figura 11E). Se sabe que tanto la caspasa-9 (dependiente de mitocondria) y caspasa-8 (independiente de mitocondria) se escinden proteolíticamente y activan un efector corriente abajo común caspasa-3, dando como resultado escisión de PARP. Véase Miller, L. K. (1999) Trends Cell Biol 9, 323-8; que es incorporada en la presente por referencia en su totalidad. Así, células Mm MM.1S o MM.1R fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 24 horas y determinadas en cuanto a apoptosis tanto mediante análisis de PARP y análisis de escisión de caspasa-3. Lisados de proteína total fueron sometidos a análisis de SDS-PAGE. El análisis de inmunoabsorción de los lisados se efectuó con Abs anti-PARP (panel superior) o anti-caspasa-3 (panel inferior). "FL" indica "plena longitud" y "CF" denota fragmento escindido. Estos datos muestran adicionalmente que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) dispara caspasa-3 y escisión de PARP (figura 11F).

El análisis de inmunoabsorción fue efectuado

utilizando anticuerpos a citocromo-c, Smac, Caspasa-8, -9 ó -3 (Cell Signaling, Beverly, MA), tubulina (Sigma, St. Louis, MO), PARP, Hsp60 o Bax (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA). Las inmunoabsorciones fueron desarrolladas mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL).

Ejemplo 14 - Diferencias de mecanismo de apoptosis de célula MM en comparación con bortezomib

10 Células MM.1S fueron tratadas con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib en presencia o ausencia de inhibidor de caspasa-9 (LEHD-FMK), inhibidor de caspasa-8 (IETD-fmk) o inhibidor de caspasa-3 (Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona, z-VAD-fmk). Como se ve en la figura 12A, la
15 inhibición de caspasa-3 abroga notablemente tanto la apoptosis inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) como la apoptosis inducida por bortezomib. Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de cuatro experimentos independientes ($P < 0.004$). El bloqueo de caspasa-8 condujo a una disminución
20 significativa en muerte celular disparada por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) ($P < 0.005$, $n = 4$), mientras que la inhibición de caspasa-9 bloqueó solo moderadamente la viabilidad disminuida en células MM.1S disparada por el compuesto, en contraste, la disminución inducida por bortezomib
25 en viabilidad de células MM.1S es igualmente bloqueada en

presencia ya sea de inhibidor de caspasa-8 o caspasa-9 ($P < 0.005$). Conjuntamente, estos datos sugieren que la activación de caspasa-8 y caspasa-9 contribuye igualmente durante la muerte celular disparada por bortezomib, mientras que apoptosis
5 disparada por el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) procede principalmente vía ruta de señalización de caspasa-8.

Estos datos bioquímicos fueron confirmados mediante estudios genéticos utilizando estrategias dominante-negativa (DN). Células MM.1S fueron también transfectadas
10 transitoriamente utiliza la línea celular Nucleofecto kit V, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amara Biosystems, Alemania), con vector solo, DN-caspasa-8, DN-caspasa-9 o DN-FADD y co-transfectadas con vector que contiene proteína fluorescente verde (GFP) sola. Enseguida de las transfecciones,
15 células GFP-positivas fueron seleccionadas mediante citometría de flujo, tratadas con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) o bortezomib, y analizadas en cuanto a viabilidad. El tratamiento de células MM DN-caspasa-8-transfectadas con el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (IC_{50} , 7 nM) incrementó notablemente la
20 sobrevivencia de estas células, en comparación con las células transfectadas con DN-caspasa-9 (figura 12B). En contraste, el tratamiento ya sea de células MM.1S DN-caspasa-8 o DN-caspasa-9-transfectadas con bortezomib (IC_{50} , 5 nM) incrementó la sobrevivencia a una extensión similar. La especificidad
25 funcional de DN-caspasa-8 y DN-caspasa-9 fue confirmada

mediante tratamiento de células MM.1S con inductores conocidos de caspasa-9 (Dex) y caspasa-8 en estas células (MoAb anti-Fas) (Chauhan et al., 1997) (figura 12C). Estos datos sugieren que (1) la apoptosis de célula MM inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) es predominantemente moderada por caspasa-8; y (2) la apoptosis inducida por bortezomib requiere tanto la activación de caspasa-8 y activación de caspasa-9.

Se determinó enseguida si la inhibición de una ruta de señalización corriente arriba que conduce a la activación de caspasa-8 afecta la respuesta al compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib. La proteína de dominio de muerte Fas-asociada (FADD) es una parte importante de los complejos de señalización inductores de muerte (DISC) que se ensamblan en el acoplamiento de miembros de familia de receptor de TNF, tales como Fas, dando como resultado procesamiento proteolítico y autoactivación de pro-caspasa-8. Puesto que tanto el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y bortezomib disparan la activación de caspasa-8, el papel de FADD durante este evento en células MM fue evaluado utilizando DN-FADD. El bloqueo de FADD con DN-FADD antenuó significativamente la citotoxicidad inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) en comparación con las células de MM.1S transfectadas con vector vacío (42% $\pm$ 2.0% de células viables en las células transfectadas por vector contra 76% $\pm$ 5.1% de células viables en células DN-FADD-transfectadas; $p < 0.05$) (figura 12D). DN-FADD disminuyó la activación de caspasa-

25

8 inducida por el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$); sin embargo, todavía se notó activación de caspasa-8 mínima (datos no mostrados), que puede ser debido a los activadores corriente arriba de caspasa-8 diferentes a FADD. Importantemente, el
5 tratamiento de células MM.1S DN-FADD-transfectadas con bortezomib dio como resultado solamente un incremento de 16% en sobrevivencia en comparación con células vector-transfectadas ($39\% \pm 2.4\%$ de células viables en células vector-transfectadas versus $55\% \pm 4.1\%$ de células viables en células DN-FADD-
10 transfectadas; $p < 0.05$) (figura 12D). Estos datos, acoplados con estudios de inhibición de caspasa-8 o caspasa-9, sugieren que el compuesto de fórmula (II) depende más del eje de señalización de FADD-caspasa-8 que bortezomib, confirmando
adicionalmente el mecanismo de acción diferencial del compuesto
15 de fórmula (II) contra bortezomib en células MM.

Estudios previos han establecido que Bax induce la ruta apoptótica mitocondrial. Véase Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. & Korsmeyer, S.
20 J. (2001) Science 292, 727-30 y Lei, K., Nimnual, A., Zong, W. X., Kennedy, N. J., Flavell, R. A., Thompson, C. B., Bar-Sagi, D. & Davis, R. J. (2002) Mol Cell Biol 22, 4929-42; ambas de las cuales son incorporadas en la presente por referencia en su totalidad. Así, se evaluó si la apoptosis de célula MM inducida
25 por el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) se correlaciona con

97

alteraciones en Bax. Célula MM MM.1S fueron tratadas ya sea con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib y extractos de proteína mitocondriales fueron sometidos a análisis de inmunoabsorción con Abs anti-Bax o anti-Hsp60. Como se ve en la
5 figura 12E, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) induce poco, si lo hay, incremento en los niveles de Bax en mitocondria. Las inmunoabsorciones son representativas de tres experimentos independientes. Importantemente, bortezomib dispara una acumulación significativa de Bax en mitocondria.

10 Fibroblasto embriónico de ratón (MEF) que portan Bax tipo silvestre o expulsiones fueron tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib durante 48 horas y analizados en cuanto a viabilidad celular mediante análisis de MTT. Como se ve en la figura 12F, el compuesto de fórmula (II)
15 (X=Cl) disminuye la viabilidad tanto en Bax (WT) como Bax (knock-out mientras la cancelación de Bax confiere resistencia significativa a bortezomib. Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de tres experimentos independientes ($P < 0.05$). Estos datos muestran el requerimiento diferencial de Bax
20 durante apoptosis inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y bortezomib y sugieren un mecanismo de acción distinto de estos agentes.

Ejemplo 15 - Efectos diferenciales sobre linfocitos normales en comparación con bortezomib

La terapia de bortezomib está asociada con toxicidad en pacientes. Así, los efectos del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y bortezomib sobre células normales fueron comparados. Linfocitos de cinco donadores saludables fueron tratados con varias concentraciones (0-20 nM) del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib (0-20 nM) durante 72 horas y analizados en cuanto a citotoxicidad mediante un análisis de MTT. Como se ve en la figura 13, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) no disminuye significativamente la sobrevivencia de linfocitos normales ($P = 0.27$ de la prueba de tendencia J-T), aún a dosis más altas (20 nM). Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de tres experimentos independientes. En contraste, bortezomib disminuye significativamente la viabilidad de linfocitos aún a concentraciones más bajas de 6-10 nM. De notarse, IC_{50} de células MM de pacientes se alcanza a concentraciones del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) que no tiene ningún efecto sobre linfocitos normales, mientras que IC_{50} de bortezomib para células MM dispara 50% de disminución en viabilidad de linfocitos normales. Conjuntamente, estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) tiene actividad anti-MM selectiva y particularmente, es menos tóxico a células normales que bortezomib.

También se examinó si el compuesto de fórmula (II) o

bortezomib altera la actividad de proteosoma en linfocitos normales y fibroblastos de piel. Tanto el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) como bortezomib inhibieron significativamente la actividad de proteosoma en estas células: 20 nM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o bortezomib dispararon 99% o $59 \pm 11\%$ de inhibición de actividad de proteosoma semejante a quimiotripsina, respectivamente (datos no mostrados). Así, aunque 20 nM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) no disparan citotoxicidad significativa en linfocitos normales, reduce la actividad de proteosoma semejante a quimiotripsina en estas células. Similarmente, el tratamiento de fibroblastos de CCD-27sk normales a la IC_{50} para el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (317 nM) o bortezomib (15 nM) también inhibe la actividad de proteosoma (datos no mostrados).

15

Ejemplo 16 - Efectos diferenciales sobre células MM que sobreexpresan Bcl-2 en comparación con bortezomib

Durante la apoptosis Bax neutraliza la función antiapoptótica de Bcl-2, facilitando mediante esto la liberación de cito-c y activación de caspasa-9 activación. Bcl-2 también confiere resistencia al fármaco en células de cáncer, incluyendo MM, y proporciona protección parcial contra muerte inducida por bortezomib. Por consiguiente, se evalúa si la expresión ectópica de Bcl-2 en células MM.1S afecta la habilidad del compuesto de fórmula (II) o bortezomib para

25

disparar la citotoxicidad y señalización apoptótica post-mitocondrial en células MM. La sobreexpresión de Bcl-2 promovió un incremento moderado en viabilidad de células tratadas con ambos agentes: para el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$), $50\% \pm 2.6\%$ de viabilidad en células transfectadas con Bcl-2 contra $39\% \pm 1.5\%$ de viabilidad en células transfectadas con vector ($p < 0.05$); y para bortezomib, $61\% \pm 2.9\%$ de viabilidad en células transfectadas con Bcl-2 contra $40\% \pm 2.1\%$ de viabilidad en células transfectadas con vector ($p < 0.05$) (figura 14A). La sobrevivencia incrementada de transfectados con Bcl-2 en respuesta a bortezomib fue mayor (21%) que en respuesta al compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) (11%) ($p < 0.04$; $n = 3$) (figura 14A). Además, bortezomib disparó la escisión de caspasa-9 significativa en células transfectadas con vector de control, que es atenuada notablemente (disminución de 3 veces mediante densitometría) en células transfectadas con Bcl-2; en contraste, la escisión de caspasa-9 inducida por el compuesto de fórmula (II) ($X=Cl$) es afectada mínimamente por la sobreexpresión de Bcl-2 (figura 14B). Estos hallazgos, junto con los resultados de viabilidad, sugieren que Bcl-2 proporciona más protección contra bortezomib que el compuesto de fórmula (II).

Ejemplo 17 - Tratamiento de combinación ✓

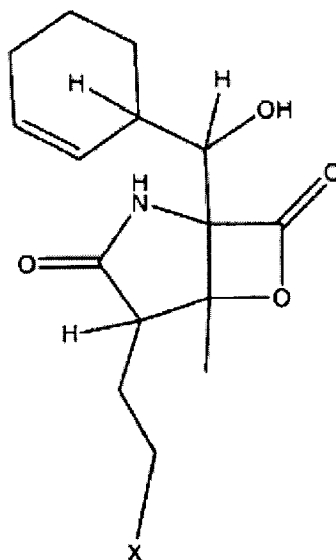
Como se ve en la figura 15, el tratamiento de células MM MM.1S o MM.1R MM con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) en combinación con bortezomib durante 24 horas induce la inhibición de crecimiento sinérgico. Los resultados son la media $\pm$ Desviación Estándar de tres experimentos independientes ($P < 0.005$). La interacción entre agentes anti-MM de fórmula (II) (X=Cl) y bortezomib fue analizada utilizando análisis de isoblograma con el programa de elementos de programación "CalcuSyn" (Biosoft, Ferguson, MO y Cambridge, UK). Los datos de análisis de viabilidad celular (MTT) fueron expresados como fracción de células con crecimiento afectado (FA) en células tratadas con fármaco contra células sin tratar. El programa CalcuSyn está basado en el método de Chou-Talalay de acuerdo con la siguiente ecuación: $CI = (D)1/(Dx)1 + (D)2/(Dx)2 + (D)1(D)2/(Dx)1(Dx)2$, en donde (D)1 y (D)2 son las dosis del fármaco 1 y fármaco 2 que tiene x efecto cuando son usados en combinación; y (Dx)1 y (Dx)2 son las dosis del fármaco 1 y fármaco 2 que tienen el mismo efecto x cuando son usados solos. Cuando $CI = 1$, esta ecuación representa el isoblograma de conservación e indica efectos aditivos. Los valores de CI de < 1.0 indican sinérgico. Un índice de combinación (CI) de < 1.0 fue obtenido para bortezomib + NPI-0052, indicando sinérgico. Además, se observó actividad anti-MM máxima cuando son dados concomitantemente, en lugar de otros horarios de tratamiento.

Las bajas dosis del compuesto de formal (II) (X=Cl) y bortezomib combinados no afecta significativamente la viabilidad de PBMNC normales (datos no mostrados). La terapia de combinación con bortezomib y el compuesto de fórmula (II) 5 (X=Cl) por consiguiente pueden: (1) permitir el uso de concentraciones sub-tóxicas de cada agente; (2) retardar o impedir el desarrollo de resistencia al fármaco; y (3) permitir el escalamiento de dosis sinérgicas de estos agentes para incrementar el umbral apoptótico.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, caracterizado porque comprende:

administrar a un paciente inflingido con la enfermedad neoplásica un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo:



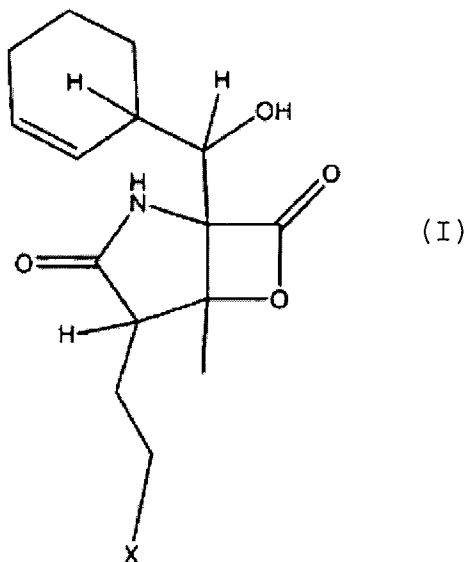
(I)

en donde X es seleccionado del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo o yodo, y

en donde la enfermedad neoplásica es susceptible a resistencia a por lo menos otro agente quimioterapéutico.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque X es cloro.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) tiene la estructura de fórmula (II):



5

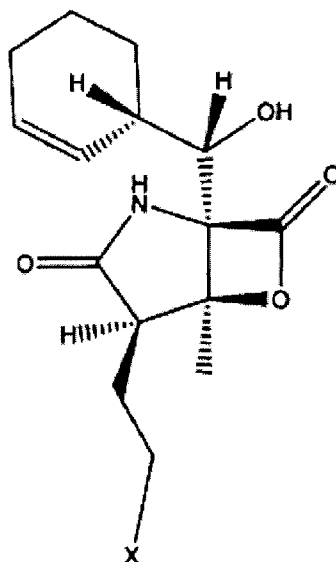
10 en donde X es seleccionado del grupo que consiste de
flúor, cloro, bromo o yodo, en combinación con por lo menos un
agente quimioterapéutico adicional.

13. El método de conformidad con la reivindicación
12, caracterizado porque X es cloro.

15 14. El método de conformidad con la reivindicación
12, caracterizado porque el compuesto de fórmula (I) tiene la
estructura de fórmula (II):

20

25



(II)

15. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la enfermedad neoplásica es cáncer.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el cáncer es seleccionado del grupo que consiste de cáncer de pecho, sarcoma, leucemia, cáncer de ovarios, cáncer de uretra, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer de cerebro o sistema nervioso central (CNS).

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el cáncer es seleccionado del grupo que consiste de mieloma múltiple, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de pecho, carcinoma de

pulmón de célula no pequeña y carcinoma de ovario o melanoma.

18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el cáncer es un mieloma múltiple.

19. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el paciente es un humano.

20. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el otro agente quimioterapéutico es seleccionado del grupo que consiste de dexametasona, doxorubicina y talidomida.

21. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el otro agente quimioterapéutico es un inhibidor de proteosoma.

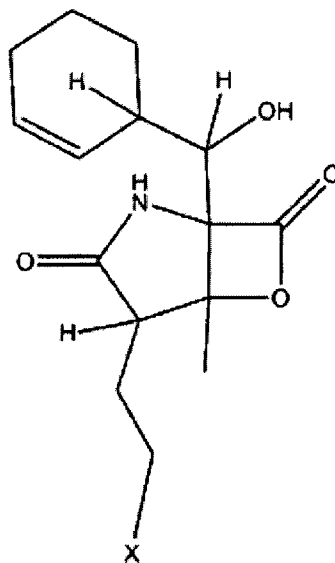
22. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el otro agente quimioterapéutico es bortezomib.

23. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la combinación es sinérgica.

24. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la combinación es aditiva.

25. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende:

un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable farmacéuticamente del mismo:



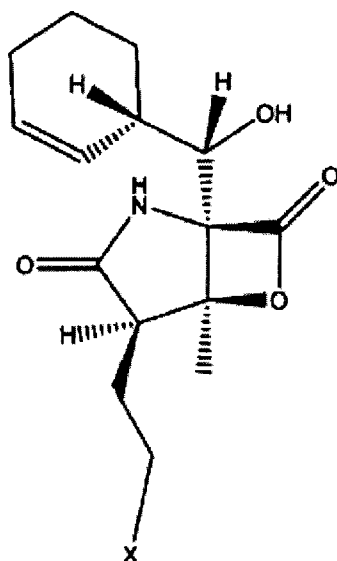
(I)

en donde X es seleccionado del grupo que consiste de flúor, cloro, bromo o yodo; y

por lo menos un agente quimioterapéutico adicional.

26. La composición de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque X es cloro.

27. La composición de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque el compuesto de fórmula (I) tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

28. La composición de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque el otro agente quimioterapéutico es seleccionado del grupo que consiste de dexametasona, doxorubicina y talidomida.

29. La composición de conformidad con la reivindicación 25, caracterizada porque el otro agente quimioterapéutico es un inhibidor de proteosoma.

30. La composición de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque el otro agente quimioterapéutico is bortezomib.

31. Un método para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, caracterizado porque comprende administrar a un paciente inflingido con la enfermedad neoplásica una combinación sinérgica de por lo menos dos inhibidores de proteosoma.

32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la enfermedad neoplásica es cáncer.

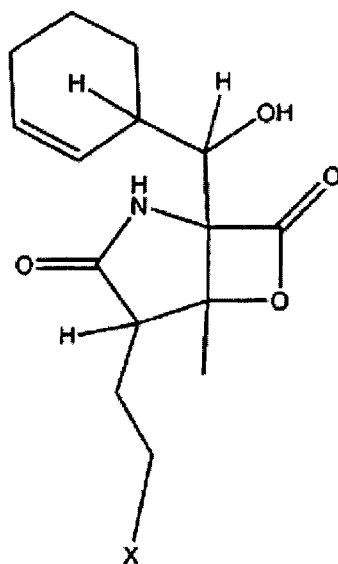
33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el cáncer es seleccionado del grupo
5 que consiste de cáncer de pecho, sarcoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer de uretra, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel,
10 melanoma, angioma y cáncer de cerebro o sistema nervioso central (CNS).

34. El método de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque el cáncer es seleccionado del grupo que consiste de mieloma múltiple, carcinoma colorrectal,
15 carcinoma de próstata, adenocarcinoma de pecho, carcinoma de pulmón de célula no pequeña y carcinoma de ovario o melanoma.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el cáncer es un mieloma múltiple.

36. El método de conformidad con la reivindicación
20 31, caracterizado porque el paciente es un humano.

37. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque por lo menos uno de los inhibidores de proteosoma es seleccionado del grupo que consiste de bortezomib y el compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco aceptable
25 farmacéuticamente del mismo:



(I)

en donde X es seleccionado del grupo que consiste de
flúor, cloro, bromo o yodo.

FIG 1

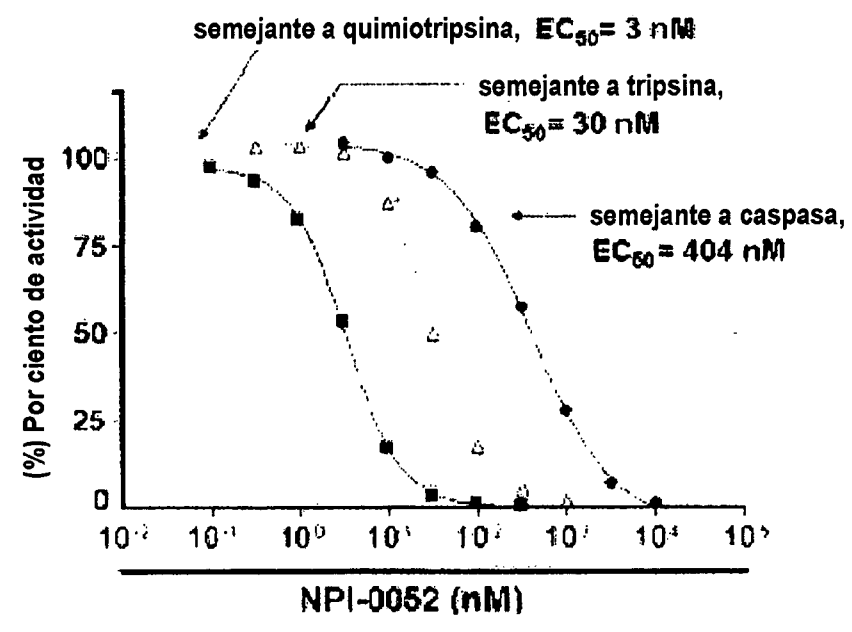


FIG 2

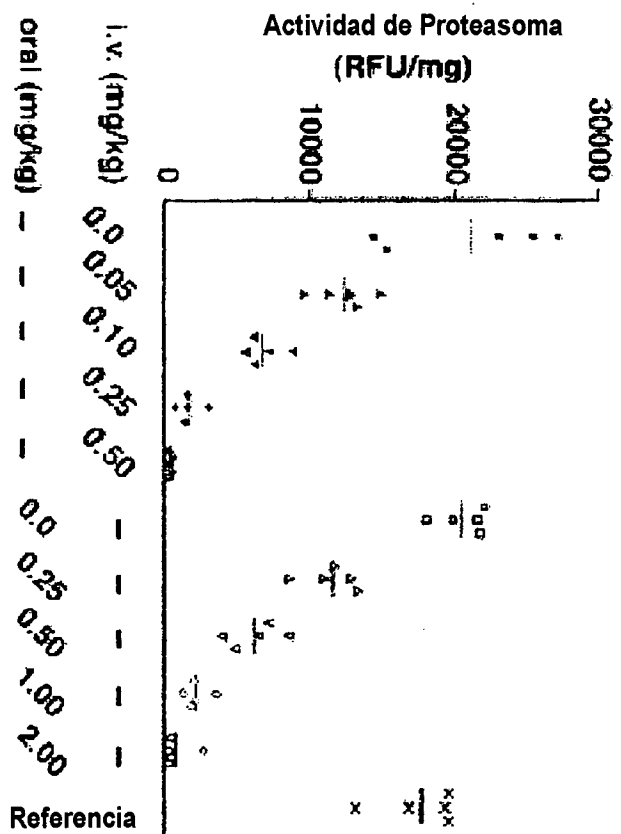


FIG 3

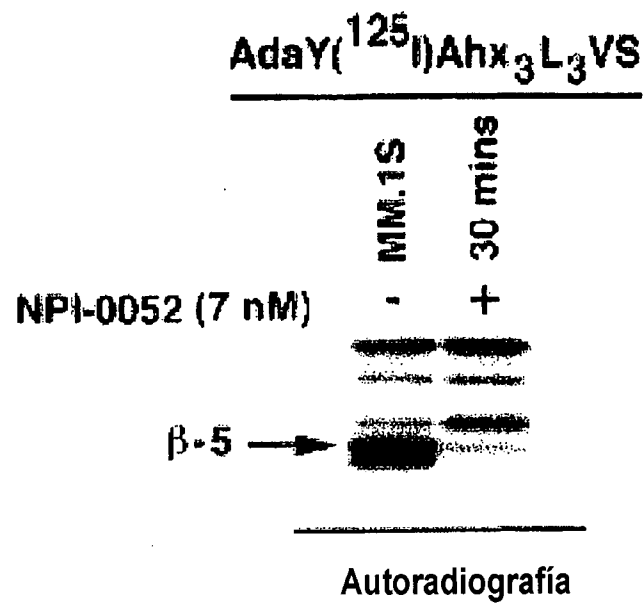


FIG 4

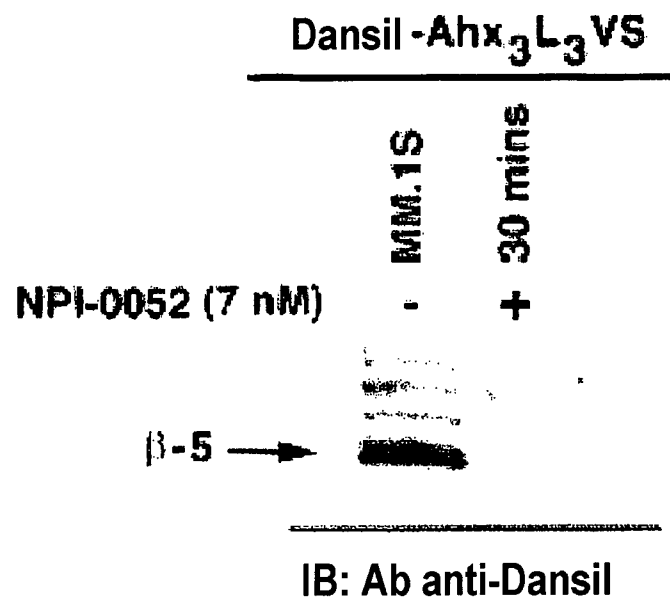


FIG 5A

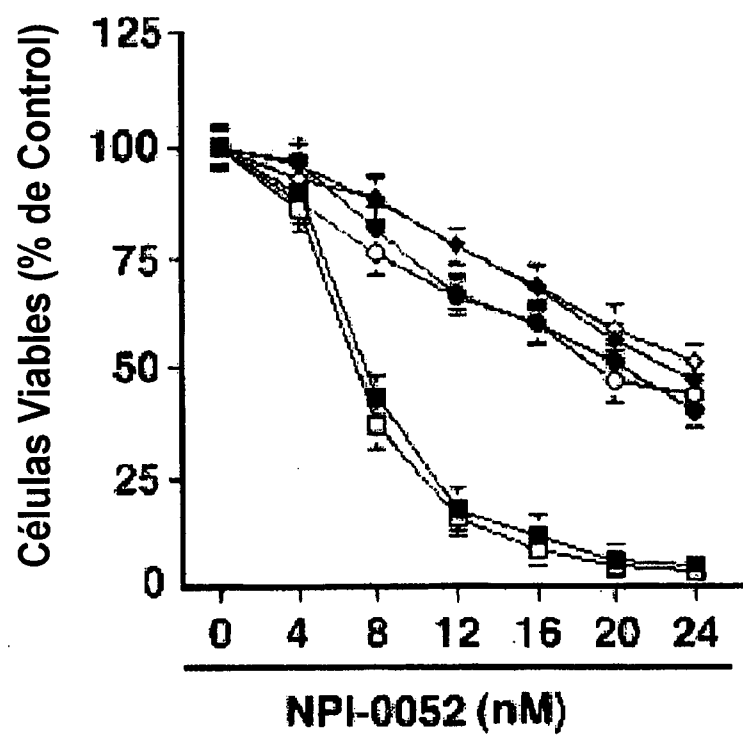


FIG 5B

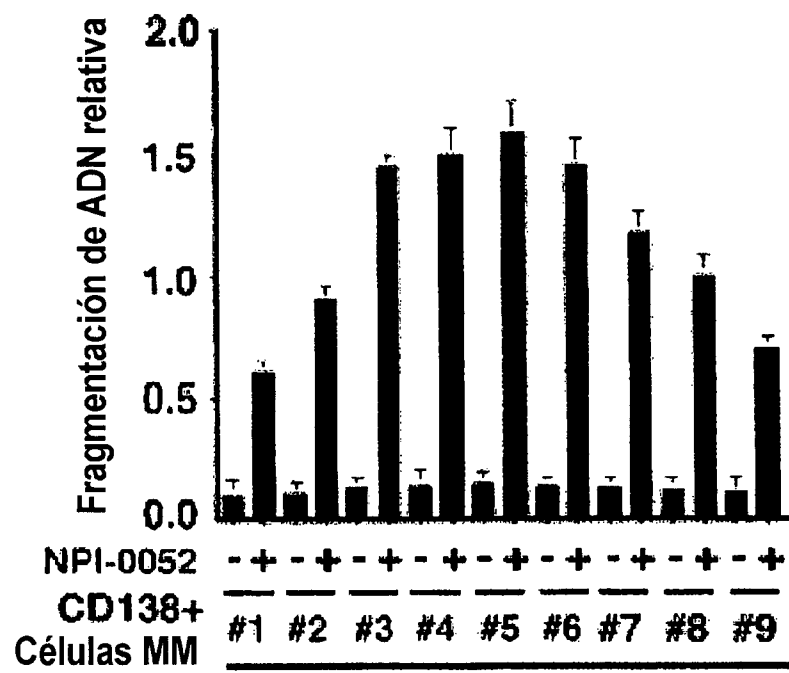


FIG 6

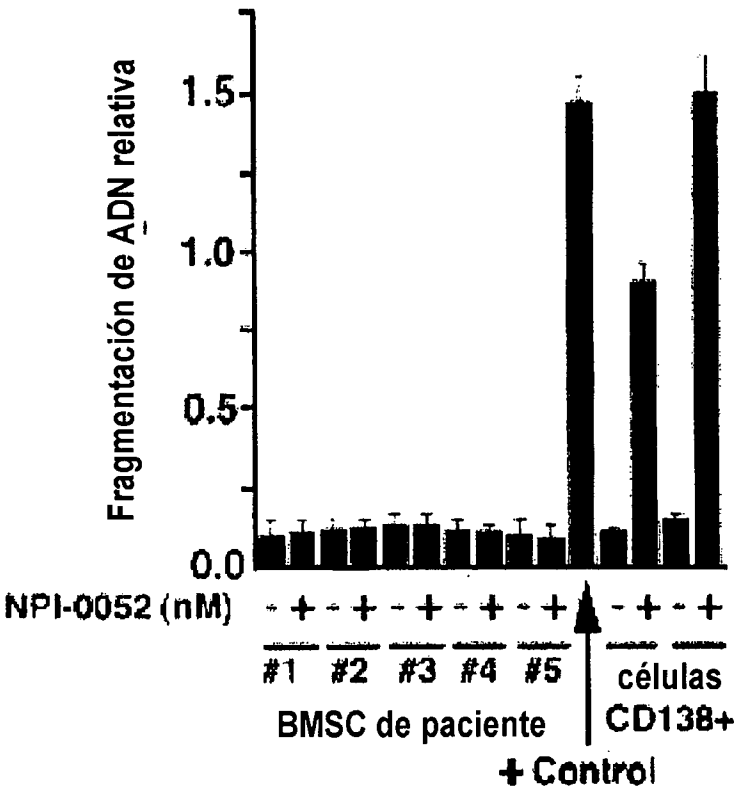


FIG 7

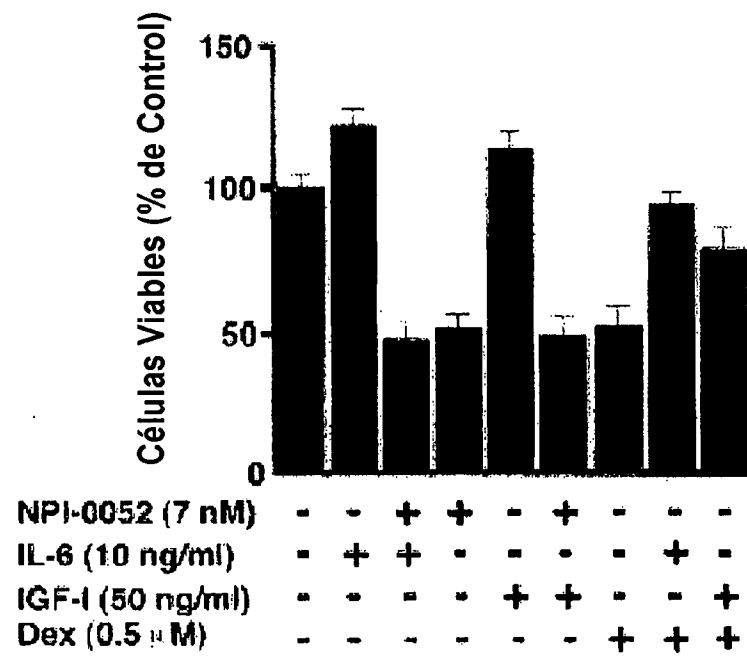


FIG 8

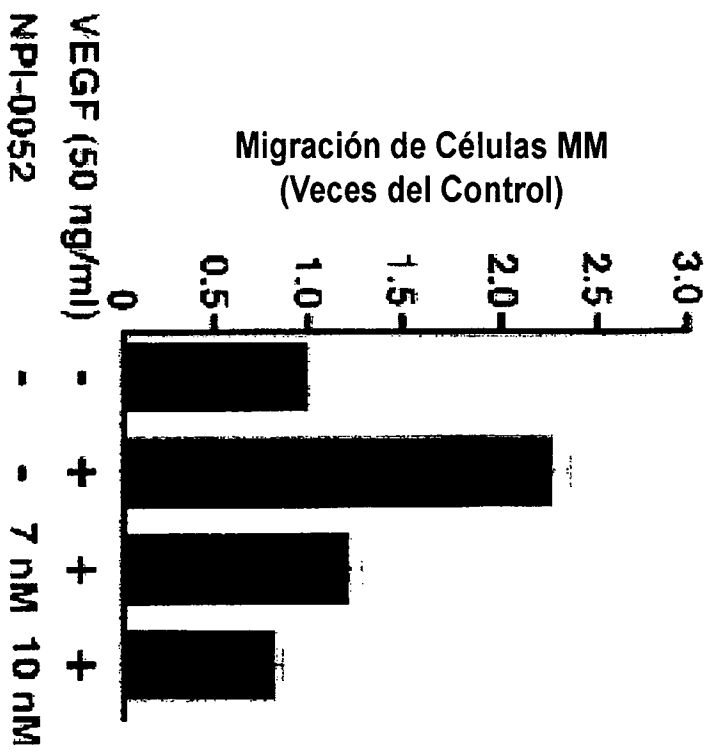


FIG 9

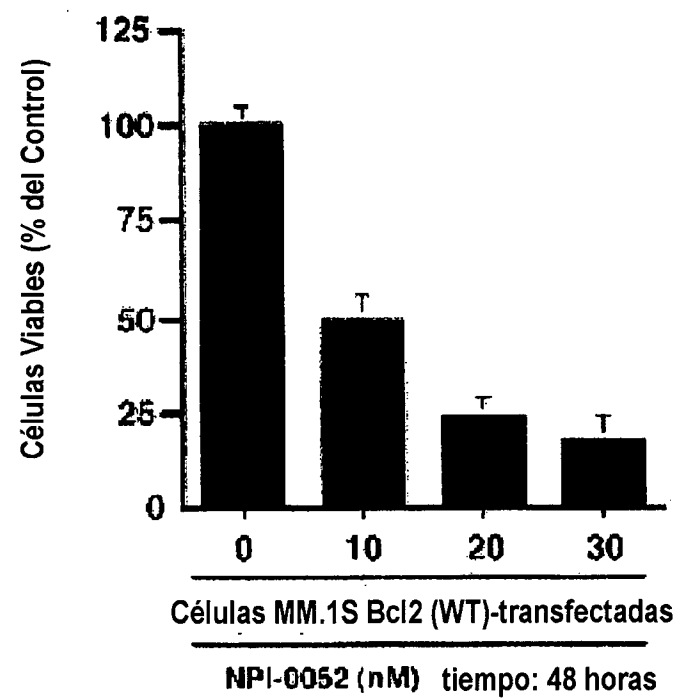


FIG 10A

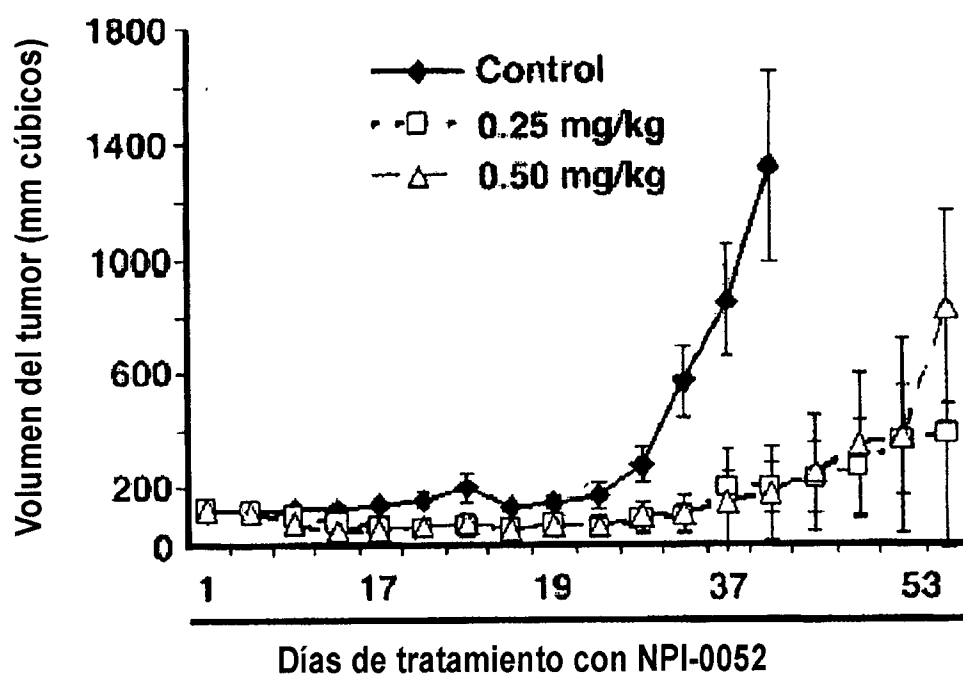
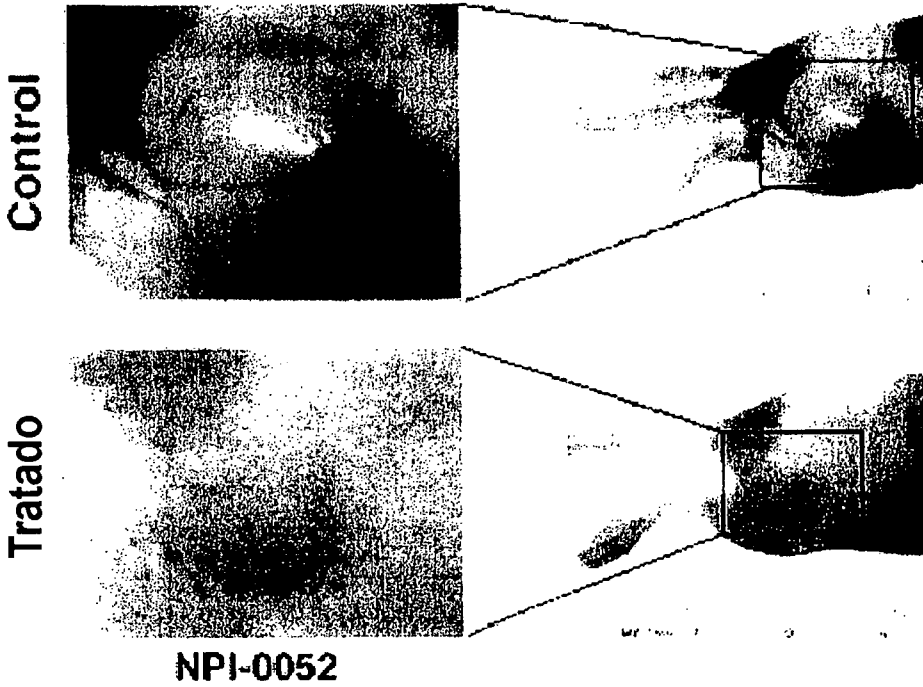
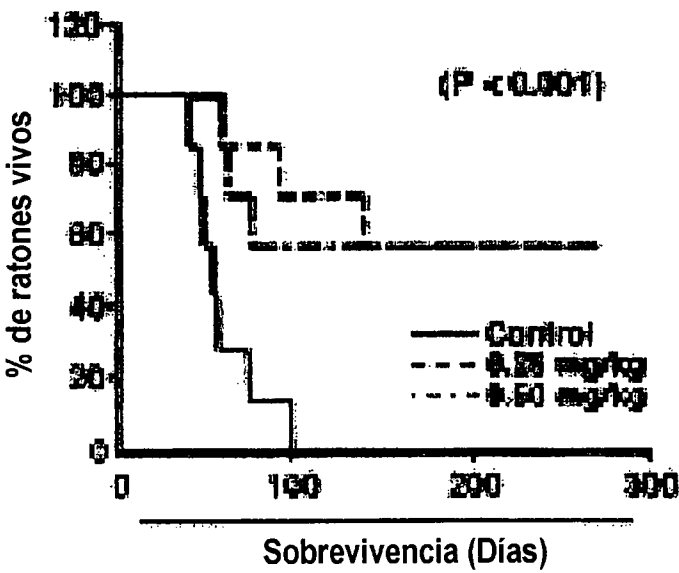


FIG 10B



125

FIG 10C



126

FIG 10D

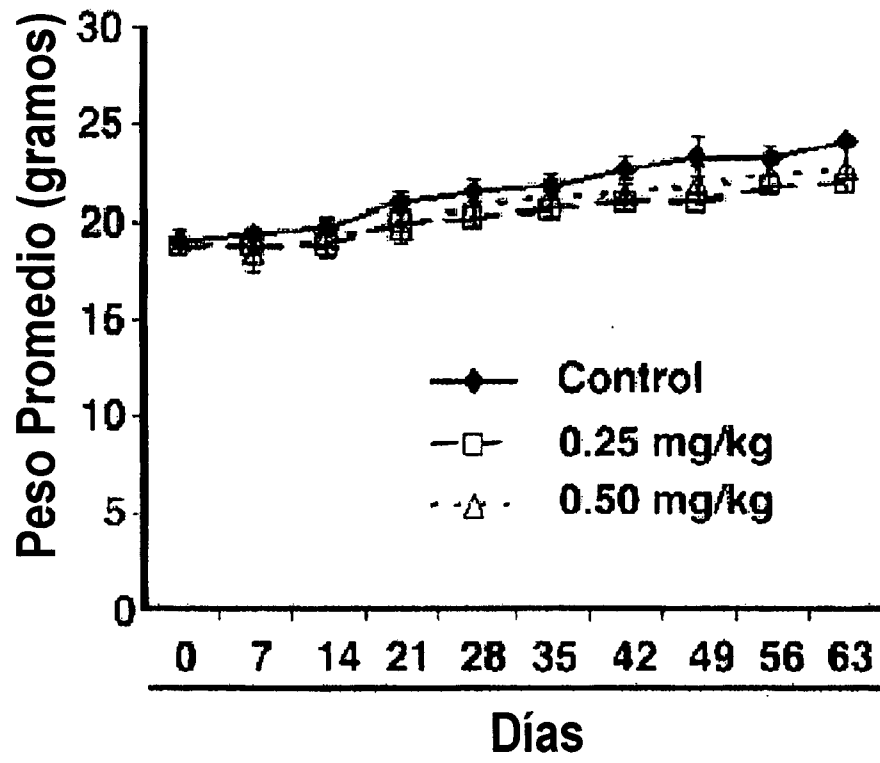


FIG 10E

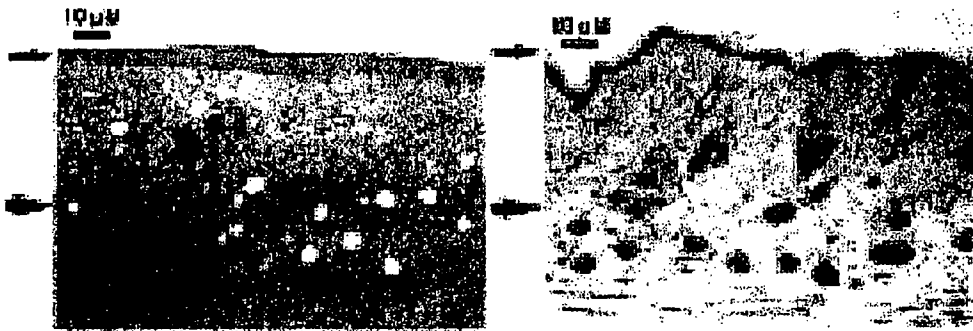


FIG 10F

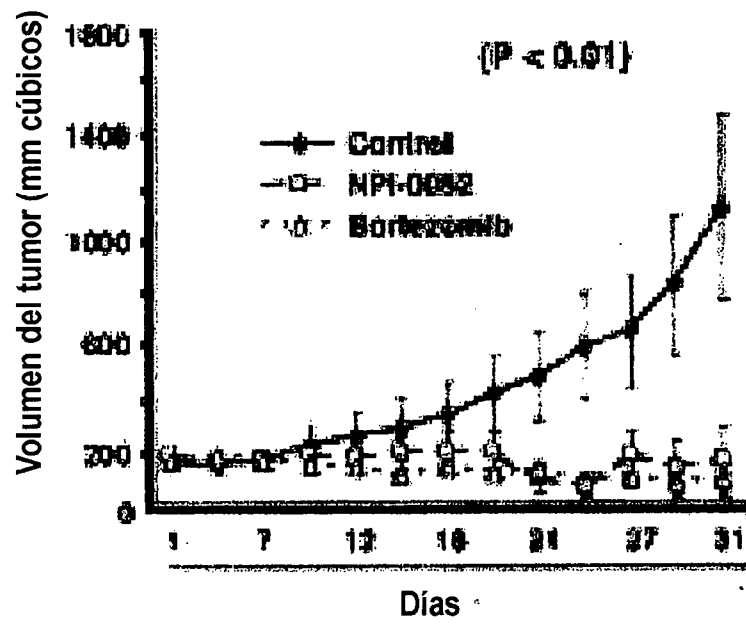


FIG 10G

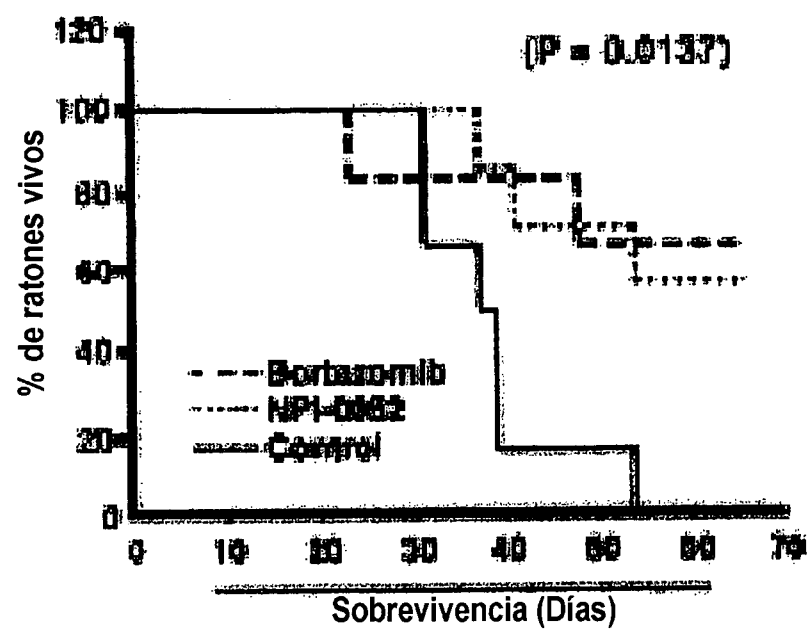


FIG 11A

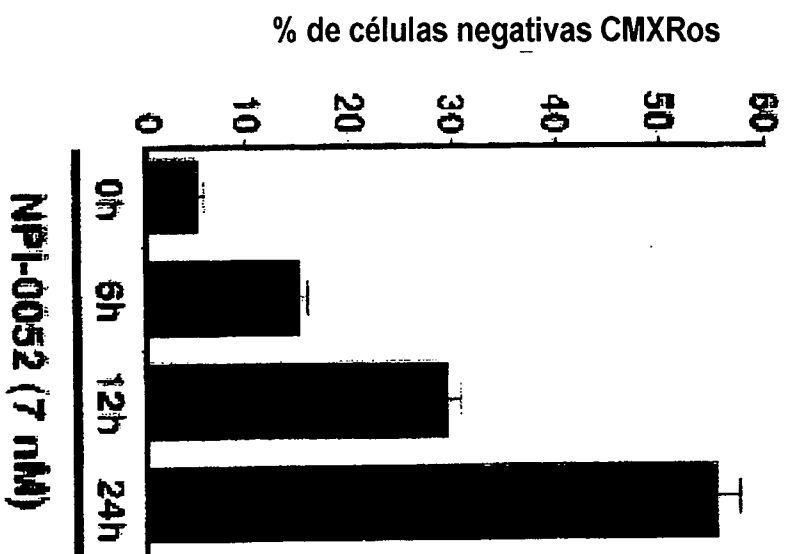


FIG 11B

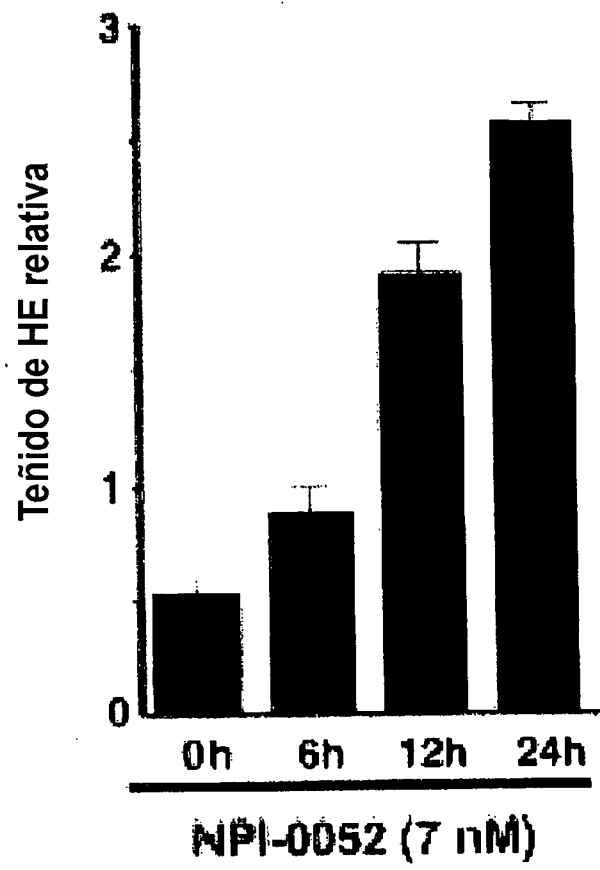


FIG 11C

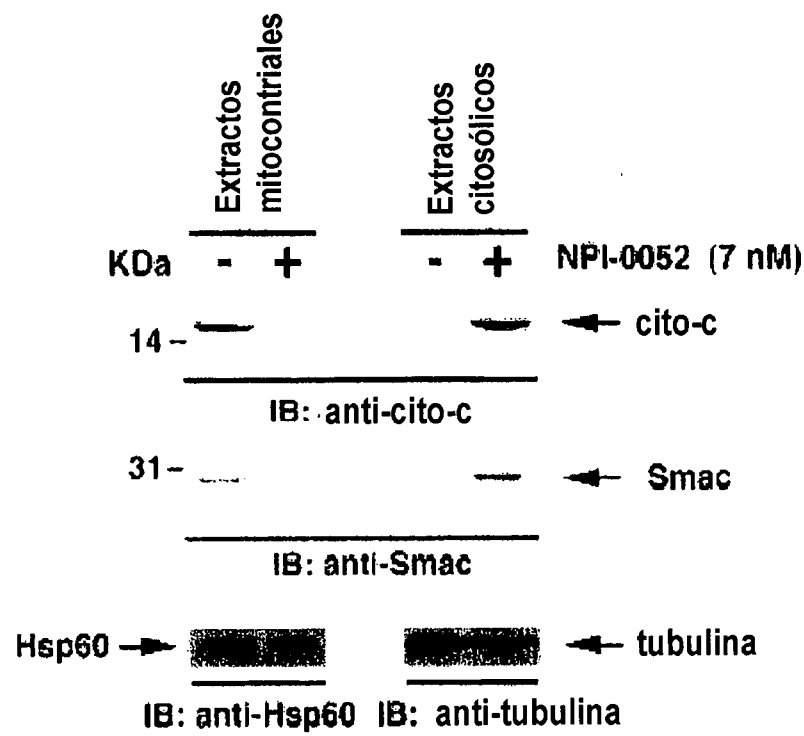


FIG 11D

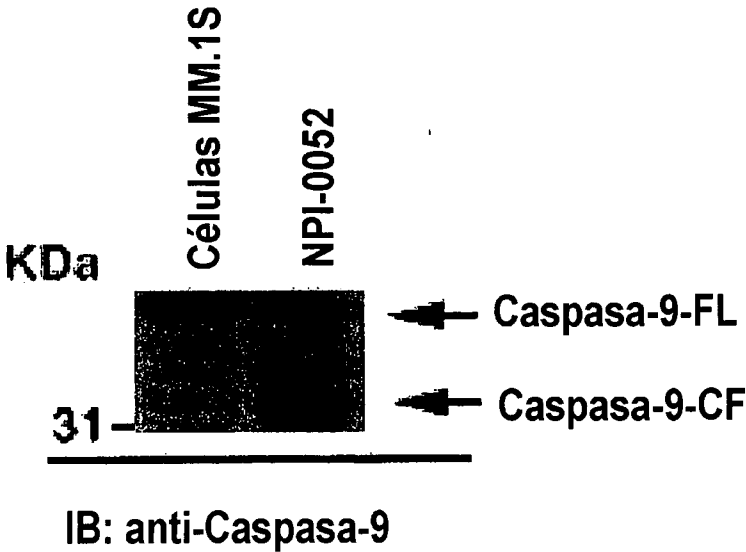


FIG 11E

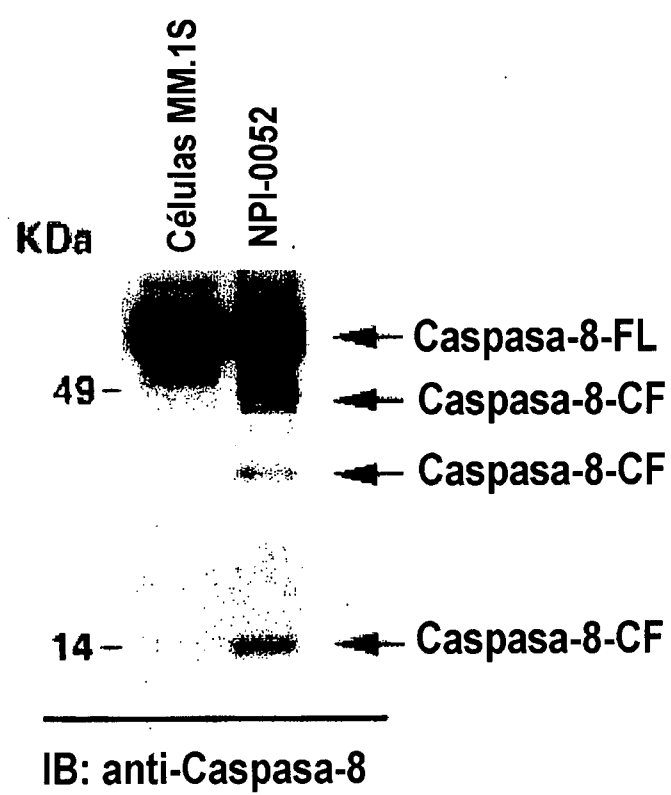


FIG 11F

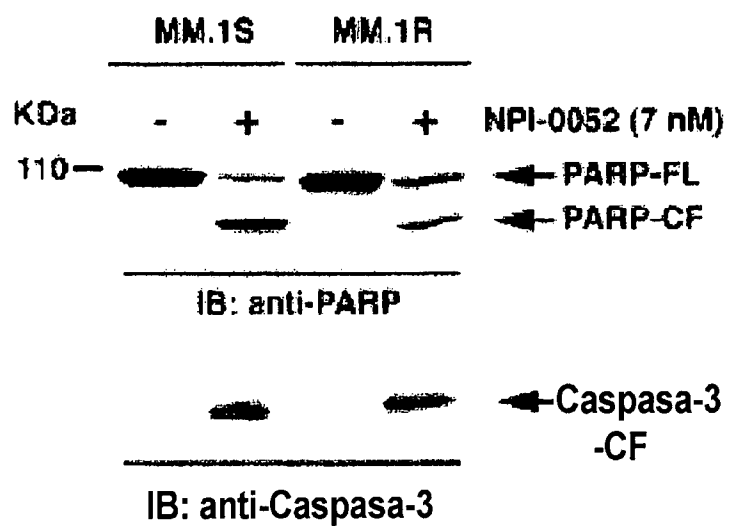


FIG 12A

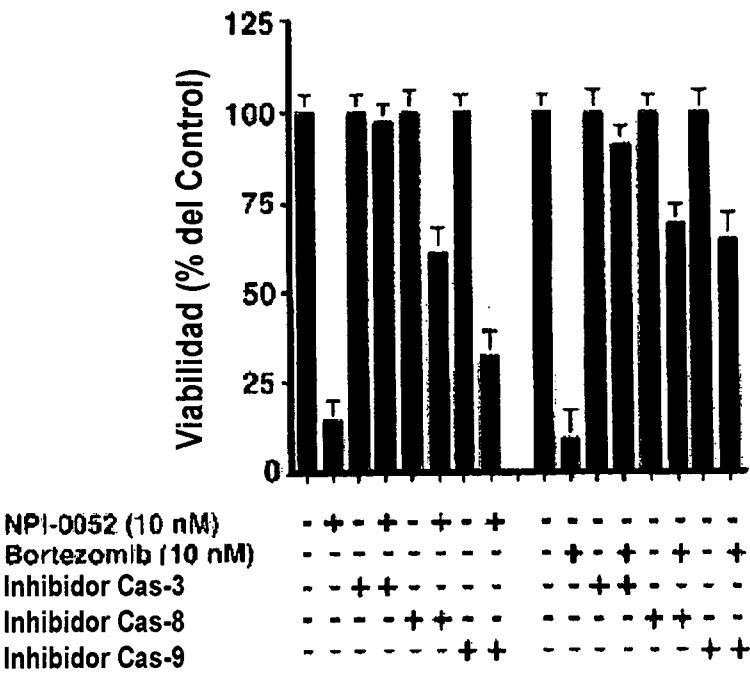


FIG 12B

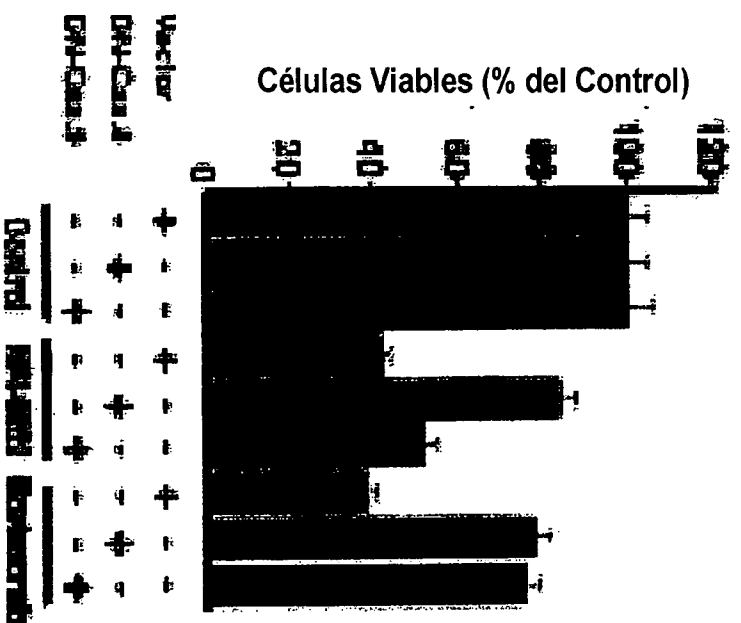


FIG 12C

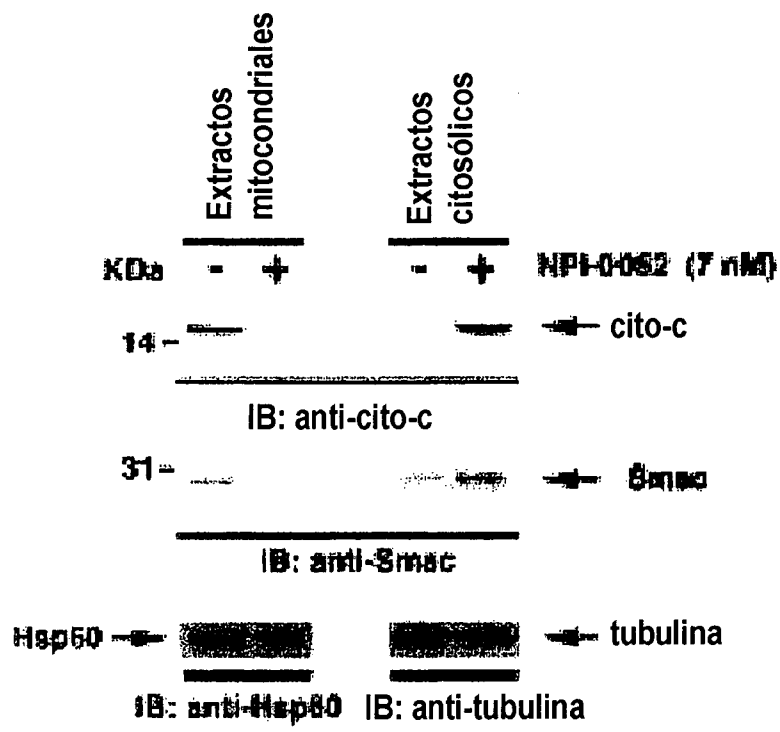


FIG 12D

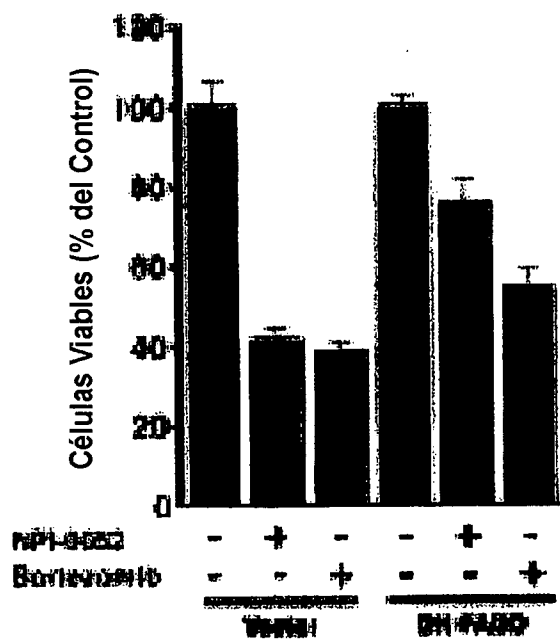


FIG 12E

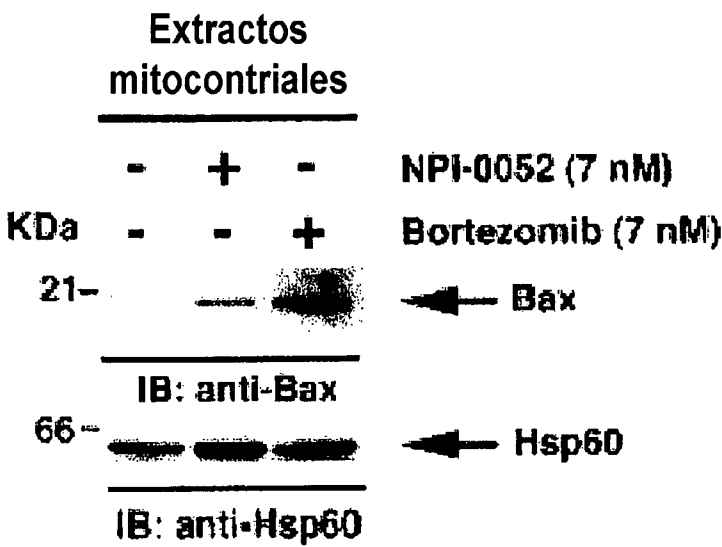
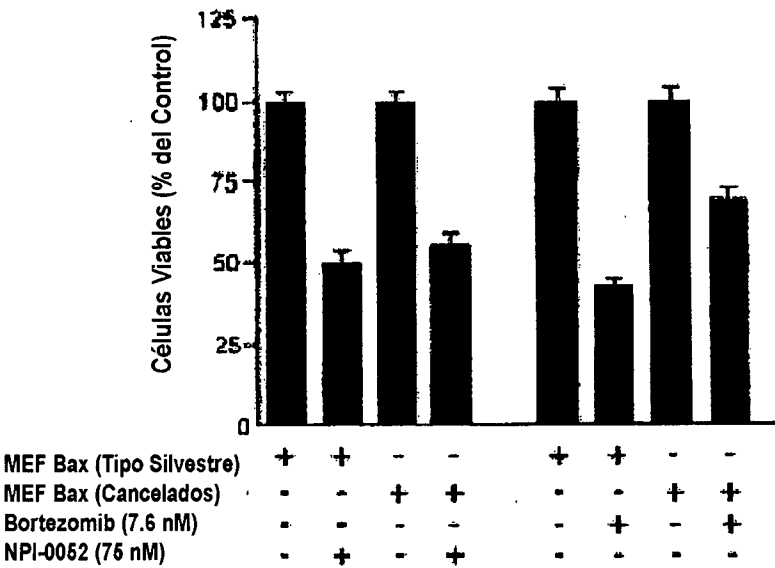
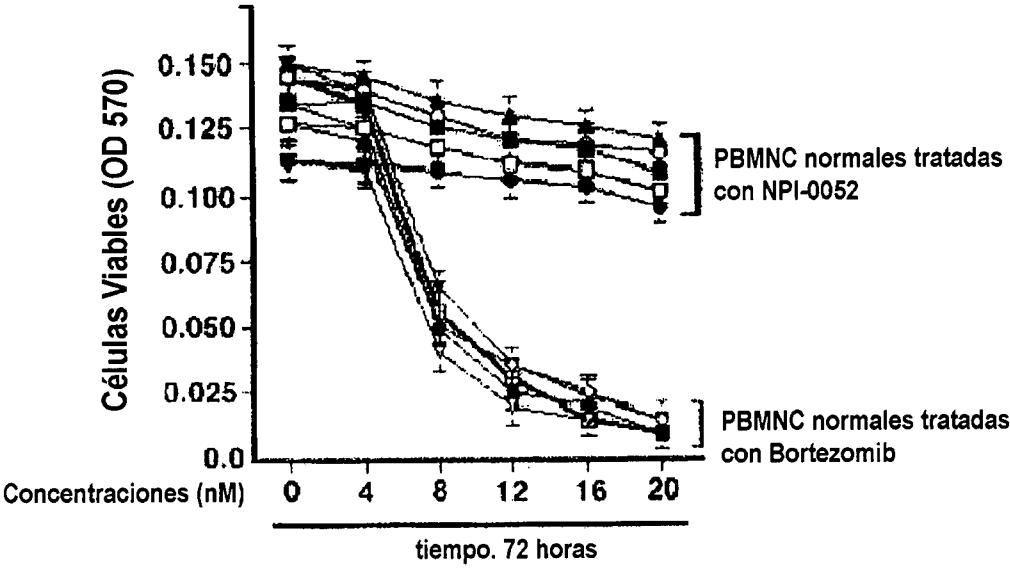


FIG . 12F



141

FIG 13



143

FIG 14A

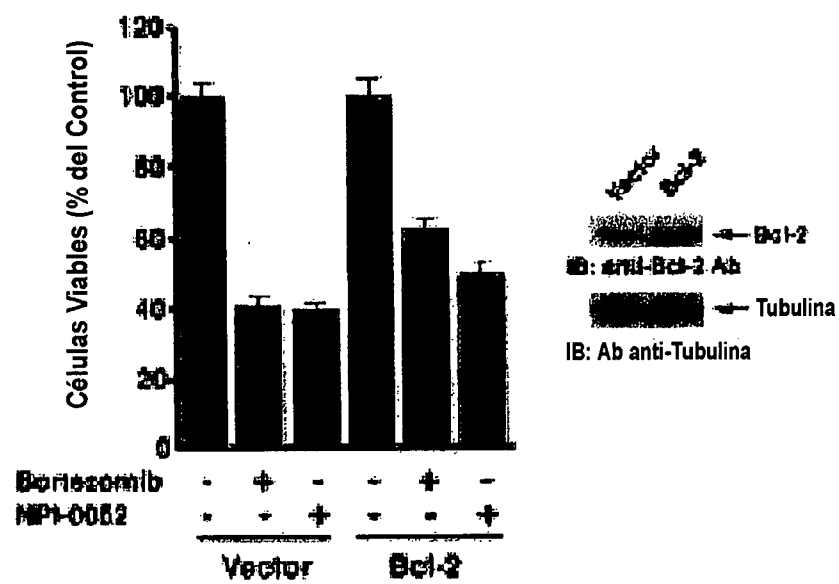


FIG 14B

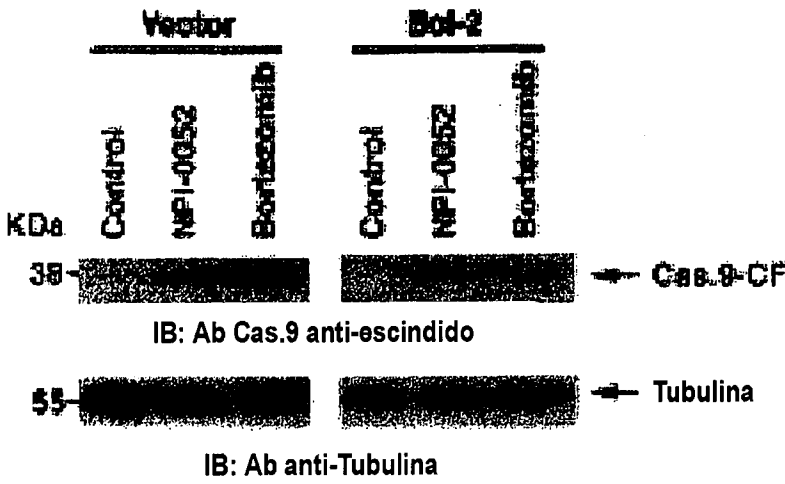


FIG 15

