



Organization y
Digitalización CSA Ltda

QA

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

DELEGATURA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

DELEGATURA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-55953

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "METODOS DE SENSIBILIZACION DE
CANCER A CITOTOXICIDAD INDUCIDA
POR TERAPIA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K31

71. SOLICITANTE 1) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
2) NEREUS PHARMACEUTICALS

DOMICILIO 1) OAKLAND, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2) SAN DIEGO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CANACHO
COD 4134

22. BOGOTÁ, D. C., 3 DE JUNIO / 2008

94

SS



No. 08-055953- -00000-0000

Fecha: 2008-06-03 15:30:13 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 135

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I Capítulo II

SOLICITANTE Nombre y 1) **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA**
(71) Dirección: **1111 Franklin Street, 12th Floor**
OAKLAND, CALIFORNIA 94607, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2) **NEREUS PHARMACEUTICALS**
10480 Wateridge Circle
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
Lugar de
constitución: 1) **OAKLAND, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
2) **SAN DIEGO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

REPRESENTANTE Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. No. **17'192.062**
(74) Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES): Nombre y 1.- **Benjamin BONAVIDA**
(72) Dirección: **3232 MIDVALE AVE.**
LOS ANGELES, CALIFORNIA 90034, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.- **Michael PALLADINO**
3357 Fortuna Ranch Road
ENCINITAS, CALIFORNIA 92024, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2006/043277** Fecha **6 DE NOVIEMBRE DE 2006**
Publicación Internacional No. **WO 2007/056335** Fecha **18 DE MAYO DE 2007**

© TÍTULO (54) "MÉTODOS DE SENSIBILIZACIÓN DE CÁNCER A CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TERAPIA"

Clasificación Internacional (51) **A61K 31/407**

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	4 DE NOVIEMBRE DE 2005	60/733,965
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	28 DE AGOSTO DE 2006	60/840,811

Comprobante de pago No. **08-34,344** Fecha: **29 DE ABRIL DE 2008**

Eap-

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: 1) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
2) NEREUS PHARMACEUTICALS
(30) PRIORIDAD: ESTADOUNIDENSE
(31) No. DE SOLICITUD: 60/733,965 (72) INVENTORES: Benjamin BONAVIDA
60/840,811 Michael PALLADINO
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 4 DE NOVIEMBRE DE 2005
28 DE AGOSTO DE 2006
(33) País: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA (74) APODERADO: Humberto RUBIO CAMACHO

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/043277 Fecha 6 DE NOVIEMBRE DE 2006

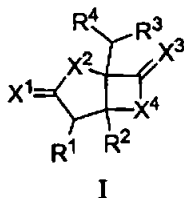
Publicación Internacional No. WO 2007/056335 Fecha 18 DE MAYO DE 2007

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "MÉTODOS DE SENSIBILIZACIÓN DE CÁNCER A CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TERAPIA"

RESUMEN:

Un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo para terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Fórmula I:

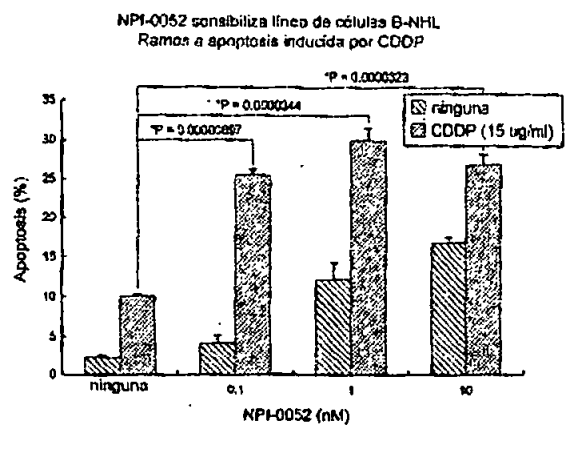


en donde cada uno de R¹, R² y R³ independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfurilo; R⁴ es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵ o un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵; cada R⁵ independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X¹, X², X³ y X⁴ se elige del grupo que consiste de: O, NR⁶ y S; y R⁶ es H o C₁-C₆ alquilo.

ANEXOS

- X 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.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional.
Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
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.
De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- X Arte final 12 x 12
De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros Documentos Anexos

Figura característica:



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1- Opinión escrita de la Autoridad encargada del Informe de Búsqueda Internacional**
- 2- Informe Preliminar Internacional de Patentabilidad Cap I . (Form PCT/IB/373)**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 34,344
FECHA : ABRIL 29 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055953- -00000-0000

Fecha: 2008-06-03 15:30:13 Dep 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 135

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	678716	29/04/2008	971,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SOM: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2007 (18.05.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/056335 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 31/43 (2006.01)

90034 (US). PALLADINO, Michael [US/US]; 3357 FOR-
TUNA RANCH ROAD, Encinitas, CA 92024 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/043277

(74) Agents: PARENT, Annette S. et al.; TOWNSEND AND
TOWNSEND AND CREW LLP, TWO EMBARCADERO
CENTER, 8TH FLOOR, San Francisco, CA 94111 (US).

(22) International Filing Date:
6 November 2006 (06.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/733,965 4 November 2005 (04.11.2005) US
60/840,811 28 August 2006 (28.08.2006) 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SM, SV, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicants (for all designated States except US): THE
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
[US/US]; 1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR,
Oakland, CA 94607 (US). NEREUS PHARMACEU-
TICALS [US/US]; 10480 WATERIDGE CIRCLE, San
Diego, CA 92121 (US).

(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, LI, 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).

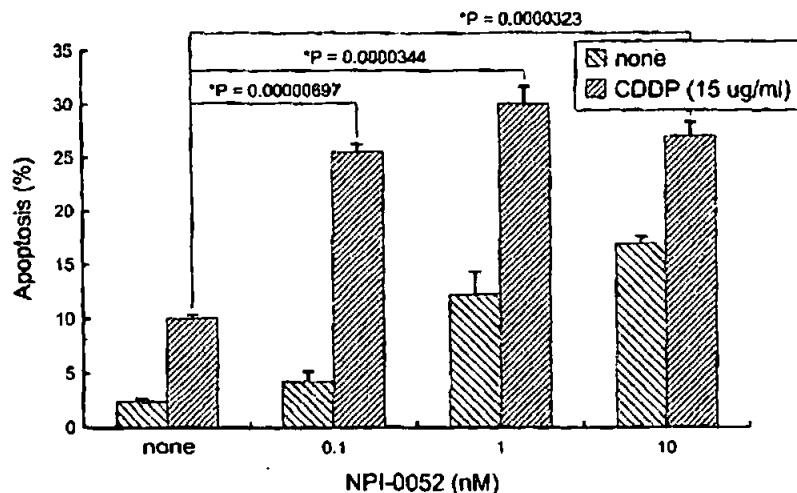
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BONAVIDA, Ben-
jamin [US/US]; 3232 MIDVALE AVE., Los Angeles, CA

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF SENSITIZING CANCER TO THERAPY-INDUCED CYTOTOXICITY

NPI-0052 sensitizes B-NHL Ramos cell line
to CDDP-induced apoptosis



(57) Abstract: The present application demonstrates that Salinosporamide A can be used to sensitize cancer cells to cancer therapy. Furthermore, the present application demonstrates that Salinosporamide A acts as a therapeutic agent to kill or inhibit cancer cells after sensitization of the cells by an antibody or other chemosensitizing reagents. The cancer cells can be either therapy-sensitive or therapy resistant. The present application further demonstrates that Salinosporamide A induces the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and PTEN, tumor suppressor proteins, and inhibits the expression of YY1, a transcriptional regulator protein overexpressed in cancer cells and also inhibits the growth factor pleiotrophin (PTN).

WO 2007/056335 A2

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



THE WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION IS A SPECIAL AGENCY OF THE UNITED NATIONS

(43) International Publication Date
18 May 2007 (18.05.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/056335 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 31/409 (2006.01)

90034 (US). PALIADINO, Michael [US/US]; 3357 FORTUNA RANCH ROAD, Encinitas, CA 92024 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2006/043277

(74) Agents: PARENT, Annette S. et al.; TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP, TWO EMBARCADERO CENTER, 8TH FLOOR, San Francisco, CA 94111 (US).

(22) International Filing Date:
6 November 2006 (06.11.2006)

(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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/733,965 4 November 2005 (04.11.2005) US
60/840,811 28 August 2006 (28.08.2006) US

(71) Applicants (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR, Oakland, CA 94607 (US). NEREUS PHARMACEUTICALS [US/US]; 10480 WATERIDGE CIRCLE, San Diego, CA 92121 (US).

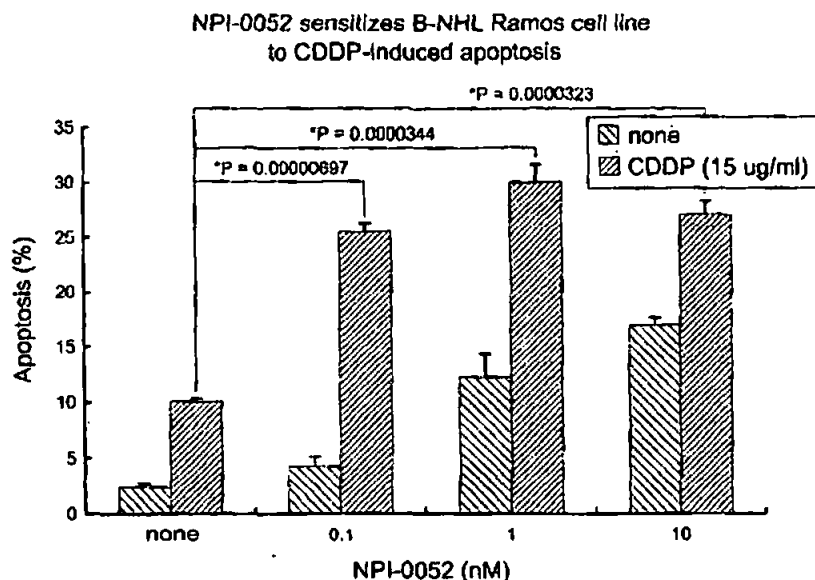
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, 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).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BONAVIDA, Benjamin [US/US]; 3232 MIDVALE AVE., Los Angeles, CA

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF SENSITIZING CANCER TO THERAPY-INDUCED CYTOTOXICITY



(57) Abstract: The present application demonstrates that Salinosporamide A can be used to sensitize cancer cells to cancer therapy. Furthermore, the present application demonstrates that Salinosporamide A acts as a therapeutic agent to kill or inhibit cancer cells after sensitization of the cells by an antibody or other chemosensitizing reagents. The cancer cells can be either therapy-sensitive or therapy resistant. The present application further demonstrates that Salinosporamide A induces the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and PTEN, tumor suppressor proteins, and inhibits the expression of YY1, a transcriptional regulator protein overexpressed in cancer cells and also inhibits the growth factor pleiotrophin (PTN).

(88) Date of publication of the international search report:

17 January 2008

— with international search report

— with international search report

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/043277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. *A61K 31/409* (2007.01)

US Cl. 514/412

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)

See electronic data base below

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 practicable, search terms used)

STN Files Registry and CA: substructure search based on Formula I as defined in Claim 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2005002572 A (NEREUS PHARMACEUTICALS, INC.), 13 January 2005. See whole document, especially page 51 paragraph [0216], page 115 Example 40.	1-44, 51-58 45-50
Y	US 20050239866 A (W. FENICAL et al.), 27 October 2005. See whole document, especially paragraphs [0093] to [0096].	45-50
Y X	V. R. Macherla et al., "Structure-Activity Relationship Studies of Salinosporamide A (NPI-0052), a Novel Marine Derived Proteasome Inhibitor," J. Med. Chem., 2005, 48, pp. 3684-3687. See whole document.	45-50 51-58

☒ 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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 May 2007Date of mailing of the international search report
27 NOV 2007

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized Officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/043277

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	D. Chatterjee et al., "RKIP Sensitizes Prostate and Breast Cancer Cells to Drug-induced Apoptosis," The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(17), pp. 17515-17523. See whole document.	51-58
Y	K. U. Chow et al., "Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases," Haematologica, 2002, 87, pp. 33-43. See whole document.	45-50
E,X	WO 2006060819 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.), 8 June 2006. See Example 7.	45, 46, 48
E,X	WO 2006060676 A (DANA FARBER CANCER INSTITUTE et al.) 8 June 2006. See Examples 14 and 17.	45, 46, 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/043277

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. These particulars are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report			Patent Family Member				
WO	2006060819	NONE					
WO	2006060676	NONE					
WO	2005002572	AU	2004253478	BR	PI0411677	CA	2532066
		CN	1838952	EP	1638552	KR	2006002605
		MX	PA05013982	US	2005049294		
US	2005239866	AU	2004253879	BR	PI0411715	CA	2530215
		CN	1823070	EP	1638977	KR	2006006979
		MX	PA05013985	US	7176232	US	7176233
		US	7179834	US	2004138196	US	2004259856
		WO	2005003137				
END OF ANNEX							

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 2307K-1656-1	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2006/043277	International filing date (day/month/year) 06 November 2006 (06.11.2006)	Priority date (day/month/year) 04 November 2005 (04.11.2005)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA			

This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

☒ Box No. I	Basis of the report
☐ 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 Article 35(2) 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

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis.2).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70		Date of issuance of this report 06 May 2008 (06.05.2008)
		Authorized officer Nora Lindner e-mail: pt11.pct@wipo.int

Form PCT/IB/373 (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the:
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

Annette S. Parent
Townsend and Townsend and Crew LLP
Two Embarcadero Center 8th Floor
San Francisco, CA 94111

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **27 NOV 2007**

Applicant's or agent's file reference
2307K-1656-1

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2006/043277

International filing date (day/month/year)
6 November 2006

Priority date (day/month/year)
4 November 2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INT. CL. **A61K 31/409 (2007.01)**
US CL. **514/412**

Applicant
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

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 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/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
FACSIMILE NO. 571-273-3201

Date of completion of this opinion
29 May 2007

Authorized Officer:
Blaine R. Copenheaver
PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/237 (Cover sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2006/043277

Box No. I Basis of this 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 (under 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(s) 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/US2006/043277

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)	Claims 1 to 50	YES
	Claims 51 to 58	NO
Inventive step (IS)	Claims	YES
	Claims 1 to 58	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1 to 58	YES
	Claims	NO

2. Citations and explanations:

Salinosporamide A is known to exhibit cytotoxic activity in various tumor and cancer cell lines, to exert apoptosis and to inhibit NF- κ B. The present inventors have elucidated some key biochemical pathways acted upon by Salinosporamide A and related compounds of Formula I. In particular, compounds of Formula I induce RKIP (a metastasis tumor suppressor protein that potentiates anti-apoptotic pathways in cancer cells) and induce the expression of the AKT inhibitor PTEN (which results in downstream inhibition of the AKT anti-apoptotic and survival pathway). The present claims define the induction of apoptosis in cancer treatments by compounds of Formula I via these two particular pathways. The claims further define methods of treating cancer with (a) cancer therapy reagents in combination with a sensitizing amount of a compound of Formula I, or (b) a compound of Formula I in combination with a sensitizing amount of an antibody or chemosensitizing reagent.

The present documents have been identified in the International Search Report (see also Box VI):

- D1 WO 2005002572
- D2 US 20050239866
- D3 Macherla et al.
- D4 Chatterjee et al.
- D5 Chow et al.

Novelty (N)

D1 discloses similar compounds and their use for treating cancer. The anticancer activity of the compounds is attributed to proteasome inhibition. The potential chemosensitizing effect of the compounds based on previously observed synergy between the proteasome inhibitor Velcade and CPT-11 are noted at pages 51 and 115.

Furthermore, studies of the effect of the compounds on the NF- κ B/I κ B signalling pathway and the induction of caspase 3 (which results in apoptosis) are described in the examples. This inhibition is said to result in accumulation of Cdk inhibitors p21 and p27 which sensitizes cells to apoptosis. However D1 does not specifically disclose any methods in which the compounds of formula I are co-administered with a sensitizing amount of an anticancer reagent or antibody, or methods in which anticancer reagents are co-administered with a sensitizing amount of a compound of formula I. Accordingly claims 1 to 50 are considered novel in view of D1.

Furthermore, D1 does not specifically disclose methods in which compounds of formula I induce the expression of RKIP or PTEN, thereby achieving apoptosis. However, an objection of lack of novelty may obtain if in carrying out the process of the prior art document, the skilled person would inevitably arrive at the invention claimed. D1 discloses methods of inducing apoptosis in cancer cells, and whilst the RKIP and PTEN pathways are not implicated, these appear inherently associated with apoptosis. Claims 51 to 58 therefore lack novelty in view of D1.

Continued on supplemental sheet.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2006/043277

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
D6 (E,X) WO 2006060819	08/06/2006	05/12/2005	03/12/2004
D7 (E,X) WO 2006060676	08/06/2006	02/12/2005	03/12/2004

D6 discloses the chemosensitization of Salinosporamide A-treated cancer cells by DHMEQ. D7 discloses combinations of Salinosporamide A and various caspase inhibitors (see Example 14), and a combination of Salinosporamide A and Bortezomib (Example 17). While chemosensitization is not specifically disclosed, the nature of the interaction between the components does appear to involve such an effect. Claims 45, 46 and 48 therefore lack novelty in view of each of D6 and D7.

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International Application No.

PCT/US2006/043277

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Box V.2

D2 discloses salinosporamide derivatives and their use in the treatment of cancer. The citation broadly discloses the use of such compounds with other anti-neoplastic agents. However, there are no specific examples of such methods, nor does the citation disclose the sensitizing effect described in the present application. The citation does not disclose induction of apoptosis by the salinosporamide derivatives. Accordingly Claims 1 to 58 are novel in view of D2.

D3 discloses Salinosporamide A and its inhibition of NF- κ B activation. The citation notes that interference with the activity of NF- κ B by proteasome inhibition results in enhanced chemosensitivity and increased apoptosis in cancer cells. However, the citation does not disclose methods in which the compounds of formula I are co-administered with a sensitizing amount of an anticancer reagent or antibody, or methods in which anticancer reagents are co-administered with a sensitizing amount of a compound of formula I. Claims 1 to 50 are therefore novel in view of D3. However, while D3 does not specifically disclose methods in which compounds of formula I induce the expression of RKIP or PTEN and result in apoptosis, as noted for D1 above, these appear inherently associated with apoptosis. Claims 51 to 58 therefore lack novelty in view of D3.

D4 discloses studies on RKIP sensitization of cancer cells to apoptosis and the relation of RKIP to other pathways such as NF- κ B. However, none of the methods defined in the present claims are disclosed in this citation, and Claims 1 to 58 are therefore novel in view of D4.

D5 discloses studies on Rituximab and its chemosensitizing effect in combinations with other chemotherapeutic agents. However, none of the methods defined in the present claims are disclosed in this citation, and Claims 1 to 58 are therefore novel in view of D5.

Inventive Step (IS)

D1 is the closest prior art in relation to the inventiveness of Claims 1 to 44, which define methods in which a sensitizing amount of a compound of Formula I is combined with a chemotherapeutic agent. The citation discloses that compounds of Formula I have potential chemosensitizing properties. In view of this disclosure, the skilled person would be led to use the compounds of Formula I in association with other chemotherapeutic agents with the expectation of obtaining chemosensitization. Claims 1 to 44 are therefore considered to lack inventive step in view of D1 alone.

Claims 45 to 50 define methods of treating cancers using compounds of Formula I and a chemosensitizing agent. The use of chemosensitizing agents is known in the art, as illustrated by D5 which describes such use of Rituximab with other chemotherapeutic agents. The skilled person would as a matter of routine combine such teachings with those of citations D1 to D3 (wherein compounds of formula I and their chemotherapeutic use is disclosed) to obtain the present invention. Accordingly Claims 45 to 50 lack inventive step in view of D5 when combined with each of D1 to D3.

Claims 51 to 58 define methods of treating cancers in which compounds of Formula I are administered in an amount sufficient to induce apoptosis via RKIP or PTEN. As noted above under novelty, such compounds are known to induce apoptosis from D1 and D3 and it is *prima facie* inherent that these biochemical pathways are involved in the prior art treatments. Even if this is not an inherent feature of the prior art methods, the inter-relationship between NF- κ B and RKIP is known from D4, and the skilled person would as a matter of routine combine such teaching with that of D1 or D3 to further elucidate the biochemical pathways associated with apoptosis in cells treated with such compounds. Accordingly, inventive step cannot be acknowledged for Claims 51 to 58.

The claims as a whole are industrially applicable in view of the purported use of the compositions, kits and methods.

MÉTODOS DE SENSIBILIZACIÓN DE CÁNCER A CITOTOXICIDAD
INDUCIDA POR TERAPIA

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad de la
5 solicitud de patente de los E.U.A. Número de Serie
60/733,965, presentada en noviembre 4, 2005, y la
solicitud de patente de los E.U.A. Número de Serie
60/840,811, presentada en agosto 28, 2006, las
enseñanzas de las cuales se incorporan aquí por
10 referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los inhibidores de proteasomas se han
mostrado que inducen exterminio celular solo y/o en
combinación con drogas en células de tumor
15 resistentes a drogas. En 2003, la Administración
Federal de Drogas (FDA) aprobó el primer el inhibidor
de proteasoma VELCADE "bortezomib" para tratar
pacientes con mieloma múltiple quienes tienen recaída
después de dos terapias y progresan en tratamientos
20 actuales. Estos inhibidores de proteasoma demuestran
ser clínicamente efectivos. Sin embargo, como muchas
otras drogas, la resistencia a bortezomib empieza a
surgir así como se ha notado la toxicidad de tejido
inducido con bortezomib. El desarrollo de nuevos
25 inhibidores de proteasoma puede superar la
resistencia de bortezomib y que exhibe menos
toxicidad, es altamente conveniente. El compuesto
químico salinosporamida A (NPI-0052, Nereus
Pharmaceuticals, San Diego) fue descubierto durante
30 la fermentación de la especie *Salinospora*, un nuevo

actinomiceto de gran positivo marino. Se relaciona a dos inhibidores 20S de proteasoma menos potentes, estructuralmente relacionados a lactacistina, omuralida, y PS-519.

5 Varios hallazgos *in vitro* indican que Salinosporamida A exhibe toxicidad contra una variedad de líneas celulares de tumor (Feling, et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42(3): 355- 357) y puede ejercer apoptosis e inhibición de NF- κ B (Macherla, et
10 al, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48:3684). También se ha mostrado que Salinosporamida A es efectivo en línea celular resistentes a bortezomib. *In vivo*, Salinosporamida A ejerce efectos antitumor ya sea administrada oralmente o en forma intravenosa
15 (Chuahan et al, *Cancer Cell*, Nov. 8, 407-419 (2005)). Salinosporamida A se ha sintetizado químicamente. Estudios en citotoxicidad con los paneles de criba NCI de 60 líneas de células de tumor humanas mostraron que Salinosporamida A afecta a muchas
20 células de cáncer y tiene una inhibición de crecimiento promedio menor a 10 nM. Otras líneas celulares de tumor examinadas mostraron actividad citotóxica significativa. Vale la pena notar que Salinosporamida A también fue citotóxica tanto a HL60
25 sensible a droga como HL60MX2 resistente a droga con dosis iguales.

La Salinosporamida A también tuvo el efecto de inducir un intervalo de apoptosis directa en diferentes líneas de células de tumor. El efecto de
30 Salinosporamida A en la inducción de apoptosis

sugiere que Salinosporamida A puede emplearse como un agente para identificar rutas antiapoptóticas que pueden servir como blancos para terapias de cáncer al examinar cambios en la expresión de ácidos nucleicos y proteínas ante tratamiento de células de cáncer con este compuesto.

En la presente solicitud, hemos examinado si Salinosporamida A puede sensibilizar linfoma no Hodgkin sensible a terapia y resistente a terapia B a la apoptosis inducida por terapia. También hemos investigado si Salinosporamida A puede actuar como un agente terapéutico he inducir apoptosis después de sensibilización por otro compuesto tal como rituximab. Además, también hemos examinado el efecto de Salinosporamida A en la inducción de proteína inhibidora Raf cinasa (RKIP), una proteína supresora de tumor de metástasis que potencia las vías antiapoptóticas en células de cáncer, y en la inhibición de expresión de YY1, una proteína reguladora de transcripción sobre expresada en células de cáncer que regula las resistencias de células de tumor tanto a quimioterapia como inmunoterapia.

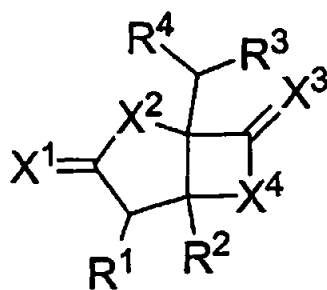
BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente solicitud demuestra que Salinosporamida A, en combinación con cantidades terapéuticamente efectivas subtóxicas de agentes terapéuticos de cáncer, sensibiliza tanto células de cáncer resistentes como sensibles a citotoxicidad inducida por terapia. Las células de cáncer pueden ya

ser sensibles a terapia o resistentes a terapia. Además, la presente solicitud demuestra que Salinosporamida A actúa como un agente terapéutico para inducir apoptosis en células de cáncer después de sensibilización de las células por un anticuerpo o por diversos agentes quimio- e inmuno-sensibilizantes. Las células de cáncer ya pueden ser sensibles a terapia o resistentes a terapia. En forma adicional, la presente solicitud demuestra que Salinosporamida A induce la expresión de RKIP, de esta manera inhibiendo la supervivencia de las rutas de señalización antiapoptóticas y que resulta en reducción del umbral de expresión de gen antiapoptótico y cuando se utiliza solo, o en combinación con otros agentes, resulta en apoptosis. Además, la inducción de RKIP también ejerce actividad anti-angiogénica así como evita metástasis. Además, el tratamiento con Salinosporamida A inhibe el represor de transcripción YY1, resultando en la regulación ascendente de receptor de muerte y sensibilización de células de tumor a inmunoterapia citotóxica. También regula la expresión de receptor de muerte en clones resistentes a rituximab. Salinosporamida A induce la expresión del inhibidor AKT PTEN que resulta en inhibición corriente abajo de la ruta AKT antiapoptótica y supervivencia y resulta en inhibición de productos de genes antiapoptóticos. Salinosporamida A también inhibe la sobre expresión de pleiotrofina (PTN), un factor de crecimiento, un factor de resistencia en células de tumor, y niveles

en circulación de PTN se ha demostrado que tienen una importancia para pronóstico.

En una primera modalidad, la invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo de terapia de cáncer y una cantidad sensibilizantemente efectiva de un compuesto de la fórmula I:



I

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente pueden ser: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenoilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente puede ser:

alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede
 5 independientemente ser: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

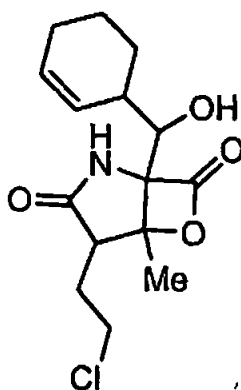
En algunos aspectos de la primera modalidad, cada uno de R^1 y R^2 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido,
 10 alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo sustituido; R^3 puede ser alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o
 15 sulfurilo; R^4 es un cicloalqueno de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH.

Todavía en otro aspecto de la primera modalidad, cada uno de R^1 y R^2 puede
 20 independientemente ser: alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, y alquino sustituido; R^3 puede ser alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, y amino; R^4 es ciclohexeno opcionalmente
 25 sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH.

En aspectos adicionales de la primera modalidad, R^1 es un alquilo o alquilo sustituido; R^2 es alquilo; R^3 es hidroxilo; R^4 es ciclohexeno; y cada
 30 uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH; el alquilo

sustituido de R^1 puede ser un alquilo halogenado, que puede estar fluorado, clorado, bromado en diferentes aspectos. En algunos aspectos, el compuesto alquilo halogenado tiene la siguiente estructura:

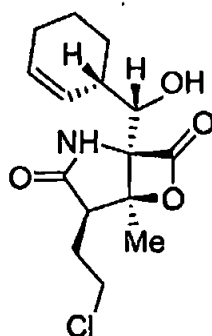
5



10

Todavía en otro aspecto de la primera modalidad, el compuesto alquilo halogenado tiene la siguiente estructura:

15



20

En aspectos adicionales de la primera modalidad, la cantidad efectiva sensibilizante del compuesto de la fórmula I es suficiente para inducir expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo o facilitando la apoptosis. La expresión de RKDP o PTEN puede ser al menos 1, 2, 10, o 100 veces superior que en la ausencia del compuesto de la fórmula I.

25

30

En aspectos aún adicionales de la primera

modalidad, la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la fórmula I es suficiente para inhibir la expresión de YY1, y PTN, de esta manera induciendo apoptosis. La expresión de YY1, PTEN, y PTN puede
5 ser al menos 1, 2, 10, o 100 veces menor que en la ausencia del compuesto de la fórmula I.

Todavía en otro aspecto de la primera modalidad, el reactivo de terapia de cáncer puede ser un reactivo quimioterapéutico, un reactivo
10 inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, un reactivo terapéutico hormonal o un inhibidor farmacológico.

En otros aspectos de la primera modalidad, el cáncer puede ser un linfoma no-Hodgkin, linfoma
15 linfoblástico agudo B, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de colon, leucemia, mieloma múltiple y hepatocarcinoma.

En otro aspecto de la primera modalidad, el
20 reactivo de terapia de cáncer induce o facilita la apoptosis y puede ser un reactivo quimioterapéutico, un reactivo inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, un reactivo terapéutico hormonal, o un inhibidor farmacológico. En este aspecto, el
25 reactivo de terapia de cáncer puede ser inmunoterapia de rituximab.

En diversos aspectos de la primera modalidad, el cáncer es resistente a terapia, incluyendo resistente a inmunoterapia, quimioterapia,
30 radioterapia o terapia hormonal. Sin embargo, en

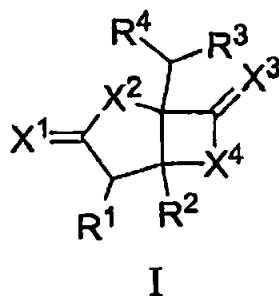
otros aspectos, el cáncer puede ser sensible a terapia.

En aspectos adicionales de la primera modalidad, la cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo de terapia de cáncer y la cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I se administra en forma concurrente o secuencial, en donde el reactivo de terapia de cáncer es administración de bortezomib. En aspectos relacionados, el reactivo de terapia de cáncer puede ser un reactivo quimioterapéutico, un reactivo inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, un reactivo terapéutico hormonal o un inhibidor farmacológico.

En un aspecto alterno de la primera modalidad, la cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo de terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I, se administran secuencialmente.

En un aspecto de la primera modalidad, el sujeto puede ser un humano.

Una segunda modalidad de esta invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir linfoma al administrar a un sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo de terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I:



5 en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 pueden ser
 independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido,
 alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo
 sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo,
 heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico
 10 sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,
 alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo
 sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido,
 carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato,
 sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un
 15 cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente
 sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de
 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8
 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente puede ser:
 alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo
 20 sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,
 arilo sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo
 sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige
 independientemente del grupo que consiste de O, NR^6 y
 S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

25 En un aspecto de la segunda modalidad, la
 cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la
 fórmula I es suficiente para inducir expresión de
 RKIP o PTEN, de esta manera induciendo o potenciando
 apoptosis.

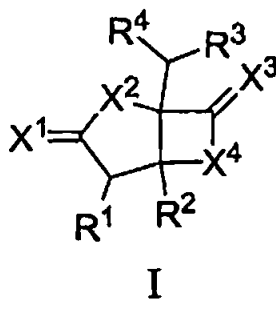
30 En otro aspecto de la segunda modalidad, la

cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la fórmula I, es suficiente para inhibir la expresión de YY1 o PTN de esta manera induciendo o potenciando apoptosis.

5 En aspectos adicionales de la segunda modalidad, el linfoma es resistente a terapia, lo que puede incluir un linfoma que es resistente a terapia con rituximab.

En una tercera modalidad, esta invención
10 proporciona un método para tratar, evitar o inhibir linfoma al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I:

15



20

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido,
25 alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo
30 sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido,

carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalqueno de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser independientemente O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

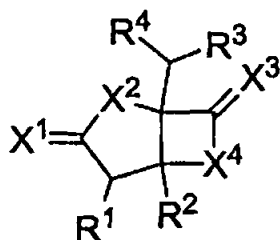
En un aspecto de la tercera modalidad, la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la fórmula I, es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

En otro aspecto de la tercera modalidad, la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la fórmula I, es suficiente para inhibir expresión de YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis.

En una cuarta modalidad, la invención proporciona una composición que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I en un excipiente fisiológicamente aceptable.

En una quinta modalidad, la invención proporciona un equipo que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la fórmula I.

En una sexta modalidad, esta invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer con terapia de inhibidor proteasoma al administrar a un sujeto una cantidad sensibilizante efectiva de un anticuerpo o reactivo quimiosensibilizante y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I:



I

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,

arilo sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede independientemente ser: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

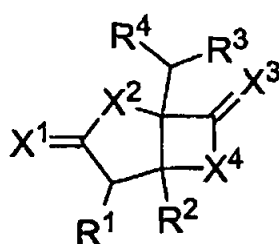
5 En un aspecto de la sexta modalidad, la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para inducir expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis o sensibilizando células a apoptosis por diversas
10 concentraciones subtóxicas en agentes citotóxicos. En otros aspectos de esta modalidad, el anticuerpo es rituximab y el cáncer es linfoma.

 En otro aspecto de la sexta modalidad, la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la
15 Fórmula I, es suficiente para inhibir expresión de YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis. En otros aspectos de esta modalidad, el anticuerpo es rituximab y el cáncer es linfoma.

 En una séptima modalidad, esta invención
20 proporciona una composición que comprende una cantidad sensibilizante efectiva de rituximab y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I en un excipiente fisiológicamente aceptable.

25 En una octava modalidad, esta invención proporciona un equipo que comprende una cantidad sensibilizante efectiva de rituximab y una cantidad terapéutica efectiva de un compuesto de la Fórmula I.

 En una novena modalidad, esta invención
30 proporciona un método para tratar, evitar o inhibir



I

5

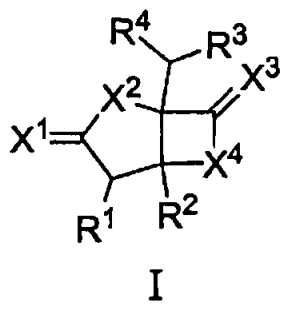
en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

En diversos aspectos de la novena modalidad, la expresión de RKIP o PTEN es al menos

30

aproximadamente 1, 2, 10, o 100 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Fórmula I.

En una décima modalidad, esta invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, el método comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



15 en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un

20 cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,

25 alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo

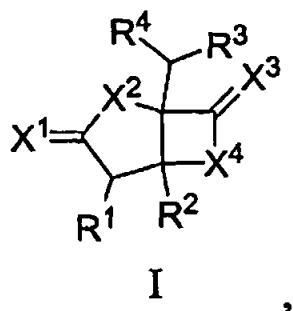
30

sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido;
 cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser
 independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6
 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente
 5 efectiva es suficiente para inhibir la expresión de
 YY1 o PTN, por lo tanto, induciendo apoptosis o
 reduciendo el umbral de resistencia a apoptosis por
 drogas citotóxicas.

En diversos aspectos de la décima
 10 modalidad, la expresión de YY1 o PTN es al menos
 aproximadamente 1, 2, 10, o 100 veces menor que en la
 ausencia del compuesto de la Fórmula I.

En una onceava modalidad, esta invención
 proporciona un método para tratar, evitar o inhibir
 15 linfoma al administrar a un sujeto, opcionalmente en
 combinación con agentes citotóxicos, una cantidad
 terapéuticamente efectiva de un compuesto de la
 Fórmula I:

20



25

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser
 independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido,
 alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo
 sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo,
 30 heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico

sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 o un cicloalqueno de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

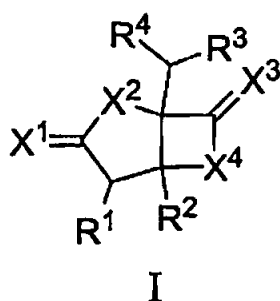
En una doceava modalidad, esta invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir linfoma, al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



30 en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser

independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxí, alcoxí sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxí, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 o un cicloalqueno de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inhibir la expresión de YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis.

En una treceava modalidad, esta invención proporciona un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer con una terapia de inhibidor proteasoma al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



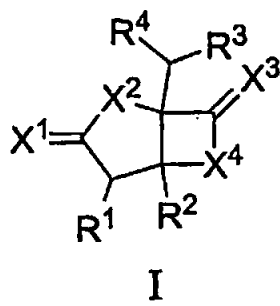
5

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser
independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido,
10 alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo
sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo,
heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico
sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido,
alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo
15 sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido,
carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato,
sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un
cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido
con 1-8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5-8 miembros
20 opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5
puede ser independientemente: alquilo, alquilo
sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,
alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo
sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido;
25 cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 independientemente se
elige del grupo que consiste de O, NR^6 y S; y R^6 es H
o C_1-C_6 alquilo, en donde la cantidad terapéuticamente
efectiva es suficiente para inducir la expresión de
RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

30

En una catorceava modalidad, esta invención

proporciona un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer con una terapia de inhibidor proteasoma al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



10

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5 puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 independientemente se elige del grupo que consiste de O, NR^6 y S; y R^6 es H

15

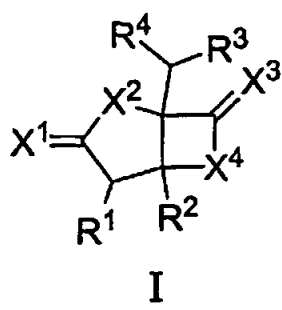
20

25

30

o C₁-C₆ alquilo, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis.

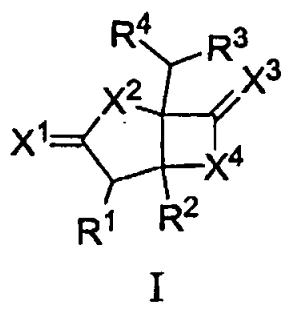
En una quinceava modalidad de esta invención, esta invención proporciona un método para tratar un cáncer resistente a terapia al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



en donde cada uno de R¹, R² y R³ puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R⁴ es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R⁵ o un cicloalquenilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R⁵; cada R⁵ puede ser independientemente: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,

alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

En una dieciseisava modalidad de esta invención, esta invención proporciona un método para tratar un cáncer resistente a terapia al administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 puede ser independientemente: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido

con 1-8 grupos R^5 o un cicloalqueno de 5-8 miembros
 opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada R^5
 puede ser independientemente: alquilo, alquilo
 sustituido, alqueno, alqueno sustituido,
 5 alquino, alquino sustituido, arilo, arilo
 sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido;
 cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 puede ser
 independientemente O, NR^6 y S; R^6 es H o C_1-C_6
 alquilo, en donde la cantidad terapéuticamente
 10 efectiva es suficiente para inhibir la expresión de
 YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra que Salinosporamida A
 sensibiliza significativamente la línea de células
 15 Ramos B-NHL a apoptosis inducida por CDDP.

Células Ramos resistentes a droga y
 Salinosporamida A (10^6 ml), se trataron con diversas
 concentraciones de Salinosporamida A por una hora y
 después trataron con CDDP (15 μ g/ml) por adicionales
 20 20 h. Los cultivos después se lavaron y las células
 se cosecharon y examinaron para apoptosis, utilizando
 el método de yoduro de propidio, que mide
 fragmentación de ADN por citometría de flujo. Se
 registró el por ciento de células apoptóticas. Muy
 25 grandes concentraciones de Salinosporamida A (0.1 nM)
 fueron efectivas. El tratamiento se realizó en
 duplicado.

La Figura 2A muestra que Salinosporamida A
 sensibiliza droga y línea de células B-NHL Daudi
 30 resistentes a Salinosporamida A a apoptosis inducida

por CDDP. Células Daudi se trataron por Ramos como en la Figura 1 anterior.

La Figura 2B muestra que Salinosporamida A sensibiliza la línea celular Daudi RR1 resistente a rituximab NHL-B a Apoptosis inducida por CDDP. El clon Daudi-RR1 resistente a rituximab se trató como en la Figura 1 anterior.

La Figura 3A compara sensibilización inducida por Salinosporamida A y bortezomib de células Daudi WT B-NHL a apoptosis inducida por CDDP. Las células Daudi se trataron con diversas concentraciones de bortezomib o Salinosporamida A por 1 h y después trataron con CDDP (10 µg/ml) por 20 h adicionales y se trataron por apoptosis como se describe en la Figura 1 anterior.

La Figura 3B compara sensibilización inducida por DHMEQ y Salinosporamida A de células Daudi WT B-NHL a apoptosis inducida por CDDP. Células Daudi se trataron con diversas concentraciones de DHMEQ (µM) y/o Salinosporamida A (nM) por 1 h y después trataron con CDDP (10 µg/ml) por 20 h adicionales. Las células después se recolectaron y probaron para apoptosis como se describe en la Figura 1 anterior.

La Figura 4A compara el efecto de Salinosporamida A y bortezomib en apoptosis inducida por CDDP en células Daudi RR1. El clon Daudi RR1 resistente a rituximab se trató con diversas concentraciones de bortezomib y/o Salinosporamida A por 1 h y después trató con CDDP 10 µg/ml por 20 h

adicionales. Estas células después se examinaron para apoptosis como se describe en la Figura 1 anterior.

La Figura 4B compara el efecto de Salinosporamida A y DHMEQ en apoptosis inducida por CDDP en células Daudi RR1. Las células Daudi RR1 resistentes a rituximab se trataron con diversas concentraciones de DHMEQ (μM) o Salinosporamida A (nM) por 1 h y después trataron con CDDP (10 $\mu\text{g/ml}$) por 20 h adicionales. Las células después se examinaron por apoptosis como se describe en la Figura 1 anterior.

La Figura 5 muestra sensibilización mediada por rituximab a apoptosis inducida por Salinosporamida A. Células Ramos se trataron con rituximab (20 $\mu\text{g/ml}$) por 1 h y después trataron con diversas concentraciones de Salinosporamida A por 20 h adicionales. Las células después se examinaron por apoptosis como se describe en la Figura 1.

La Figura 6 muestra que en comparación a quimiosensibilización mediada por rituximab a CDDP, rituximab sensibiliza a apoptosis inducida por Salinosporamida A a un nivel superior que CDDP.

La Figura 7 muestra la estructura de Salinosporamida A.

La Figura 8 muestra que rituximab sensibiliza células B-NHL Ramos a apoptosis inducida por Salinosporamida A. Las células Ramos se cultivaron sin tratar o tratadas con rituximab (20 $\mu\text{g/ml}$) por 18 h. Posteriormente, las células se trataron con adriamicina (ADR) (5 $\mu\text{g/ml}$) o con

diferentes concentraciones de Salinosporamida A (0.1, 1.0, 10 nM) durante la noche. Las líneas celulares se examinaron para apoptosis por citometría de flujo utilizando método de yoduro de propidio para medir fragmentación de ADN.

La Figura 9 muestra que el tratamiento de células de tumor con Salinosporamida A resulta en la inducción de supresor de tumor, proteína de inhibidor Raf-quinasa (RKIP). Células Ramos se trataron con Salinosporamida A 10 nM por diversos periodos de tiempo y lisados de células totales se examinaron para expresión de RKIP por análisis de transferencia western. La expresión de β -actina se empleó como un control.

La Figura 10 muestra que el tratamiento de células de tumor con Salinosporamida A inhibe la expresión YY1 en células B-NHL Ramos. Las células Ramos se trataron con diversas concentraciones de Salinosporamida A por 24 horas, y se examinó el total de lisados celulares para expresión de YY1 por análisis de transferencia western. La expresión de β -actin se empleó como un control.

La Figura 11 muestra un diagrama esquemático que representa el efecto de Salinosporamida A en sensibilización de células de tumor resistentes a drogas a diversas apoptosis inducidas por droga inmune. Células de tumor constitutivamente expresan NF- κ B activada, que a su vez regula la transcripción de diversos genes de supervivencia y genes antiapoptóticos así como regula

la expresión del represor de transcripción YY1. El tratamiento de las células con Salinosporamida A resulta en inhibición de actividad NF- κ B que lleva a inhibición de productos de genes de sobrevivencia y productos de gen anti-apoptóticos y resulta en quimiosensibilización. Además, la inhibición de NF- κ B por Salinosporamida A también inhibe YY1, que hemos mostrado regula en forma negativa Fas y transcripción DR5. La inhibición de YY1 resulta en regulación ascendente de expresión DR5 y Fas y sensibiliza células a apoptosis inducida por TRAIL y FasL.

La Figura 12 muestra un diagrama esquemático que representa células de tumor que expresan en forma constitutiva NF- κ B activado, que regula varios productos de genes anti-apoptóticos tales como Bcl-2, Bcl-xL, y McI-I. Estudios previos han demostrado que esos productos de genes anti-apoptóticos son importantes para mantener resistencia a células de tumor a diversas drogas quimioterapéuticas. Hemos mostrado que el tratamiento con rituximab inhibe actividad NF- κ B y también inhibe los productos de gen anti-apoptóticos anteriores y sensibiliza las células de tumor a diversas drogas quimioterapéuticas. Salinosporamida A también inhibe actividad NF- κ B, y la combinación de rituximab y Salinosporamida A resulta en complemento o sinergia y apoptosis. La apoptosis es el resultado de sensibilización inducida por rituximab a la apoptosis de Salinosporamida A.

La Figura 13 demuestra que la Salinosporamida A activa caspasa 9 en células Ramos y en combinación con CDDP se activa más caspasa 9. La activación de caspasa 9 se estima por western así al
5 igual que el nivel de pro-caspasa 9 se reduce después del tratamiento.

La Figura 14 muestra que Salinosporamida A inhibe el producto de gen anti-apoptósico Bcl-xL después de tratamiento con muy bajas concentraciones
10 (< 2.5 nM). La expresión Bcl-xL se estimó por western.

La Figura 15 muestra que Salinosporamida A induce la expresión de RKIP y PTEN y en combinación con rituximab más se expresa como se evalúa por
15 western.

La Figura 16 muestra que Salinosporamida A inhibe la expresión pleiotrofina factor de crecimiento (PTN = pleiotrophin) significativamente a la concentración de 5 nM.

La Figura 17A muestra que el tratamiento de
20 Salinosporamida A de Ramos regulada a la alta expresión de DR5 como se detecta por citometría de flujo.

La Figura 17B muestra que Salinosporamida A regula en forma ascendente la expresión de DR5 en las
25 células Ramos resistentes a rituximab RR1.

La Figura 18 muestra que Salinosporamida A sensibiliza células Ramos resistentes a TRAIL para apoptosis inducida por TRAIL.

La Figura 19 muestra que Salinosporamida A
30

regula en forma ascendente la expresión de DR5 en las células Ramos como se determina por Western.

La Figura 20 muestra que Salinosporamida A inhibe la transcripción YY1 como se determina por RT-PCR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

"Cáncer" se refiere a cánceres y carcinomas humanos, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, etc., incluyendo cánceres sólidos y linfoides, de riñón, mama, pulmón, vejiga, colon, ovarios, próstata, páncreas, estómago, cerebro, cabeza y cuello, piel, uterino, testicular, de glioma, esófago, y del hígado, incluyendo hepatocarcinoma, linfoma, incluyendo linfoma linfoblástico agudo B, linfomas no Hodgkin (por ejemplo, de Burkitt, linfomas de células pequeñas, y células grandes) y linfoma de Hodgkin, leucemia (incluyendo AML, ALL, y CML), mieloma múltiple, linfoma de célula de manto, macro globulinemia de Waldenstrom y cánceres positivos de Philadelphia.

Cánceres "resistentes a terapia", células de tumor, y tumores se refieren a cánceres que se han vuelto resistentes tanto a medido por apoptosis (por ejemplo, a través de señalización receptoras de muerte, por ejemplo, receptores de ligando Fas, receptores TRAIL, TNF-R1), diversas drogas quimioterapéuticas empleadas convencionalmente, drogas hormonales, y radiación, y terapias de cáncer no mediadas por apoptosis (por ejemplo,

antimetabolitos, anti-angiogénicos, etc.). Cánceres "sensibles a terapia" no son resistentes a terapia. Una persona con destreza en la técnica apreciará que algunos cánceres son sensibles a terapia a agentes
 5 particulares pero no a otros. Las terapias de cáncer incluyen quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia, inmunoterapia y terapia de genes.

"Citotoxicidad inducida o medida por terapia" se refiere a todos los mecanismos por los
 10 cuales las terapias de cáncer exterminan o inhiben células de cáncer, incluyendo pero no limitadas a inhibición de proliferación, inhibición de angiogénesis, y muerte celular debido, por ejemplo, activación de rutas de apoptosis (por ejemplo, señalización de células receptoras de muerte, por
 15 ejemplo, receptor de ligando Fas, receptores TRAIL, TNF-R1). Terapias de cáncer incluyen quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia, y terapia hormonal.

"Tratamiento terapéutico" y "terapias de
 20 cáncer" y "reactivos de terapia de cáncer" se refieren a terapias de cáncer mediadas por apoptosis y no mediadas por apoptosis, que tratan, evitan o inhiben cánceres, incluyendo quimioterapia, terapia hormonal (por ejemplo, andrógenos, estrógenos, antiestrógenos (tamoxifen), progestinas, hormonas de
 25 tiroides y compuestos adrenal corticales), radioterapia e inmunoterapia (por ejemplo, ZEVALIN, BEXXAR, RITUXAN (rituximab), HERCEPTIN). Las terapias de cáncer pueden mejorarse por administración con un
 30 agente sensibilizante como se describe aquí, ya sea

antes o con la terapia de cáncer.

"Drogas quimioterapéuticas" incluyen agentes reactivos quimioterapéuticos convencionales tales como agentes alquilantes, anti-metabolitos, 5 alcaloides de plantas, antibióticos y compuestos misceláneos, por ejemplo, cis-platina, CDDP, metotrexato, vincristina, adriamicina, bleomicina e hidroxiurea. Drogas quimioterapéuticas también incluye inhibidores de proteasoma tales como 10 salinosporamidas (por ejemplo, Salinosporamida A), bortezomib, PS-519, omuralide, PR-171 y sus análogos, y Gleevec. Las drogas pueden administrarse solas o en combinación ("quimioterapia de combinación").

Por "dosis o cantidad sensibilizante 15 efectiva" o "dosis o cantidad sensibilizante suficiente", aquí se pretende una dosis que produzca efectos sensibilizantes en células de cáncer para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y se evaluará por una 20 persona con destreza en la técnica utilizando técnicas conocidas (ver, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations 25 (1999); and Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins). Células de cáncer sensibilizadas responden mejor a terapia de cáncer (se inhiben o exterminan más rápido o más a menudo) 30 que las células no sensibilizadas, como sigue: A

muestras de control (sin tratar con agentes sensibilizantes) se les asigna un valor de respuesta a terapia de cáncer relativo de 100%. La sensibilización se logra cuando el valor de respuesta de terapia de cáncer respecto al control es aproximadamente 110% o 120%, de preferencia 200%, más preferiblemente 500-1000% o más, es decir, al menos aproximadamente 10% más células se exterminan o inhiben, o las células se exterminan o inhiben al menos aproximadamente 10% más rápido. Valor de respuesta a terapia de cáncer se refiere a la cantidad de exterminio o inhibición de una célula de cáncer, o la velocidad de exterminio o inhibición de una célula de cáncer cuando se trata con una terapia de cáncer. Algunos compuestos son útiles tanto como reactivos terapéuticos como reactivos de sensibilización. A menudo, una dosis menor (es decir, menor que la dosis terapéutica convencional) o dosis sub-toxica de este reactivo puede utilizarse para sensibilizar una célula. A menudo, cuando una célula se sensibiliza, puede emplearse una dosis menor del reactivo quimioterapéutico para lograr el mismo efecto terapéutico que con una célula que no se ha sensibilizado.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis o cantidad terapéuticamente suficiente" aquí se entiende una dosis que produce efectos terapéuticos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y se evaluará por una persona con

destreza en la técnica utilizando técnicas conocidas
(ver, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage
Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and
Technology of Pharmaceutical Compounding (1999);
5 Pickar, Dosage Calculations (1999); and Remington:
The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition,
2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).
En células sensibilizadas, la dosis terapéuticamente
efectiva, a menudo puede ser menor que la dosis
10 terapéuticamente efectiva convencional para células
no sensibilizadas.

La apoptosis se refiere a un proceso de
muerte de células programada, que es diferente de la
muerte celular general o necrosis que resulta de la
15 exposición de células a eventos tóxicos no
específicos tales como venenos metabólicos o isquemia
por ser un proceso molecular ordenado por el cual las
células indeseadas se someten a muerte. Células que
se someten a apoptosis muestran cambios morfológicos
20 característicos tales como condensación de cromatina
y fragmentación y descomposición de la envoltura
nuclear en un proceso denominado picnosis. Conforme
avanza la apoptosis, la membrana de plasma se ve que
forma células que forman gulas, ampollas o vejigas y
25 las células apoptóticas ya son fagocitosadas o de
otra forma se descomponen en vesículas más pequeñas
que después se meten a fagocitosis. Ensayos típicos
empleados para detectar y medir apoptosis incluyen
examen microscópico de cuerpos picnóticos así como
30 ensayos enzimáticos tales como etiquetado TUNEL,

ensayo de caspasa, ensayo de anexina y escalera de ADN, entre otros. Células apoptósicas pueden cuantificarse por análisis FACS de células teñidas con yoduro de propidio para hipoploide ADN.

5 "Inducir apoptosis" se refiere a un agente o proceso que provoca que una célula se someta al programa de muerte celular descrito anteriormente para apoptosis.

"Salinosporamida" se refiere a compuestos
10 inhibidores de proteasoma producidos por *Salinospora* sp., un actinomiceto gram positivo marino, por ejemplo, Salinosporamida A (Salinosporamida A), B, C, etc, y sus análogos. Las Salinosporamidas pueden elaborarse por aislamiento de los productos de
15 fermentación de *Salinospora* (sepas de tipo silvestre y mutantes) y microorganismos de ingeniería genética, por biosíntesis *in vitro* utilizando células enteras, enzimas y enzimas recombinantes y por técnicas de química sintética.

20 "Salinosporamida A" se refiere a compuestos inhibidores de proteasoma producidos por *Salinospora* sp., un actinomiceto gram positivo marino. Este término también se refiere a análogos de Salinosporamida A. Salinosporamida A y sus análogos
25 tienen estructuras como se describe aquí, por ejemplo, en la Fórmula 1 y Figura 7, así como en US20050049294, aquí incorporada por referencia.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de
30 inmunoglobulina o sus fragmentos que liga

específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región kappa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon y mu así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda. Cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez define las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Típicamente, la región de enlace de antígeno de un anticuerpo será más crítica en especificidad y afinidad de enlace.

Existen anticuerpos, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados que se producen por digestión con diversas peptidasas. De esta manera, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en si es una cadena ligera unida por V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse bajo condiciones ligeras para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, de esta manera convirtiendo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' esencialmente es Fab con parte de la región bisagra (ver Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993). Mientras que varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona con destreza apreciará que estos fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o al utilizar metodología de ADN

recombinante. De esta manera, el término anticuerpo, como se emplea aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo ya se producidos por la modificación de anticuerpos enteros, o aquellos sintetizados de novo
 5 utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados utilizando las bibliotecas de exhibición fago (ver, por ejemplo, McCafferty et al, Nature 348:552-554 (1990)).

10 Para preparación de anticuerpos por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales, o policlonales, muchas técnicas conocidas en la especialidad pueden emplearse (ver, por ejemplo, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor
 15 et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al, pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); and Goding, Monoclonal
 20 Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de interés pueden clonarse de una célula, por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse de un hibridoma
 25 y emplearse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Bibliotecas de genes que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales, también pueden elaborarse a partir de células de hibridoma o plasma. Combinaciones al azar
 30 de los productos de gen de cadena pesada y ligera,

generan un gran conjunto de anticuerpos con diferente
 especificidad antigénica (ver por ejemplo, Kubý,
 Immunology (3rd ed. 1997)). Técnicas para la
 producción de anticuerpos de cadena sencilla o
 5 anticuerpos recombinantes (patente de los E.U.A.
 número 4,946,778, patente de los E.U.A. número
 4,816,567) puede adaptarse para producir anticuerpos
 a polipéptidos de esta invención. También, ratones
 trasgénicos u otros organismos tales como otros
 10 mamíferos, pueden emplearse para expresar anticuerpos
 humanizados o humanos (ver, por ejemplo, patentes de
 los E.U.A. números 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825;
 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks et al,
 Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al,
 15 Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-
 13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology
 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology
 14:826 (1996); and Lonberg & Huszar, Intern. Rev.
 Immunol. 13:65-93 (1995)). En forma alterna,
 20 tecnología de exhibición fago puede emplearse para
 identificar anticuerpos y fragmentos Fab
 heteroméricos que ligan específicamente a antígenos
 selectos (ver, por ejemplo, McCafferty et al, Nature
 348:552-554 (1990); Marks et al, Biotechnology
 25 10:779-783 (1992)). También pueden hacerse
 anticuerpos biespecíficos, es decir, capaces de
 reconocer dos antígenos diferentes (ver, por ejemplo,
 WO 93/08829, Traunecker et al, EMBO J. 10:3655-3659
 (1991); y Suresh et al, Methods in Enzymology 121:210
 30 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser

heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos en forma covalente, o inmunotoxinas (ver, por ejemplo la patente de los E.U.A. número 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

5 Métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos amino ácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos amino
10 ácidos no humanos a menudo se refieren a como residuos de importación, que típicamente se toman de un dominio variable de importación. La humanización puede ser realizada esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (ver, por ejemplo, Jones et
15 al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al, Science 239:1534-1536 (1988) and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)), al substituir secuencias CDRs o CDR de roedor por las secuencias
20 correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de los E.U.A. número 4,816,567), en donde substancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha substituido por
25 la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en donde algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR se substituyen por residuos de sitios análogos en
30 anticuerpos roedores.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo, en donde (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia, de manera tal que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula totalmente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, droga, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Como se emplea aquí, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena recta o ramificada monovalente que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, incluyendo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, ter-butilo, pentilo, hexilo y semejantes.

Como se emplea aquí, el término "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que además contienen uno o más substituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfoxilo y semejantes.

Como se emplea aquí, el término "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

Como se emplea aquí, el término "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena recta o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos alquenilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, pentenilo, hexenilo y semejantes.

Como se emplea aquí, el término "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena recta o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos alquinilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexenilo y semejantes.

Como se emplea aquí, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y 1 a 3 anillos y "arilo sustituido" se refiere a grupos

arilo que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos arilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a fenilo, benzilo, naftilo, bifenilo, fenantrenilo, y antrenilo.

Como se emplea aquí, el término "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o semejantes) como parte de la estructura de anillo, que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y 1 a 3 anillos. "Heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos heteroarilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a piridilo, óxido de N-piridilo, indolilo, indazolilo, quinoxalínilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzotienilo, benzofuranilo, benzopiraniilo, benzotiopiraniilo, furaniilo, pirrolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazolilo, imidazolilo, y tienilo.

Como se emplea aquí, el término "alcoxi" se refiere a la porción --O-alquilo- en donde alquilo es como se definió anteriormente y "alcoxi sustituido" se refiere a grupos alcoxi que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se emplea aquí, el término "tioalquilo" se refiere a la porción --S-alquilo-, en donde alquilo es como se definió anteriormente y

"tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

Como se emplea aquí el término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo que contienen anillo, que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que además tienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos cicloalquilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano.

Como se emplea aquí, el término "cicloalquenilo" se refiere a un grupo cicloalquilo de 3 a 8 miembros, que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono (alqueno) en el anillo y "cicloalquenilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquenilo que además tienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Anillos cicloalquenilo útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a 1-ciclopentenilo, 2-ciclopentenilo, 3-ciclopentenilo, 1-ciclohexenilo, 2-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, como también ciclopropenilo, ciclobutenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo. Cicloalcadienilos también son útiles en la presente invención e incluyen pero no están limitados a ciclopentadienilo, ciclohexadienilo, cicloheptadienilo y

ciclooctadienilo.

Como se emplea aquí, el término "heterocíclico" se refiere a grupos cíclicos (es decir que contienen anillo) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o sus semejantes) como parte de la estructura de anillo que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y 1 a 3 anillos. "Heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que además contienen uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente. Grupos heterocíclicos útiles en la presente invención incluyen pero no están limitados a pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperdinilo, piperazinilo, indolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo y dioxano.

Los compuestos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas como formas naturales o de sal. Sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición base (formadas con grupos carboxilo libres u otros aniónicos) que pueden derivarse de bases inorgánicas tales como por ejemplo sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, y semejantes. Estas sales también pueden formarse como sales de adición de ácido con grupos catiónicos libres y en general se formarán con ácidos inorgánicos tales, por ejemplo ácidos clorhídrico,

sulfúrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, p-toluensulfónico, ácido metansulfónico, oxálico, tartárico, mandélico, y semejantes. Sales de la invención incluyen sales de amina formadas por la protonación de un grupo amino con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y semejantes. Sales de la invención también incluyen sales de amina formadas por la protonación de un grupo amino con ácidos orgánicos convenientes tales como ácido p-toluensulfónico, ácido acético, y semejantes. Excipientes adicionales que se contemplan para utilizar en la práctica de la presente invención son aquellos disponibles para aquellos con destreza ordinaria en la especialidad, por ejemplo que se encuentran en la United States Pharmacopeia Vol. XXII and National Formulary Vol. XVII, U.S. Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, Md. (1989), los contenidos relevantes de la cual se incorporan aquí por referencia.

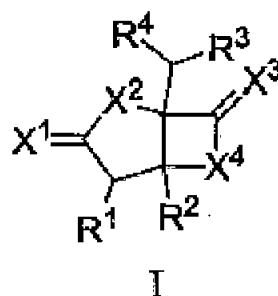
Los componentes de acuerdo con esta invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos y de esta manera ocurrir como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros simples, mezclas diastereoaméricas y diastémeros individuales. El término "estereoisómero" se refiere a compuestos químicos que difieren entre sí solo en la forma en la que grupos diferentes en la molécula se orientan en el espacio. Estereoisómeros tienen el mismo peso molecular, composición química y constitución que

otros pero con átomos agrupados en forma diferente. Esto es, ciertas porciones químicas idénticas están en diferentes orientaciones en el espacio y por lo tanto cuando son puras, tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica que es tan ligera que es indetectable con la actual instrumentación. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención.

Cada carbono estereogénico puede ser de configuración R o S. Aunque los compuestos específicos ejemplificados en esta solicitud pueden ilustrarse en una configuración particular, compuestos que tienen ya sea la estereoquímica opuesta en cualquier centro quiral determinado o sus mezclas, también son previstos. Cuando se encuentran centros quirales en los derivados de esta invención, habrá de entenderse que esta invención abarca todos los estereoisómeros posibles. Los términos "compuesto ópticamente puro" o "isómero ópticamente puro" se refieren a un estereoisómero sencillo de un compuesto quiral independientemente de la configuración del compuesto.

II. Compuestos

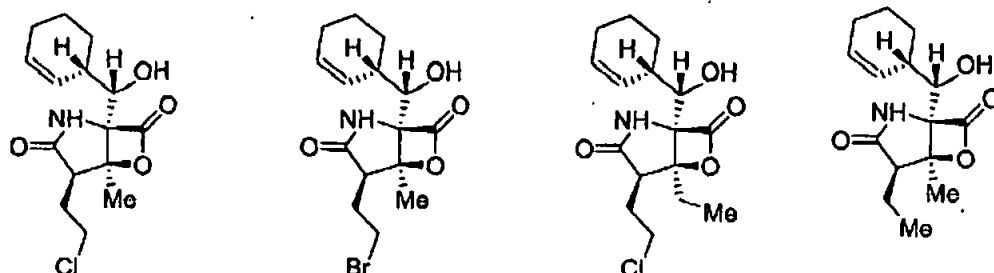
Compuestos útiles en la presente invención incluyen aquellos de la fórmula I:

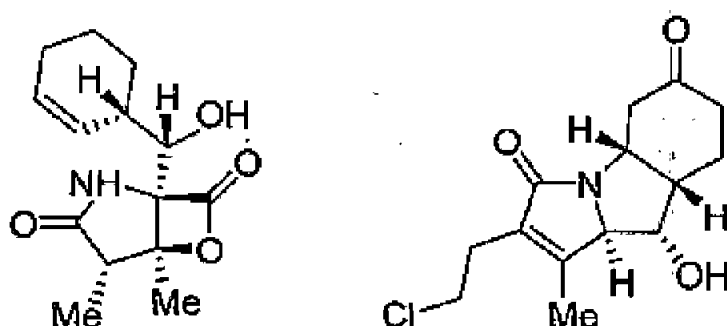
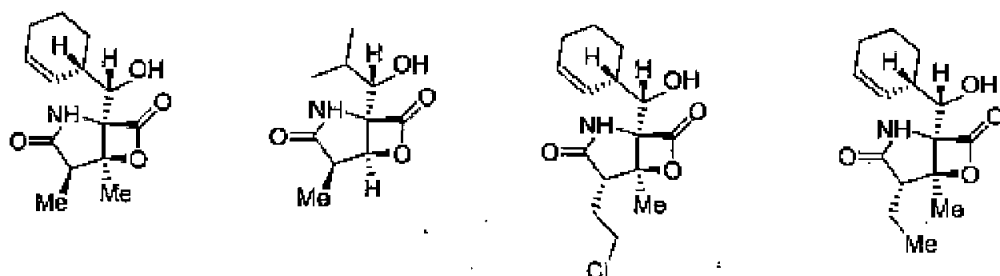


5 en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se eligen
 independientemente del grupo que consiste de H,
 alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo
 sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo,
 arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo
 10 sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido,
 cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi
 sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido,
 hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$,
 acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, y
 15 sulfurilo. R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros
 opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un
 cicloalquenoilo de 5 a 8 miembros opcionalmente
 sustituido con 1 a 8 grupos R^5 . Cada R^5 se elige
 independientemente del grupo que consiste de alquilo,
 20 alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido,
 alquinoilo, alquinoilo sustituido, arilo, arilo
 sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo sustituido.
 Cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 independientemente se
 elige de un grupo que consiste de O, NR^6 y S. Y R^6 es
 25 H o C_1-C_6 alquilo.

Compuestos adicionales útiles en la
 presente invención incluyen los siguientes:

30





Salinosporamidas descritas en *J. Org. Chem.*, 70(16), 6196-6203, 2005 se incorporan aquí por referencia. Adicionales salinosporamidas se describen en US20050049294, aquí incorporada por referencia en su totalidad.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por una variedad de métodos incluyendo fermentación, biosíntesis recombinante y mediante metodologías sintéticas.

A. Fermentación

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por ejemplo por fermentación bacteriana, que genera los compuestos en cantidades suficientes para desarrollo de drogas farmacéuticas y

para pruebas clínicas. En algunas modalidades, los compuestos de la invención se producen por fermentación de las cepas actinomicetos CNB392 y CNB476 en AlBfe+C o medio líquido GKA. Elementos en trazas esenciales son necesarios para el crecimiento y desarrollo del cultivo también habrán de incluirse en el medio de cultivo. Estos elementos en trazas comúnmente ocurren como impurezas en otros constituyentes del medio en cantidades suficientes para cumplir con los requerimientos de crecimiento de los organismos. Puede ser conveniente el agregar pequeñas cantidades (es decir 0.2 mL/L) de un agente antiespumante tal como polipropilén glicol (M. W. de aproximadamente 2000) a un medio de cultivo a gran escala si se vuelve un problema el espumado. Los metabolitos orgánicos se aíslan por absorción en una resina amberlite XAD- 16. Por ejemplo, salinosporamida A se aísla por elusión de la resina XAD-16 con metanol: diclorometano 1:1, que logra aproximadamente 105 mg de extracto crudo por litro de cultivo. Salinosporamida A después se aísla del extracto crudo por cromatografía instantánea de fase inversa seguido por HPLC de fase inversa y HPLC de fase normal, que produce 6.7 mg de salinosporamida A. La Figura 5 y el ejemplo 1 de la patente US 2004/0259856 (incorporado aquí por referencia) establecen un procedimiento de fermentación para la preparación de los compuestos de la presente invención. US20050049294, aquí incorporada por referencia en su totalidad, también proporciona

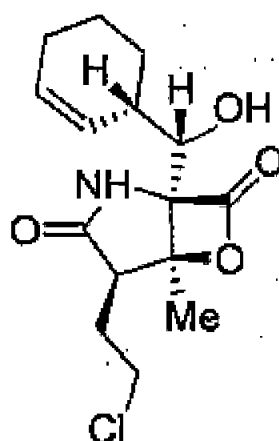
métodos para aislar los compuestos del caldo de fermentación.

B. Biosíntesis recombinante

La biosíntesis recombinante utiliza células
5 que expresan genes clonados y rutas de origen natural
opcionalmente para crear rutas biosintéticas para
producir metabolitos naturales y novedosos (ver por
ejemplo, Altreuter et al, Curr. Opin. Biotechnol.
10 10:130-136 (1999); Reynolds, PNAS 95:12744-12746
(1998); and Cane et al, Science 282:63-68 (1998)).
Varias rutas biosintéticas son posibles para la
producción de compuestos de la presente invención,
incluyendo una ruta de síntesis péptido policetida-no
ribosomal mixta. Las policetidas y péptidos no
15 ribosomales se sintetizan a partir de monómeros de
aminoácidos y ácidos carboxílicos de cadena pequeña,
respectivamente por complejos de proteínas
multifuncionales grandes denominados policetida
sintetasas y sintetasas péptido no ribosomales.
20 US20050049294, aquí incorporada por referencia en su
totalidad, también proporciona información en
biosíntesis recombinante.

C. Procedimiento sintético

Los compuestos de la presente invención
25 también pueden prepararse utilizando procedimientos
de síntesis orgánica standard conocidos en la
especialidad. Un procedimiento sintético ejemplar
puede encontrarse en US 2005/0228186 (incorporada
aquí por referencia) para la síntesis de:



5

Una persona con destreza en la técnica
 10 reconocerá que existen rutas adicionales para la
 preparación sintética de los compuestos de la
 presente invención. US20050049294, aquí incorporada
 por referencia en su totalidad, también proporciona
 información de la síntesis de los compuestos.

15 III. Métodos

Como se describe aquí, salinosporamida A es
 útil para sensibilizar tanto células de cáncer
 sensibles como resistentes a terapia, con base en
 apoptosis cuando se administran en combinación con
 20 cantidades subtóxicas o bajas dosis de reactivos
 terapéuticos de cáncer. La salinosporamida A y la
 cantidad subtóxica o de baja dosis de un terapéutico
 de cáncer, puede administrarse sola a células
 sensibilizadas para terapias subsecuentes o
 25 coadministrar en combinación con quimioterapia,
 radioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia. En
 otra modalidad, la salinosporamida A se utiliza como
 un agente quimioterapéutico después de
 sensibilización celular utilizando un anticuerpo. La
 30 salinosporamida A como un agente terapéutico puede

administrarse sola o co-administrarse en combinación con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal o inmunoterapia. Métodos de uso de salinosporamida A también se describen en las solicitudes de patente de los E.U.A. Número 20050239866 y 20050049294, aquí incorporados por referencia en su totalidad.

Portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular administrada, así como por el método particular empleado para administrar la composición. De acuerdo con esto, hay una amplia variedad de formulaciones convenientes de composiciones farmacéuticas de la presente invención (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., 2003, supra).

Formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir de (a) soluciones líquidas tales como una cantidad efectiva del compuesto suspendido en diluyentes, tales como agua, salino o PEG 400; (b) cápsulas, saquitos o tabletas, cada una que contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones convenientes. Formas de tabletas pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, esterato de magnesio, ácido estárico, y otros excipientes colorantes, rellenos, aglutinantes, diluyentes, agentes amortiguadores, agentes

humectantes, conservadores, agentes saborizantes, colorantes, agentes desintegrantes y portadores farmacéuticamente compatibles. Formas de pastillas o comprimidos pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, por ejemplo sacarosa, así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de ácacia, geles y semejantes que contienen además del ingrediente activo portadores conocidos en la técnica.

El compuesto de elección, solo o en combinación con otros componentes convenientes, puede elaborarse en formulaciones de aerosol (es decir puede ser "nebulizado") para administrarse por inhalación. Formulaciones de aerosol pueden colocarse en los propulsores aceptables a presión tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y semejantes.

Formulaciones convenientes para administración rectal incluyen por ejemplo supositorios, que consisten del compuesto con una base de supositorio. Bases de supositorio convenientes incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible utilizar cápsulas rectales de gelatina que consisten de una combinación del compuesto de selección con una base incluyendo por ejemplo triglicéridos líquidos, polietilen glicoles e hidrocarburos de parafina.

Formulaciones adecuadas para administración

parenteral tales como por ejemplo por rutas intrarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones
5 acuosas y no acuosas, isotónicas estériles de inyección que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del recipiente pretendido, y suspensiones estériles
10 acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservadores. En la práctica de esta invención, las composiciones pueden administrarse por ejemplo por infusión intravenosa,
15 en forma oral, tópica, intraperitoneal, intravesical intratecal. Administración parenteral, administración oral y administración intravenosa son los métodos preferidos de administración. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados
20 de dosis unitaria a múltiples dosis, tales como ampollitas y ampollas.

Soluciones y suspensiones de inyección pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo previamente descrito.
25 Células de transducción por ácidos nucleicos para terapia ex vivo, también pueden administrarse en forma intravenosa o parenteral como se describió anteriormente.

La preparación farmacéutica de preferencia
30 está forma de dosis unitaria. En esta forma, la

preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades unitarias del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación empacada, el empaque contiene cantidades discretas de la preparación, tales como tabletas empacadas, cápsulas y polvos en ampollas o ampolletas. También, la forma de dosis unitaria puede ser una cápsula, tableta, oblea o el comprimido mismo o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma empacada. La composición puede si se desea también contener otros agentes terapéuticos compatibles.

Preparaciones farmacéuticas preferidas suministran uno o los compuestos de la invención, opcionalmente en combinación con uno o más agentes terapéuticos, en una formulación de liberación sostenida. Típicamente, salinosporamida A se administra terapéuticamente como un agente sensibilizante que aumenta la susceptibilidad de células de tumor a otras terapias de cáncer citotóxicas, incluyendo quimioterapia, terapia de radiación, inmunoterapia y terapia hormonal. En algunas modalidades, la salinosporamida A actúa como un reactivo quimioterapéutico después de sensibilización celular utilizando un anticuerpo.

En uso terapéutico para el tratamiento de cáncer, los compuestos utilizados en el método farmacéutico de la invención se administran a una dosis inicial de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg diariamente. Un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0.01 mg/kg a

aproximadamente 500 mg/kg, o aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, puede emplearse. Las dosis sin embargo pueden variar dependiendo de los requerimientos del paciente, la severidad de la condición que se trata y el compuesto que se emplea. Por ejemplo, las dosis pueden ser determinadas empíricamente considerando el tipo y etapa de cáncer diagnosticados en un paciente particular. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, deberá ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica benéfica en el paciente con el tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia naturales y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un compuesto particular en un paciente particular. La determinación de la dosis propia para una situación particular está dentro de la destreza del practicante. En general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son menos que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosis diaria puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea.

Las preparaciones farmacéuticas típicamente se suministran a un mamífero, incluyendo humanos y mamíferos no humanos. Mamíferos no humanos tratados

utilizando los presentes métodos incluyen animales domesticados (por ejemplo, caninos, felinos, murinos, roedores y lagomorfos) y animales agrícolas (bovinos, equinos, ovinos, porcinos).

5

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

10 EJEMPLO I: Sensibilización inducida por Salinosporamida A

1) Sensibilización inducida por Salinosporamida A de líneas de células Daudi y Ramos B-NHL resistentes a droga para apoptosis inducida por CDDP

15 La línea de células Ramos B-NHL resistente a CDDP se trató con diversas concentraciones de Salinosporamida A por una hora y después trató con concentración no tóxica predeterminada de CDDP (15 $\mu\text{g/ml}$) por 20 horas adicionales. Las células
20 después se recolectaron y examinaron para apoptosis utilizando la técnica de yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo que examina fragmentación de ADN. La Figura 1 muestra que el tratamiento de combinación con Salinosporamida A y CDDP resulta en potenciación
25 significativa de la citotoxicidad. Además, el tratamiento con Salinosporamida A solo mostró una citotoxicidad modesta a la concentración de 1 y 10 nM. La potenciación de citotoxicidad se observó primordialmente a muy bajas concentraciones de
30 Salinosporamida A (0.1 nM) y se observó citotoxicidad

sinérgica significativa. Estudios similares se realizaron con la línea celular Daudi B-NHL. Como Ramos, se observó citotoxicidad significativa y la extensión de citotoxicidad fue una función de la concentración de Salinosporamida A empleada (Figura 2A). Estos hallazgos demuestran que la Salinosporamida A sensibiliza tanto células Ramos como Daudi B-NHL a apoptosis inducida por CDDP.

2) Sensibilización mediada por Salinosporamida A de clon Daudi resistente a rituximab (Daudi RR1) para apoptosis inducida por CDDP.

Rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico) se ha empleado en el tratamiento de Linfoma No-Hodgkin solo o en combinación con quimioterapia. La respuesta clínica ha sido muy estimulante; sin embargo, algunos pacientes inicialmente no responden o desarrollan resistencia después de tratamiento. A fin de investigar el mecanismo de resistencia a rituximab hemos desarrollado en nuestro laboratorio clones resistentes a rituximab de líneas celulares B-NHL. Hemos seleccionado ciertos clones para adicional análisis del mecanismo de resistencia subyacente. En el presente estudio hemos examinado el clon Daudi RR1 que es resistente a señalización inducida por rituximab que a diferencia del tipo silvestre Daudi, rituximab falla en sensibilizar Daudi RR1 a apoptosis inducida por droga. Además, hemos encontrado que Daudi RR1 también desarrolla el grado más alto de resistencia a droga en comparación con tipo

silvestre. Investigamos si Salinosporamida A puede sensibilizar Daudi RR1 a apoptosis inducida por CDDP. La Figura 2B demuestra que sin duda Salinosporamida A sensibiliza significativamente Daudi RR1 a apoptosis inducida por CDDP y la extensión de potenciación de citotoxicidad fue una función de la concentración de la Salinosporamida A empleada. Estos hallazgos demuestran que Salinosporamida A puede emplearse químicamente para invertir la resistencia rituximab a quimioterapia.

3) Comparación entre Salinosporamida A y bortezomib en su capacidad para sensibilizar líneas de células B-NHL a apoptosis inducida CDDP

a) Estudio con células de tipo silvestre y Daudi

Examinamos el efecto de Salinosporamida A y bortezomib en su capacidad para sensibilizar células de tipo silvestre Daudi con apoptosis inducida por CDDP. Las células de tumor se trataron por una hora con diversas concentraciones de Salinosporamida A o bortezomib (intervalo 1-15 nM) y después trataron con CDDP (10 μ g/ml) por 20 h adicionales. Las células después se examinaron para apoptosis como se describió anteriormente. Los hallazgos mostrados en la Figura 3A demuestran que ambos agentes producen resultados comparables con respecto a quimiosensibilización y con efectos dependientes de concentración equivalente. Hubo apoptosis significativa por el tratamiento en combinación en todas las concentraciones de inhibidores empleados.

b) Estudio con Daudi RR1

Realizamos experimentos similares como con anterioridad con células Daudi RR1 resistentes a rituximab y los hallazgos se resumen en la Figura 4A.

5 Como el tipo silvestre Daudi, la potenciación significativa de apoptosis se observó por ambos agentes. En el tratamiento de combinación con CDDP, ambos inhibidores mostraron patrones similares de potenciación de citotoxicidad.

10 Los hallazgos tanto con células Daudi como Daudi RR1 demostraron que Salinosporamida A y bortezomib mostraron hallazgos similares bajo las condiciones empleadas y el sistema modelo utilizado. Análisis adicionales por cambio del tiempo de
15 tratamiento y con otras líneas celulares determinarán si ha habido diferencias con respecto a las concentraciones y citotoxicidad cuando se utiliza Salinosporamida A o bortezomib en experimentos de sensibilización.

20 4) Comparación entre Salinosporamida A y el inhibidor NF- κ B, DHMEQ en su capacidad para sensibilizar células de tumor resistentes a droga a apoptosis inducida por CDDP.

a) Estudio con células de tipo silvestre
25 Daudi

DHMEQ es un inhibidor NF- κ B que se ha mostrado selectivo y que evita la translocación de NF- κ B del citoplasma al núcleo (Horiguchi, et al., Expert Rev. Anticancer Ther., 2003, 3(6): 793-8).
30 Hemos reportado que DHMEQ puede sensibilizar células

de tumor resistentes a drogas para apoptosis inducida por drogas. Examinamos los efectos diferenciales de Salinosporamida A y DHMEQ en su capacidad para sensibilizar Daudi a apoptosis inducida por CDDP.

5 Células de tumor se trataron con diferentes concentraciones de DHMEQ (intervalo 1-65 μ M) y Salinosporamida A (intervalo 1-50 nM) por 1 h y después trataron con CDDP (10 μ g/ml) por 20 h adicionales y las células se examinaron por apoptosis

10 como se describió anteriormente. Los hallazgos en la Figura 3B demuestran que DHMEQ puede sensibilizar células Daudi a apoptosis inducida por CDDP y la sensibilización fue una función de la concentración empleada. En forma interesante, la extensión de

15 sensibilización por DHMEQ fue similar a la obtenida con Salinosporamida A, sin embargo hubo una diferencia significativa en la cantidad de inhibidor empleado. Una concentración superior de 4,000 veces empleada con DHMEQ en comparación con Salinosporamida

20 A.

b) Estudio con células Daudi RR1

Estudios similares se realizaron como con anterioridad en a) con células Daudi RR1. Los hallazgos en la Figura 4B demuestran que ambos

25 inhibidores sensibilizan células a apoptosis inducida por CDDP. Patrones similares se obtuvieron por ambos inhibidores; sin embargo, hubo una concentración 4,000 veces superior empleada con DHMEQ en comparación con Salinosporamida A.

30 Este hallazgo demuestra que Salinosporamida

A es un inhibidor superior y agente sensibilizante en comparación con DHMEQ, con base en la concentración empleada. Sin embargo, mayores estudios se requieren para demostrar la selectividad con otras líneas de células de tumor.

5) Conclusiones:

Los hallazgos anteriores han demostrado lo siguiente:

1) Salinosporamida A a muy bajas concentraciones (0.1-10 nM) sensibiliza tanto células de tumor B-NHL resistentes a rituximab y sensibles a rituximab para apoptosis inducida por drogas.

2) Comparando la efectividad de Salinosporamida A y bortezomib en el sistema de modelo empleado, revela que ambos agentes a concentraciones similares sensibilizan células B-NHL para apoptosis inducida por droga.

3) Comparando Salinosporamida A y el inhibidor DHMEQ de NF- κ B específico, reveló que ambos agentes sensibilizan células de tumor a apoptosis inducida por droga; sin embargo, la sensibilización por DHMEQ requiere un aumento de 4,000 veces en la concentración en comparación con Salinosporamida A.

EJEMPLO II: Salinosporamida A como un agente quimioterapéutico para células sensibilizadas con rituximab

Nuestro trabajo publicado con células B-NHL revela que rituximab sensibiliza células de tumor resistentes a drogas a apoptosis inducida por droga.

La sensibilización fue el resultado de inhibición de rutas de supervivencia tales como las rutas Raf-Mek-Erk y NF- κ B. Estas rutas resultan en regulación descendente del producto de gen anti-apoptósico, selectivamente Bcl_{XL} (Jazirehi and Bonavida, 2005). Ya que Salinosporamida A se muestra que es citotóxica en células de tumor sensibles, consideramos que puede comportarse como una droga quimioterapéutica y de esta manera examinamos si rituximab puede sensibilizar células de tumor a apoptosis inducida por Salinosporamida A. Hemos reportado que tratamiento con rituximab de líneas de células B-NHL sensibiliza las células resistentes a drogas a apoptosis inducida por drogas. Uno de los mecanismos por los cuales rituximab sensibiliza las células de tumor a apoptosis inducida por drogas se ha mostrado que está mediado por inhibición de la ruta NF- κ B y corriente abajo de la inhibición selectiva del producto anti-apoptósico de expresión BCL_{XL}. Los inhibidores de esta ruta imitan rituximab en sensibilizar las células a apoptosis inducida por droga (Jazirehi, et al, 2005, Cancer Research, 65(1):264-76). Teorizamos que los inhibidores de proteasoma que inhiben la actividad de NF- κ B y los productos de gen anti-apoptósicos corriente abajo pueden sensibilizar células de tumor para apoptosis inducida por droga. El nuevo inhibidor de proteasoma Salinosporamida A (Nereus Pharmaceuticals), que inhibe la actividad NF- κ B, se ha mostrado que sensibiliza células B-NHL a apoptosis inducida por

droga (CDDP, adriamicina). Salinosporamida A también se ha mostrado que extermina directamente células de tumor sensibles por apoptosis. También, Salinosporamida A induce apoptosis en células de mieloma múltiples resistentes a terapias convencionales y bortezomib (Chauhan et al., Cancer Cell 2005 In Press).

Teorizamos que Salinosporamida A puede comportarse como una droga quimioterapéutica y rituximab por lo tanto puede sensibilizar las células de tumor a apoptosis inducida por Salinosporamida A. Células Ramos se trataron con rituximab (20 μ g/ml) (12h a 18h) y las células se trataron con diversas concentraciones de Salinosporamida A (1-10 nM) por 20 h adicionales y las células se examinaron por apoptosis utilizando el método PI que detecta fragmentación de ADN por citometría de flujo. El tratamiento combinado resultó en apoptosis significativa. La actividad sinérgica se detectó con muy bajas concentraciones de Salinosporamida A $\geq$ InM. Por comparación, concentraciones varios miles de veces superiores de drogas quimioterapéuticas (por ejemplo CDDP, adriamicina) se emplearon para quimiosensibilización mediada por rituximab de células Ramos. También examinamos que células Daudi resistentes a Salinosporamida A después de tratamiento con rituximab por 1 h y Salinosporamida A por 20 h adicionales y apoptosis se midió como con anterioridad. Los hallazgos en la Figura 5 muestran que la combinación de rituximab (20 μ g/ml) y

Salinosporamida A (10 nM) resultaron en significativa apoptosis y se logró sinergia.

Estos hallazgos demuestran que la combinación de rituximab y Salinosporamida A pueden ser una opción terapéutica para el tratamiento de resistencia a drogas y células de tumor resistentes. La Figura 6 muestra que en comparación a quimiosensibilización mediada por rituximab a CDDP, hemos encontrado que rituximab sensibiliza la apoptosis inducida por Salinosporamida A con un nivel superior que CDDP. Los estudios revelan que rituximab puede sensibilizar células de tumor resistentes a droga a apoptosis inducida por Salinosporamida A.

Además encontramos que rituximab sensibiliza células a apoptosis inducida por Salinosporamida A a un nivel superior que adriamicina (ADR). Como se muestra en la Figura 8, mientras que el solo tratamiento de células con Salinosporamida A no mostró efectos citotóxicos detectables, pre-tratamiento de células de tumor con rituximab resultó en sensibilización significativa de las células de tumor a apoptosis inducida por Salinosporamida A y se logró sinergia. La sensibilización de rituximab a apoptosis inducida por Salinosporamida A fue mayor que la lograda con ADR. La Figura 8 también muestra que bajas concentraciones de Salinosporamida A InM induce significativa apoptosis en células de tumor pre-tratadas con rituximab. Superiores concentraciones de Salinosporamida A (10 nM) parecen

ser menos efectivas debido a pérdida de células.

Estos resultados demuestran que rituximab sensibiliza las células de tumor a la apoptosis mediada por el inhibidor de proteasoma Salinosporamida A. Además, los hallazgos sugieren que rituximab (o agentes quimiosensibilizantes) empleados en combinación con Salinosporamida A pueden resultar en actividad sinérgica y pueden invertir la resistencia a droga y/o rituximab de B-NHL.

10 EJEMPLO III: Inducción de Salinosporamida A de proteína inhibidora Raf-cinasa (RKIP)

La adquisición de resistencia a terapias convencionales tales como quimioterapia, radiación, e inmunoterapia permanece siendo un obstáculo principal en el tratamiento exitoso de cáncer. Entre los mecanismos de resistencia está la adquisición de resistencia a estímulos apoptóticos por células de tumor. Por lo tanto, las células de tumor desarrollan mecanismos para resistir la apoptosis y exhibir hiperactivación constitutiva de supervivencia y rutas de señalización anti-apoptóticas. Los supresores de tumor existen en células normales que regulan en forma negativa la supervivencia de la célula y mejoran la respuesta a estímulos apoptóticos. La desregulación de estos controles puede regular la supervivencia de la célula y la proliferación lleva a transformación neoplástica. De esta manera, la mayoría de las células de tumor tienen una expresión desregulada o función de supresores de tumor funcionales a través de delección

15
20
25
30

o mutación o baja expresión. Por lo tanto, agentes que pueden regular en forma ascendente la expresión de supresores de tumor funcionales serán útiles para contra-atacar las rutas anti-apoptóticas y de supervivencia en células de tumor. Estos agentes se esperará que inhiban proliferación de células de tumor o supervivencia y/o sensibilizar células al efecto citotóxico de terapias citotóxicas convencionales.

Como se ilustra en la Figura 9, el tratamiento de células de tumor con Salinosporamida A resulta en la inducción del supresor de tumor, proteína inhibidora Raf-cinasa (RKIP). RKIP es un miembro de la familia proteína de enlace fosfatidiletanolamina (PEBP = phosphatidylethanolamine-binding protein). Células Ramos se trataron con Salinosporamida A 10 nM por diversos periodos de tiempo, y se examinaron lisados de células totales para la expresión de RKIP por análisis de transferencia western. La expresión de β -actina se empleó como control. Los datos en la Figura 9 muestran que hay un aumento en los niveles de proteína RKIP después de una exposición de 15 minutos de células Ramos a Salinosporamida A 10 nM.

Se ha mostrado que RKIP inhibe las rutas de señalización Raf/MEK/ERK 1/2 y supervivencia NF- κ B, y consecuentemente, la expresión de varios productos de genes anti-apoptóticos que se regulan por estas rutas. Además, la expresión de RKIP se ha mostrado que invierte la resistencia de células de

cáncer resistentes a droga para apoptosis inducida por droga. Además, expresión RKIP se ha encontrado que se deprime en tumores primarios en comparación con tejidos normales y se ha encontrado que se pierde después de malignidad y metastasis en tumores. De esta manera, la habilidad de Salinosporamida A para inducir la expresión de RKIP en células de tumor, proporciona un objetivo terapéutico novedoso para evitar o invertir la resistencia terapéutica de células de cáncer y puede ser especialmente útil para tratar metástasis.

EJEMPLO IV: Salinosporamida A inhibe la expresión de YY1

Como se ilustra en la Figura 10, el tratamiento de células de tumor con Salinosporamida A resulta en la inhibición de expresión de la proteína reguladora de transcripción YY1. YY1 es un receptor de transcripción que se sobre-expresa en células de cáncer y se ha mostrado que juega un papel para mantener la resistencia de células de tumor para diversos agentes terapéuticos. Las células Ramos se trataron con diversas concentraciones de Salinosporamida A por 24 horas, y los lisados totales celulares se examinaron por la expresión de YY1 por análisis de transferencia western y por RT-PCR. La expresión de β -actina se emplea como control. Los datos en la Figura 10 muestran que hay una disminución en los niveles de proteína YY1 después de una exposición de 24 horas de células Ramos a diversas concentraciones de Salinosporamida A.

EJEMPLO V: Análogos de Salinosporamida A

Análogos de Salinosporamida A, como se muestra en la Fórmula I y en US 20050049294 se prueban por actividad como agentes sensibilizantes y como agentes quimioterapéuticos, como se describe anteriormente en los ejemplos I, II y VI.

EJEMPLO VI: Salinosporamida A activa caspasa 9 e inhibe expresión de Bcl-xL.

Las Figuras 13 y 14 demuestran que el tratamiento de Salinosporamida A de células de activación de caspasa 9, y también inhibe la expresión del gen anti-apoptósico BCLx1. La activación de caspasa 9 indica que Salinosporamida A activa a los mitocondrios y apoptosis tipo II y facilita su activación directa o indirecta de las caspasas efectoras 3 y 7 para apoptosis. La inhibición de BCLx1 por Salinosporamida A demuestra que inhibe un factor anti-apoptósico clave que regula la resistencia en muchos tumores. También sugiere que la inhibición mediada por Salinosporamida A de BCLx1 puede ser responsable en parte por su efecto sensibilizante en células de tumor resistentes.

EJEMPLO VII: Salinosporamida A induce PTEN e inhibe PTN

Los hallazgos en la Figura 15 demuestran que Salinosporamida A induce expresión del inhibidor fosfatasa PTEN, o la ruta de supervivencia de célula AKT. Esta inducción inhibe la ruta AKT anti-apoptósica y contribuye a sensibilización inducida por Salinosporamida A a apoptosis. Además, la mayoría

de las células de tumor resistentes expresan bajos niveles de PTEN, y PTEN es un blanco para intervención terapéutica así como un biomarcador.

Los hallazgos en la Figura 16 demuestran que Salinosporamida A inhibe la expresión del factor de crecimiento pleiotrofina (PTN). PTN se ha reportado que es elevada en células de tumor y la circulación de pacientes de cáncer es de significancia para pronóstico. Además, la inhibición de PTN contribuye al efecto sensibilizante de Salinosporamida A. PTN también es un blanco para intervención terapéutica.

EJEMPLO VII: Salinosporamida A regula a la alta receptor de muerte DR5 y sensibiliza células de tumor a apoptosis inducida a TRAIL

Las Figuras 17 A y B, 18 y 19 demuestran que la Salinosporamida A regula a la alta la expresión del receptor de muerte DR5 TRAIL y sensibiliza células de tumor resistentes TRAIL a apoptosis mediada TRAIL. Estos hallazgos demuestran también que Salinosporamida A es un agente terapéutico que puede emplearse en combinación con TRAIL o anti-DR5 agonista/mAMBS DR5 en el tratamiento de células resistentes TRAIL/droga.

Referencias:

- Feling, et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42(3): 355-357
- Horiguchi, et al., Expert Rev. Anticancer Ther., 2003, 3(6): 793-8.
- Jazirehi and Bonavida, Oncogene. 2005,

24(13):2121-43.

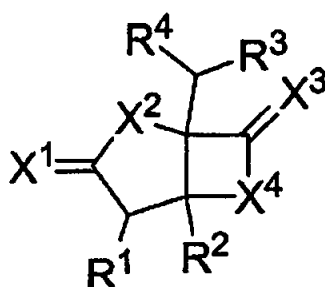
Macherla, et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48:3684

Suzuki, et al., AACR Annual Meeting,
5 Abstract number 5429, April 1-5, 2006.

Se entiende que los ejemplos y modalidades
descritos aquí, son para propósitos ilustrativos
solamente y que diversas modificaciones o cambios a
la luz de la misma serán sugeridos a personas con
10 destreza en la técnica y habrán de incluirse dentro
del espíritu y alcances de esta solicitud y objetivos
de las reivindicaciones anexas. Todas las
publicaciones, patentes y solicitudes de patentes
aquí citadas aquí se incorporan por referencia en su
15 totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo para terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



I

,

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo

sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de R^1 y R^2 independientemente se elige del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, y cicloalquilo sustituido; R^3 se elige del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo; R^4 es un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1-8 grupos R^5 ; cada uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque cada uno de R^1 y R^2 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, y alquinilo sustituido; R^3 se elige del grupo que consiste de alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, y amino; R^4 es ciclohexenilo opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R^1 es un

alquilo o alquilo sustituido; R^2 es alquilo; R^3 es hidroxilo; R^4 es ciclohexenilo; y cada uno de X^1 , X^3 y X^4 es O; y X^2 es NH.

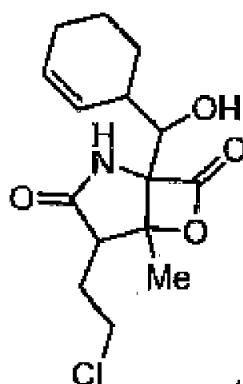
5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el alquilo sustituido de R^1 es un alquilo halogenado.

6. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el alquilo halogenado es un alquilo fluorado.

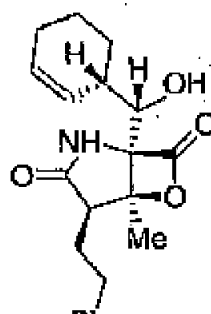
7. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el alquilo halogenado es un alquilo clorado.

8. El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el alquilo halogenado es un alquilo bromado.

9. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el compuesto tiene la siguiente estructura:



10. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el compuesto tiene la siguiente estructura:



5

11. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para inhibir expresión de un producto de gen anti-apoptósico, de esta manera induciendo apoptosis

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el producto de gen anti-apoptósico es Bcl-xL.

13. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para regular actividad de receptor de muerte TRAIL y actividad de ligando FAS, de esta manera induciendo apoptosis.

14. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I, es suficiente para inducir expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 1 vez superior que en la ausencia del compuesto de la

Formula I.

16. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 2 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

17. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 10 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

18. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 100 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

19. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para disminuir expresión de YY1 o PTN, de esta manera induciendo apoptosis.

20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo para terapia de cáncer es un reactivo quimioterapéutico, un reactivo inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, o un reactivo terapéutico hormonal.

21. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cáncer se elige del grupo que consiste de: linfoma no-

Hodgkin's, linfoma linfoblástico agudo B, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de colon, leucemia, mieloma múltiple y hepatocarcinoma.

5 22. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el cáncer es linfoma.

 23. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el cáncer es
10 linfoma no-Hodgkin.

 24. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo para terapia de cáncer induce apoptosis.

 25. El método de conformidad con la
15 reivindicación 24, caracterizado porque el reactivo para terapia de cáncer es un reactivo quimioterapéutico, un reactivo inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, o un reactivo terapéutico hormonal.

20 26. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el reactivo de terapia de cáncer es inmunoterapia con rituximab.

 27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el cáncer es
25 B-NHL.

 28. El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque la apoptosis es apoptosis inducida por TRAIL o apoptosis inducida por ligando FAS.

30 29. El método de conformidad con la

reivindicación 1, caracterizado porque el cáncer es resistente a terapia.

30. El método de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque la terapia se
5 elige del grupo que consiste de inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal.

31. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el cáncer es sensible a terapia.

10 32. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad periódicamente efectiva de un reactivo de terapia de cáncer y la cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Formula I, se administran en forma
15 concurrente.

33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el reactivo para terapia de cáncer comprende administración de bortezomib.

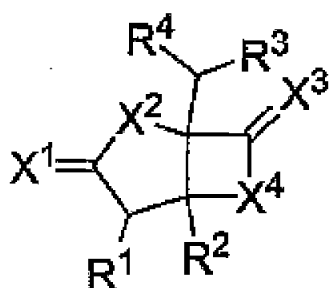
20 34. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el reactivo para terapia de cáncer es un reactivo quimioterapéutico, un reactivo inmunoterapéutico, un reactivo radioterapéutico, o un reactivo terapéutico
25 hormonal.

35. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo para terapia de cáncer y la cantidad sensibilizante efectiva de un
30 compuesto de la Formula I, se administran

secuencialmente.

36. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el sujeto es un humano.

5 37. Un método para evitar o inhibir linfoma, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo para terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de
10 un compuesto de la Fórmula I:



15

en donde I , cada uno de R¹, R² y R³

independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfurilo; R⁴ es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵ o un cicloalquenilo de
20 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8
30

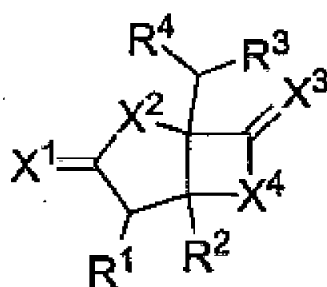
grupos R^5 ; cada R^5 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

38. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para inducir expresión de RKDP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

39. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el linfoma es resistente a terapia.

40. El método de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque el linfoma es resistente a terapia con rituximab.

41. Un método para evitar o inhibir linfoma, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



I

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo.

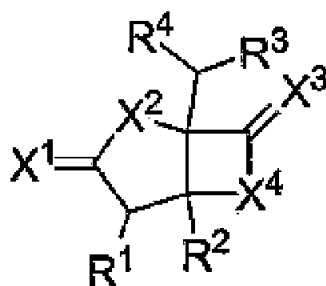
42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la cantidad sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I es suficiente para inducir expresión de RKJDP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

43. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de

la Fórmula I en un excipiente fisiológicamente aceptable.

44. Un equipo que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Fórmula I.

45. Un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer con terapia de inhibidor proteasoma, el método comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad sensibilizante efectiva de un reactivo quimiosensibilizante o anticuerpo y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



I

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcóxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$,

acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y
 sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros,
 opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un
 cicloalqueno de 5 a 8 miembros opcionalmente
 5 sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5
 independientemente se elige del grupo que consiste
 de: alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno
 sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo,
 arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo
 10 sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige
 independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6
 y S; y R^6 es H o C_1 - C_6 alquilo.

46. El método de conformidad con la
 reivindicación 45, caracterizado porque la cantidad
 15 sensibilizante efectiva del compuesto de la Fórmula I
 es suficiente para inducir expresión de RKIP o PTEN,
 de esta manera induciendo apoptosis.

47. El método de conformidad con la
 reivindicación 45, caracterizado porque el anticuerpo
 20 es rituximab.

48. El método de conformidad con la
 reivindicación 45, caracterizado porque el cáncer es
 linfoma.

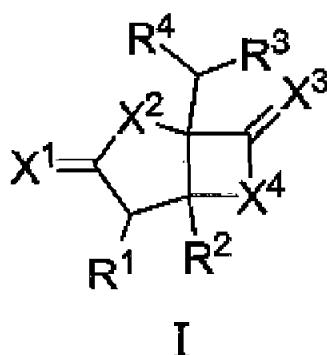
49. Una composición que comprende una
 25 cantidad sensibilizante efectiva de rituximab y una
 cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de
 la Fórmula I en un excipiente fisiológicamente
 aceptable.

50. Un equipo que comprende una cantidad
 30 sensibilizante efectiva de rituximab y una cantidad

terapéuticamente efectiva de un compuesto de la
Formula I.

51. Un método para tratar, evitar o inhibir
un cáncer, el método comprende la etapa de
5 administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente
efectiva de un compuesto de la Fórmula I:

Un método, evitar o inhibir linfoma, el método se
caracteriza porque comprende la etapa de administrar
a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de
10 rituximab y una cantidad sensibilizante efectiva de
un compuesto de la Fórmula I:



en donde cada uno de R¹, R² y R³ independientemente se
20 eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo
sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,
alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo
sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,
heterocíclico, heterocíclico sustituido,
25 cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi
sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido,
hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H,
acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y
sulfurilo; R⁴ es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros,
30 opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵ o un

cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 1 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

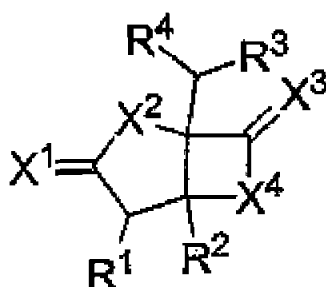
53. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 2 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

54. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 10 veces superior que en la ausencia del compuesto de la Formula I.

55. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la expresión de RKIP o PTEN es al menos aproximadamente 100 veces

superior que en la ausencia del compuesto de la
Formula I.

56. Un método para tratar, evitar o inhibir
linfoma, el método comprende la etapa de administrar
a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de
un compuesto de la Fórmula I:

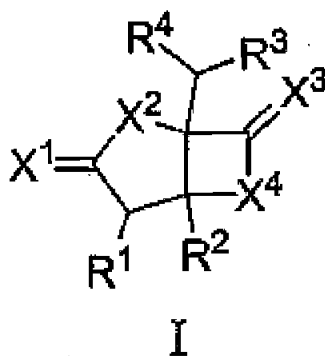


I

en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se
eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo
sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido,
alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo
sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,
heterocíclico, heterocíclico sustituido,
cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi
sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido,
hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$,
acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y
sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros,
opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un
cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente
sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5
independientemente se elige del grupo que consiste
de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo

sustituido, alquínilo, alquínilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1 - C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

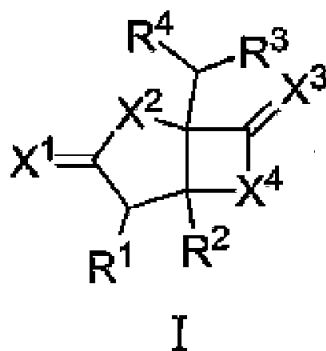
57. Un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, con terapia de inhibidor de protoezoma, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva d de un compuesto de la Fórmula I:



en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquénilo, alquénilo sustituido, alquínilo, alquínilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido,

hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$,
 acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y
 sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros,
 opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un
 5 cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente
 sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5
 independientemente se elige del grupo que consiste
 de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo
 sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,
 10 arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo
 sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige
 independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6
 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad
 terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir
 15 la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera
 induciendo apoptosis.

58. Un método para tratar un cáncer
 resistente a terapia, el método se caracteriza porque
 comprende la etapa de administrar a un sujeto una
 20 cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de
 la Fórmula I:



en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfurilo; R^4 es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 o un cicloalquenilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R^5 ; cada R^5 independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y X^4 se elige independientemente del grupo que consiste de: O, NR^6 y S; y R^6 es H o C_1-C_6 alquilo, y en donde la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para inducir la expresión de RKIP o PTEN, de esta manera induciendo apoptosis.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente solicitud demuestra que Salinosporamida A puede utilizarse para sensibilizar células de cáncer a terapia de cáncer. Además, la
5 presente solicitud demuestra que Salinosporamida A actúa como un agente terapéutico para exterminar o inhibir células de cáncer después de sensibilización de las células por un anticuerpo u otros reactivos quimiosensibilizantes. Las células de cáncer pueden
10 ya ser sensibles a terapia o resistentes a terapia. La presente solicitud además demuestra que Salinosporamida A induce la expresión de proteína inhibidora de Raf cinasa (RKIP = Raf kinase inhibitor protein) y PTEN, proteínas supresoras de
15 tumor, e inhibe la expresión de YY1, una proteína reguladora de transcripción sobre expresada en células de cáncer y también inhibe la pleiotrofina factor de crecimiento (PTN = growth factor pleiotrophin).

20

25

0725 F081003-Final

Fig. 1
 NPI-0052 sensibiliza línea de células B-NHL
 Ramos a apoptosis inducida por CDDP

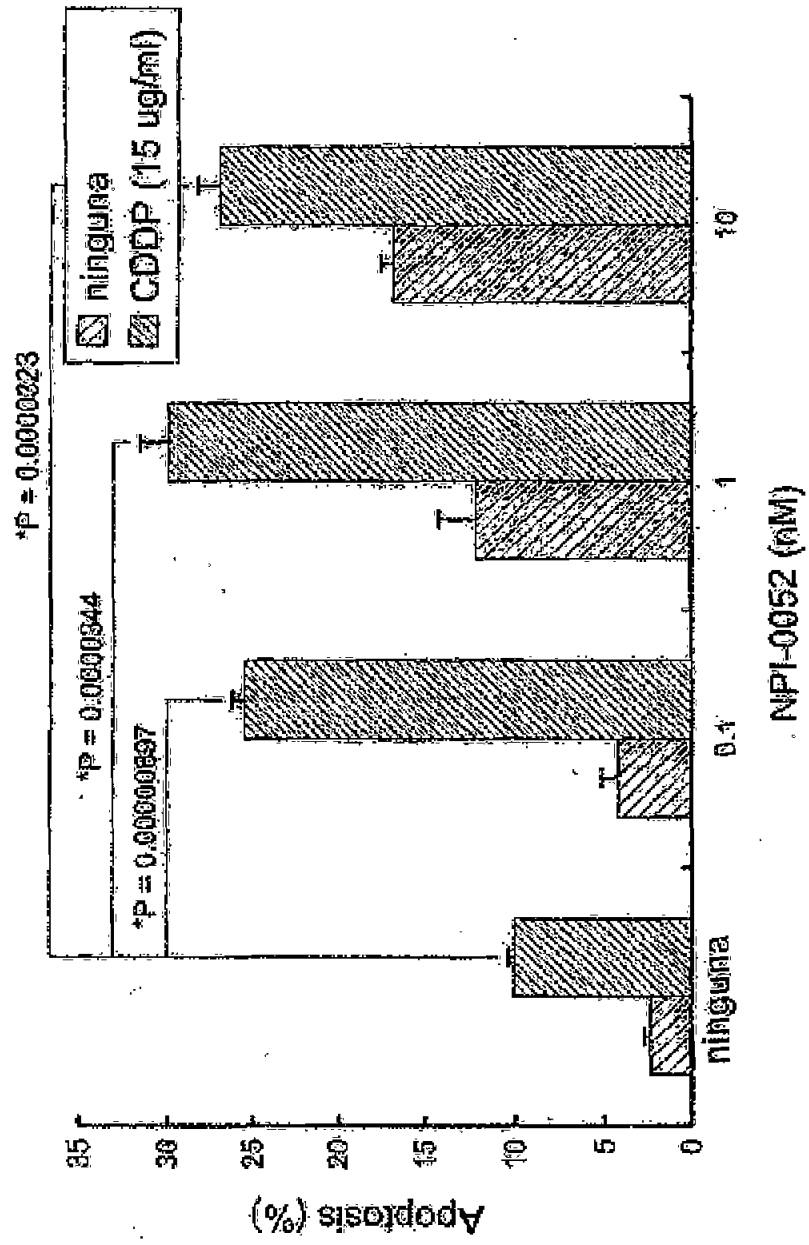


Fig. 1
 JH-8 cells exposed to CDDP and treated with S200-191
 Apoptosis induction by CDDP

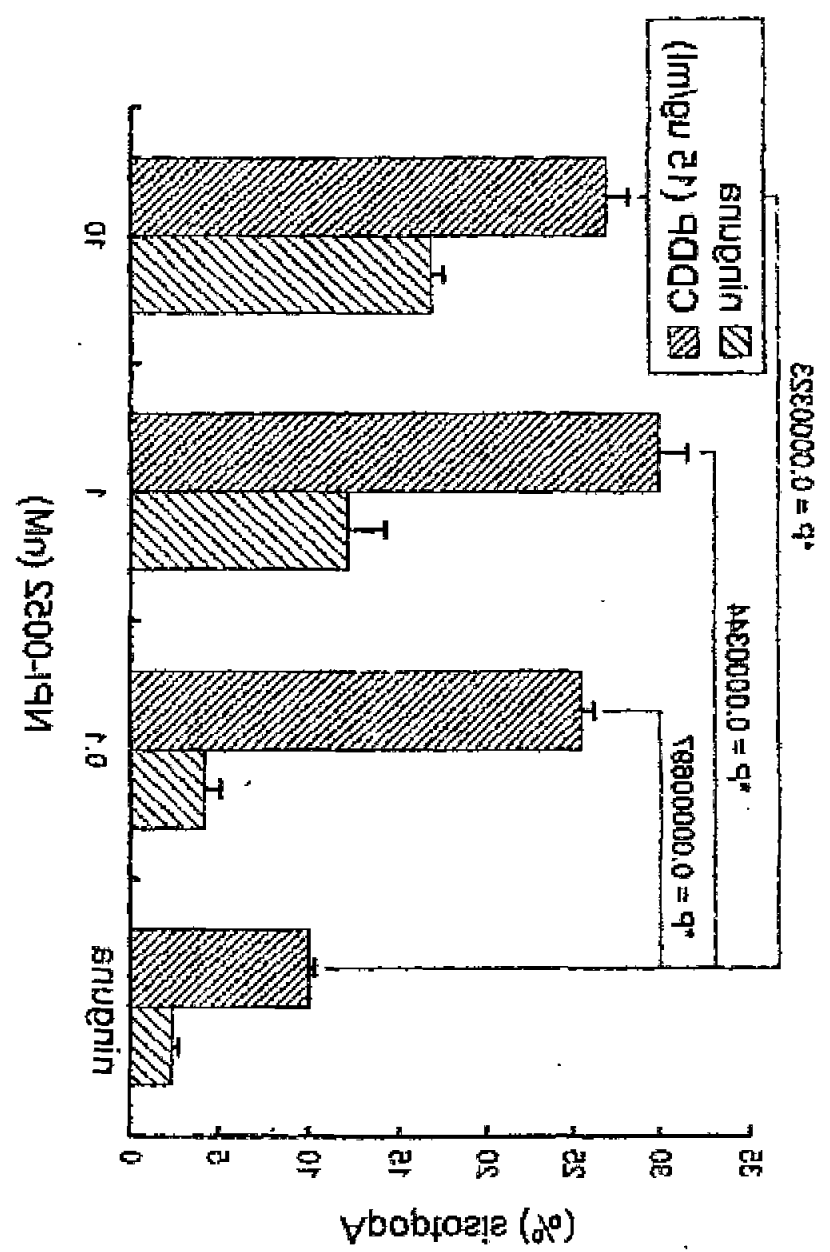
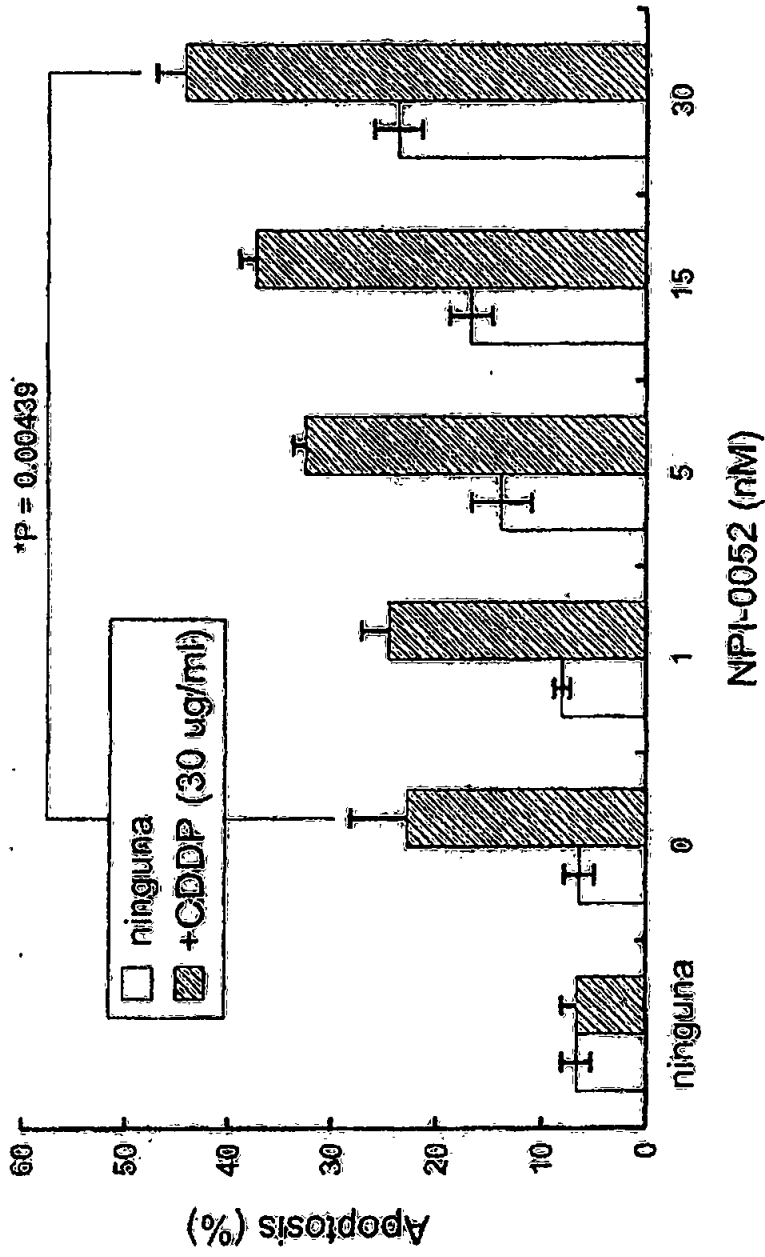
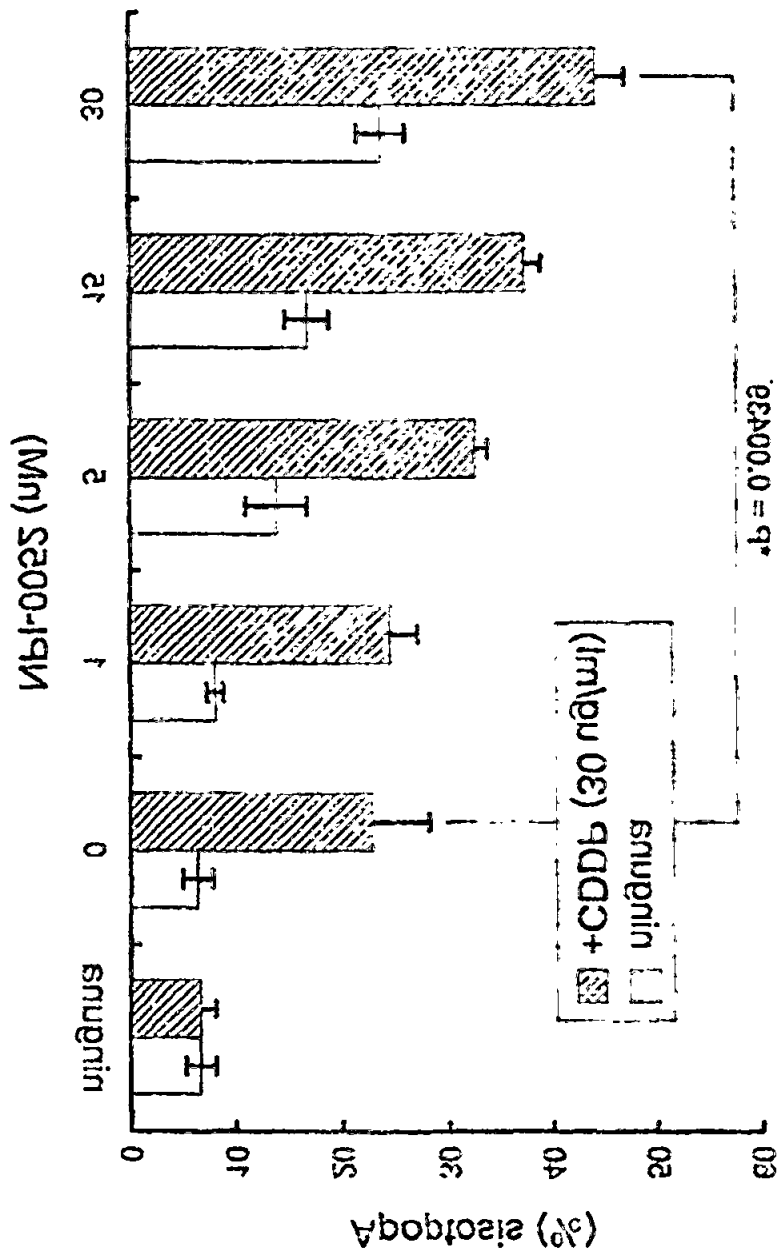


Fig. 2a
NPI-0052 sensibiliza línea de células B-NHL
Daudi a apoptosis inducida por CDDP

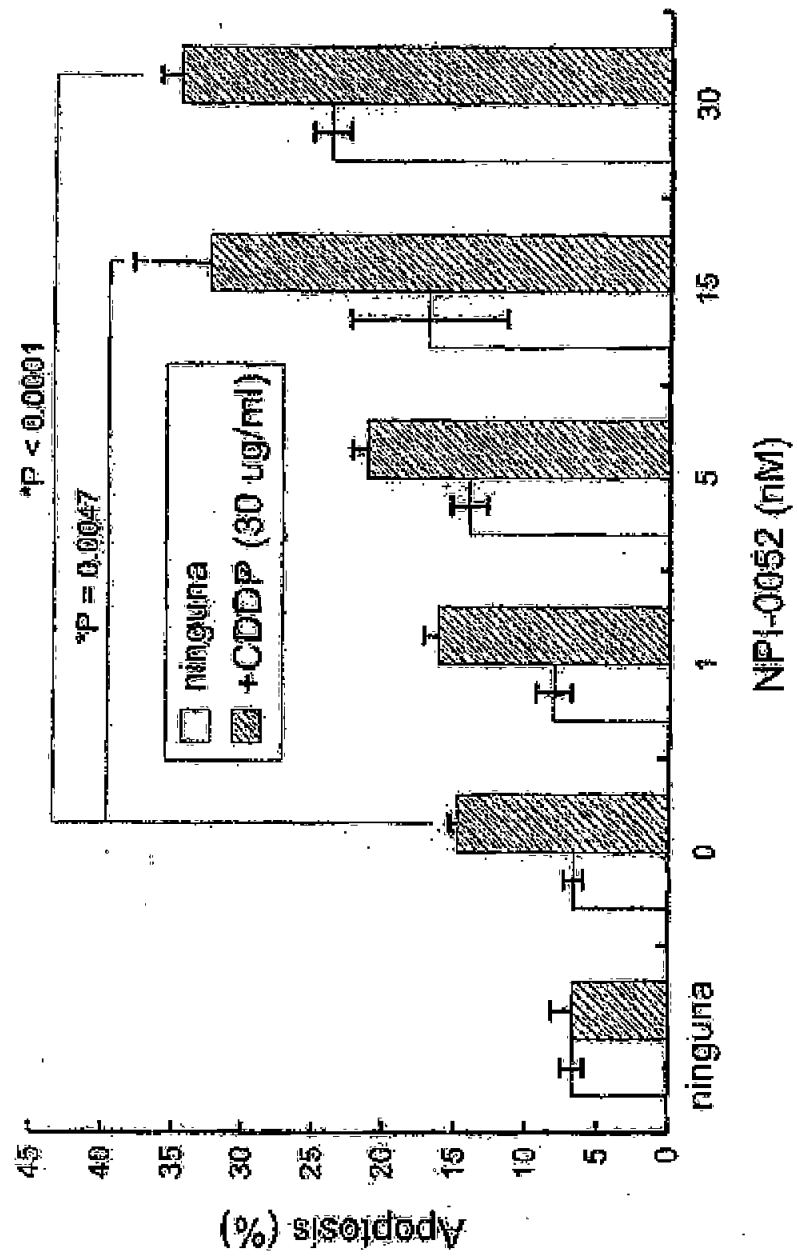




JH1-B cells exposed to CDDP and S300-191
 Apoptosis induction by CDDP

Fig. 5a

Fig. 2b
NPI-0052 sensibiliza línea de células Daudi RR1
resistentes a B-NHL Rituximab, a apoptosis inducida por CDDP



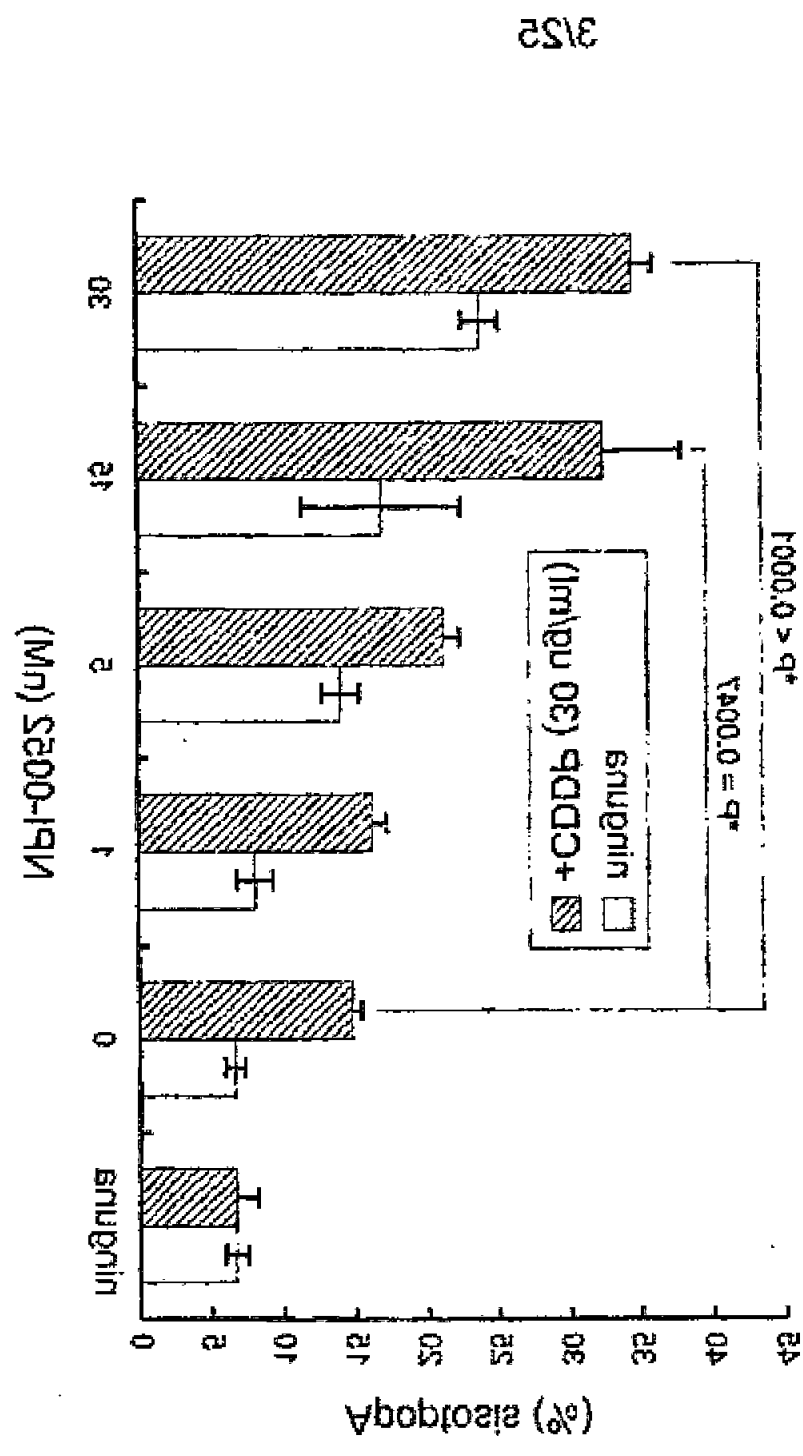
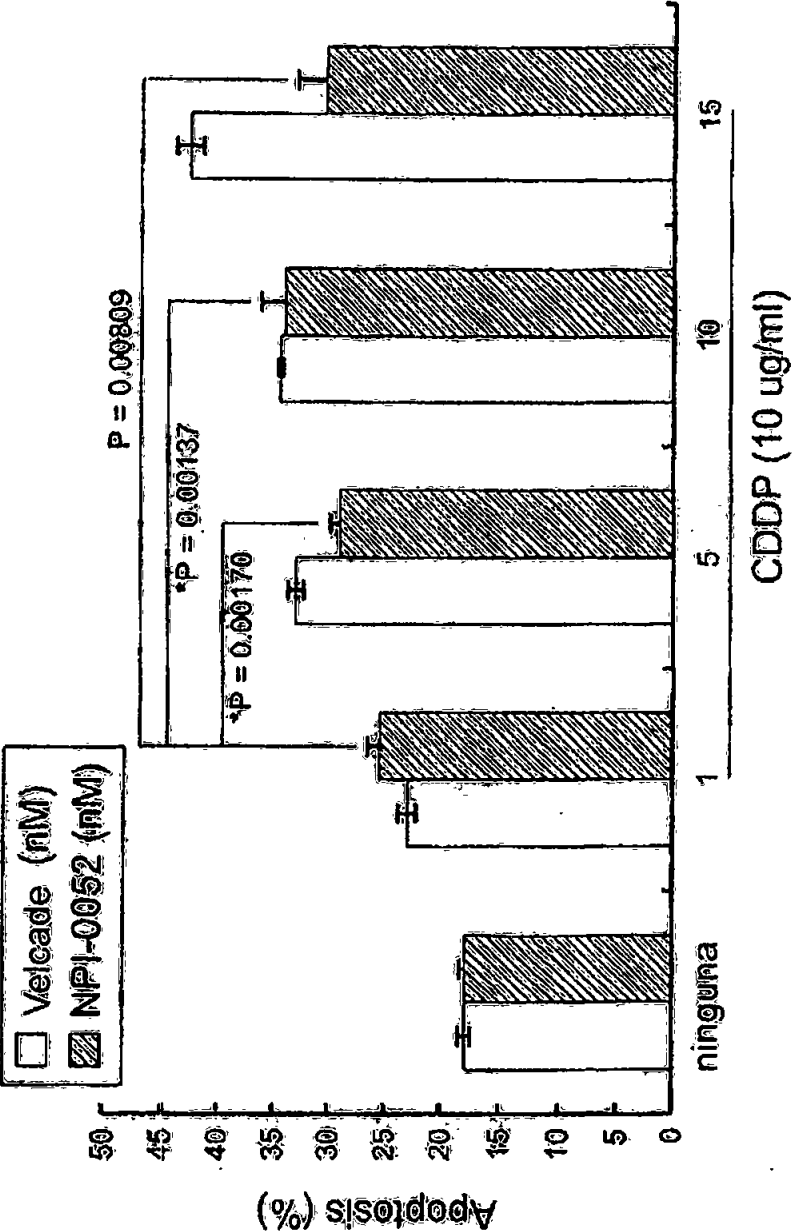


Fig. 5b
 IP1-0025 sensitizes lines de células Dnsq1 RFR
 resistentes a B-MH-Rituximab, a apoptose induzida por CDDP

Fig. 3a
Combinación entre sensibilización inducida por NPI-0052 y
Velcade a células B-NHL Daudi WT a apoptosis inducida por CDDP



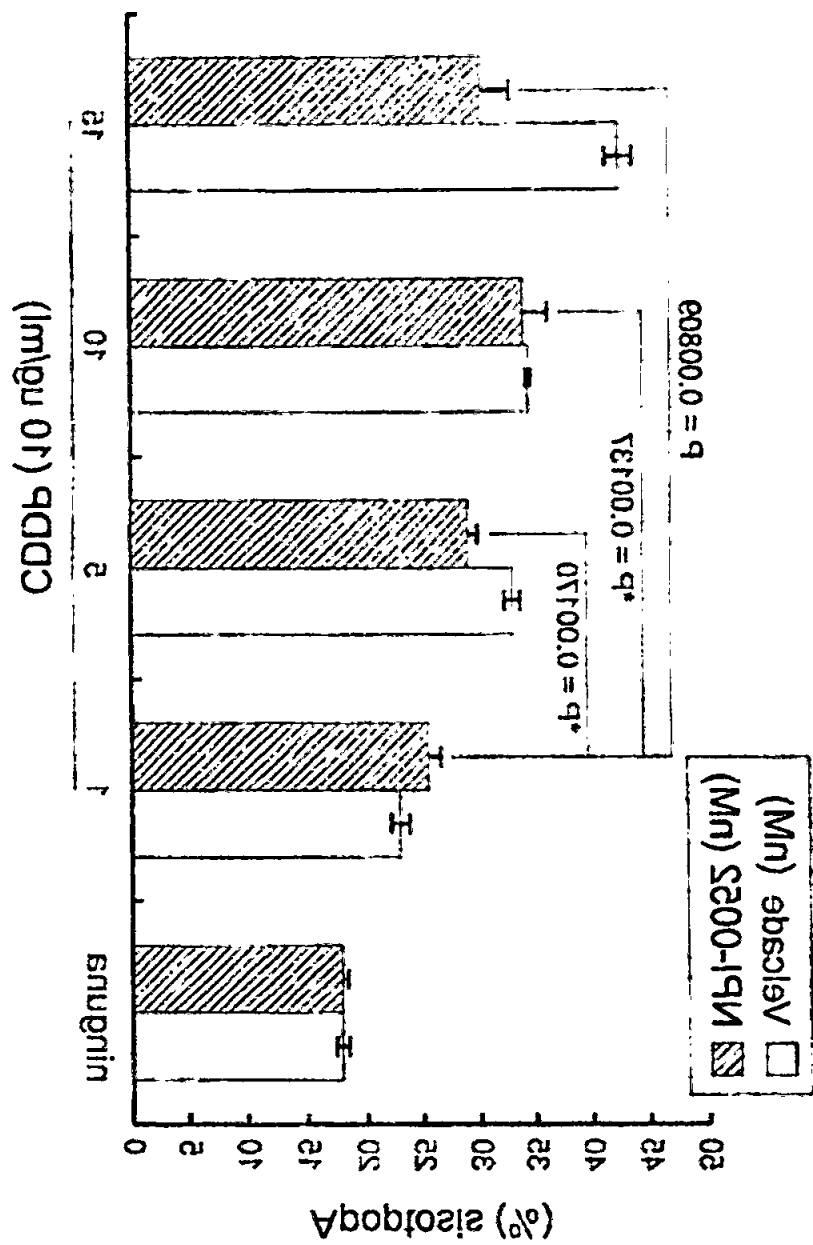
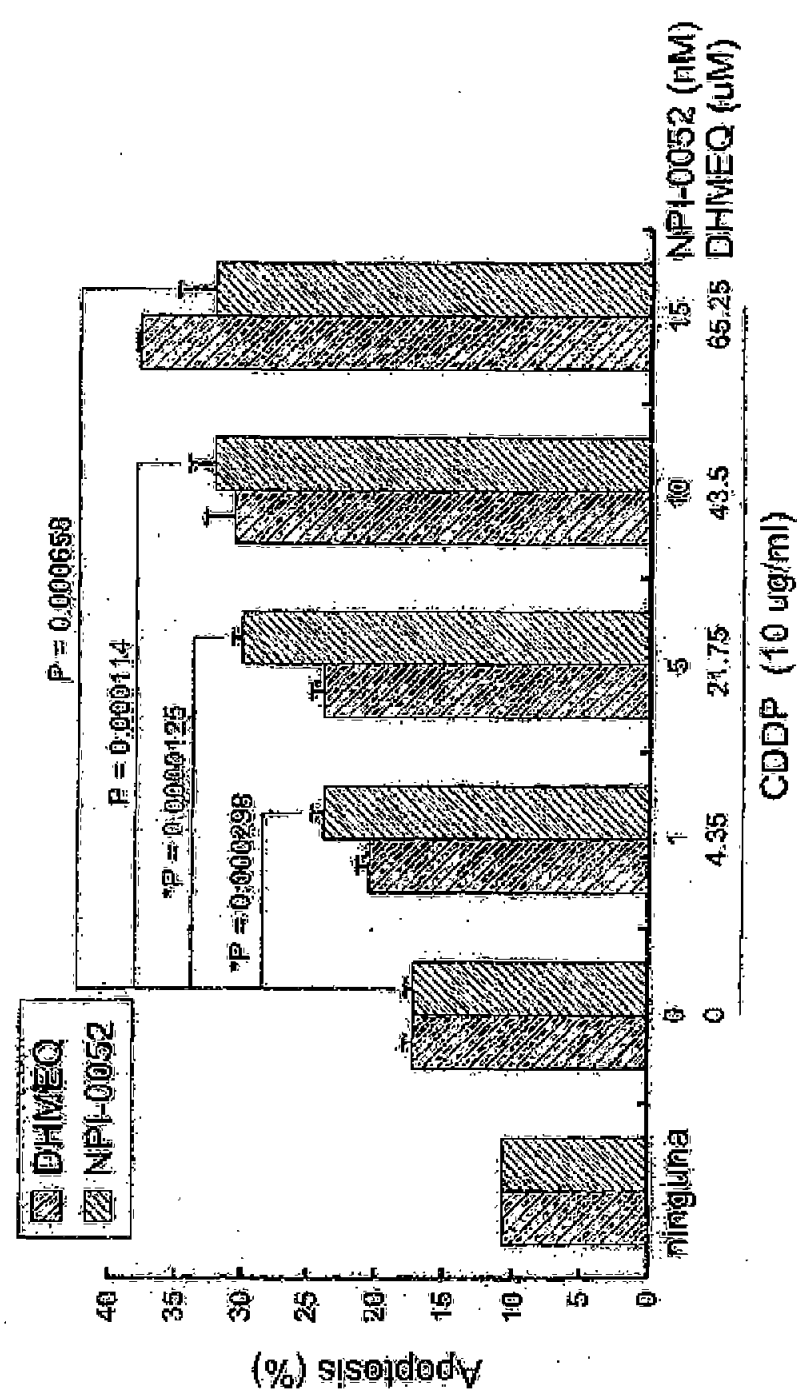


Fig. 3
Comparison of the sensitivity of (Mn) and (Mn) S200-19M cells to CDDP-induced apoptosis

Fig. 3b
Combinación entre sensibilización inducida por NPI-0052 y
DHMEQ a células B-NHL Daudi WT a apoptosis inducida por CDDP



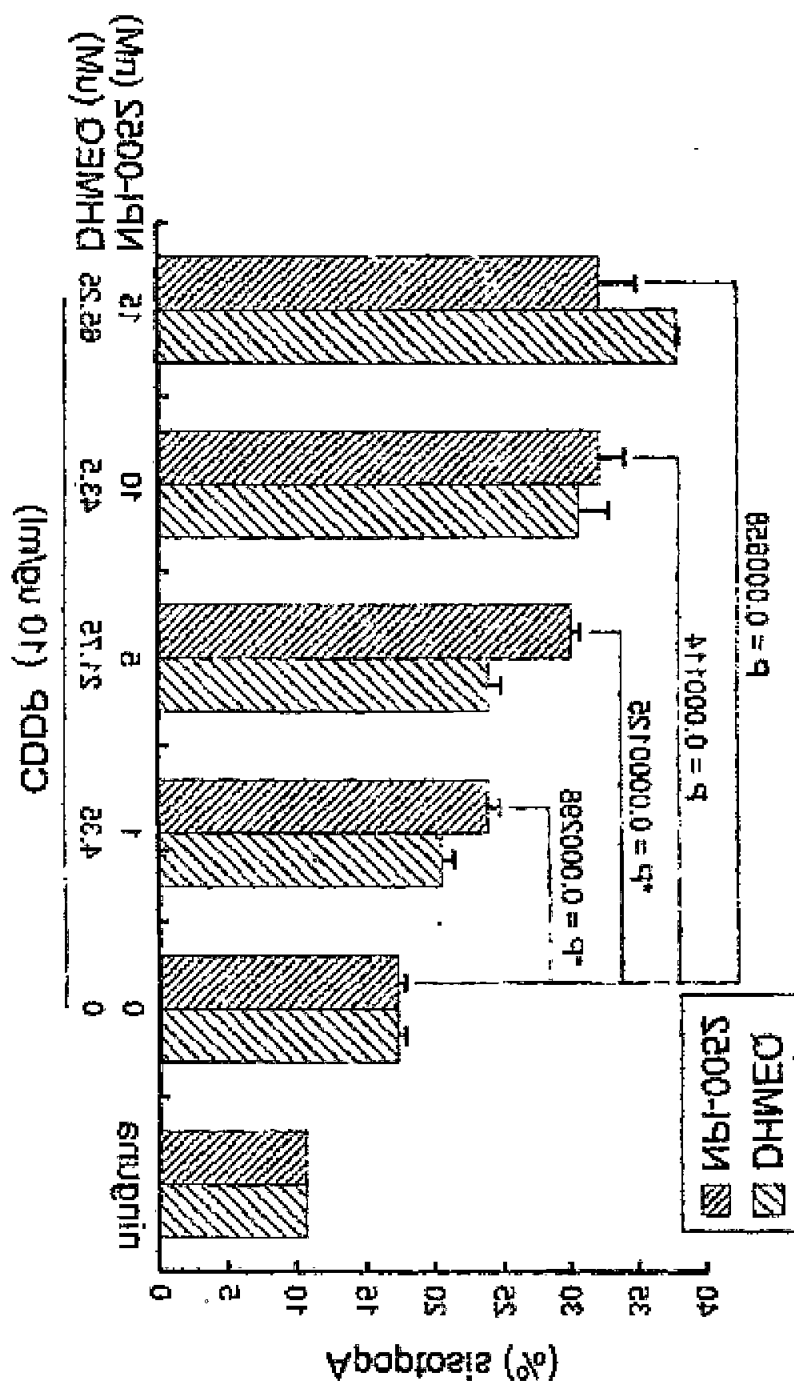
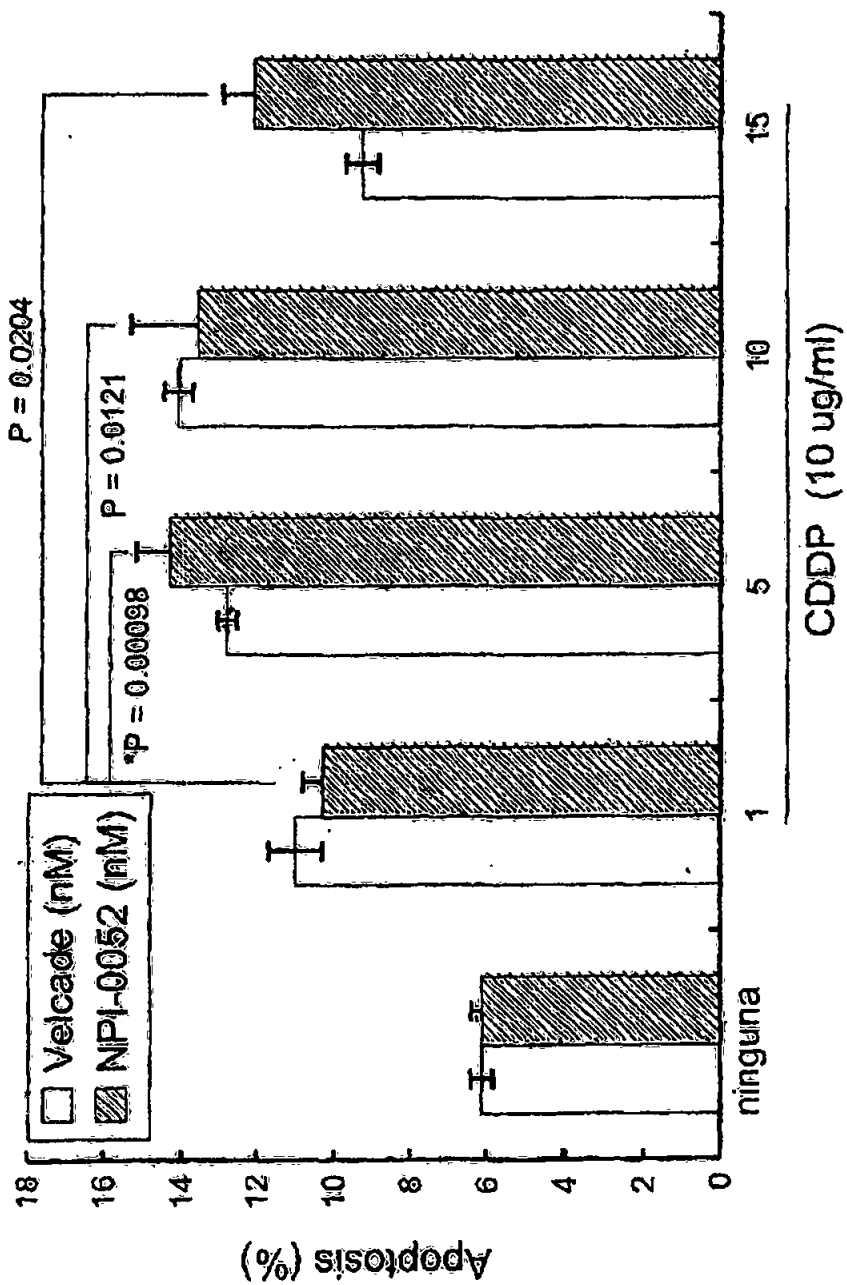


Fig. 3b
 Comparison entre sensibilización inducida por CDDP y
 DHMEQ a células B-III-1 Daudi WT a apoptosis inducida por CDDP

6/25

Fig. 4a
Combinación entre NPI-0052 y VELCADE en apoptosis
inducida por CDDP en células Daudi RR1



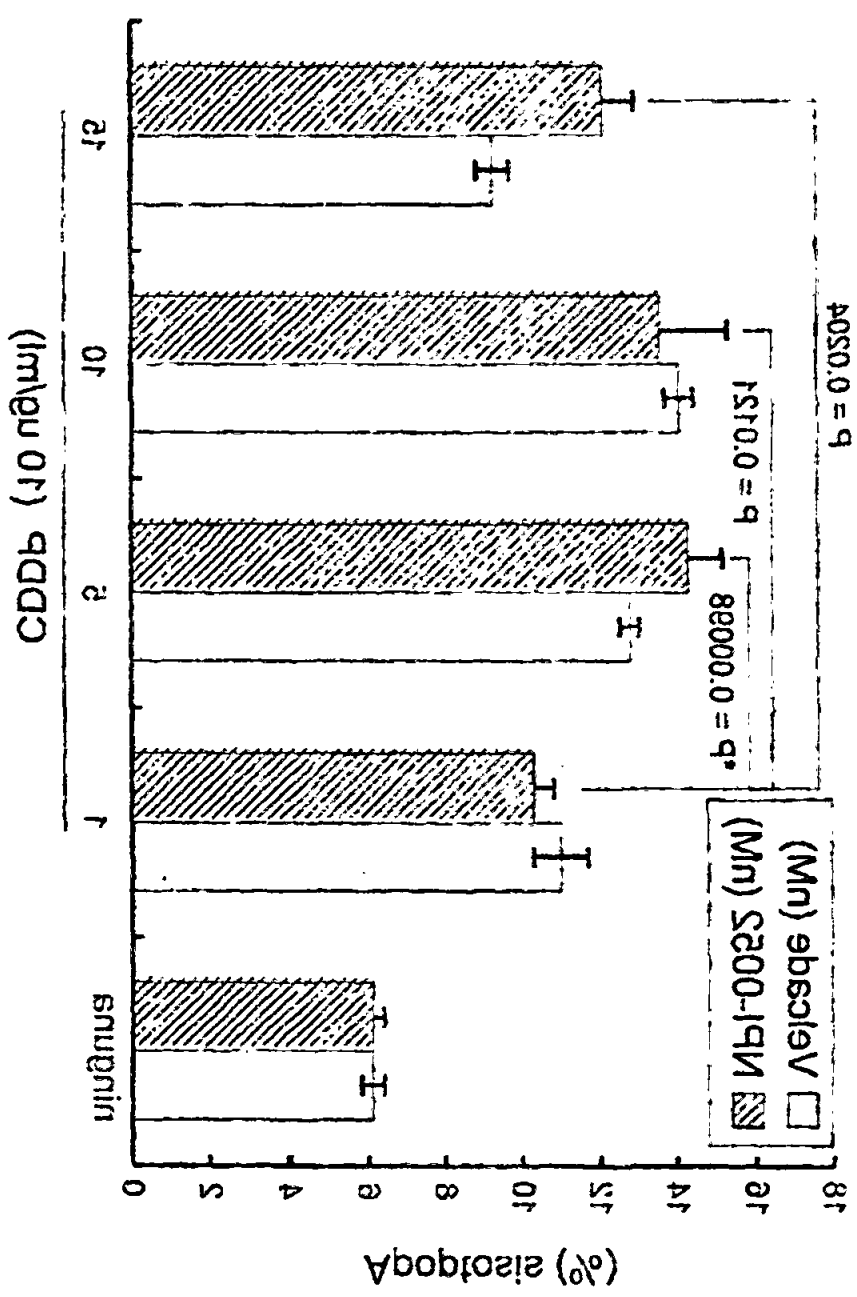
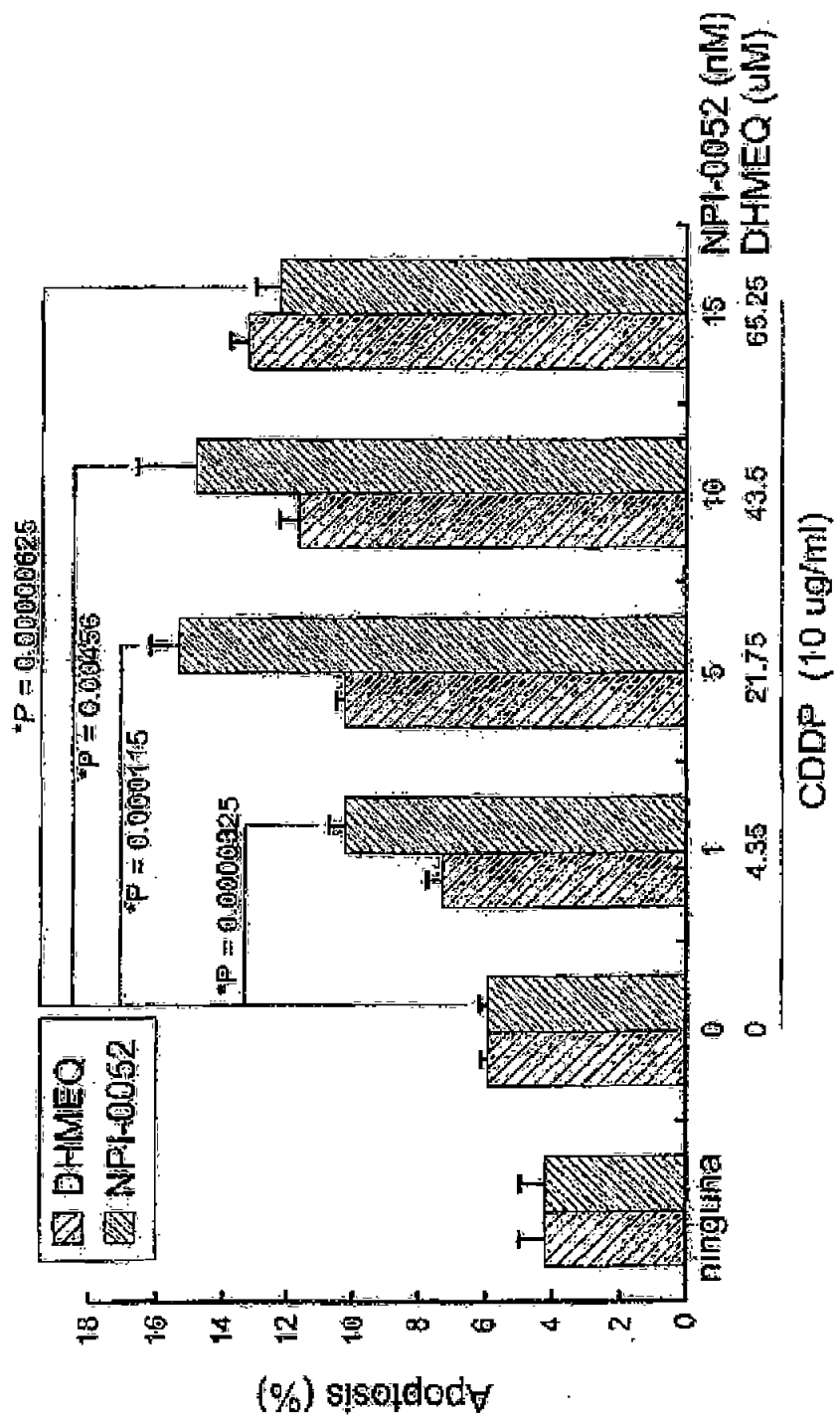


Fig. 4s
 Comparación entre VelsceV y S200-1911 en la inducción de apoptosis por CDDP en células Daudi PR

Fig. 4b
Combinación entre NPI-0052 y DHMEQ en
apoptosis inducida por CDDP en células Daudi RR1



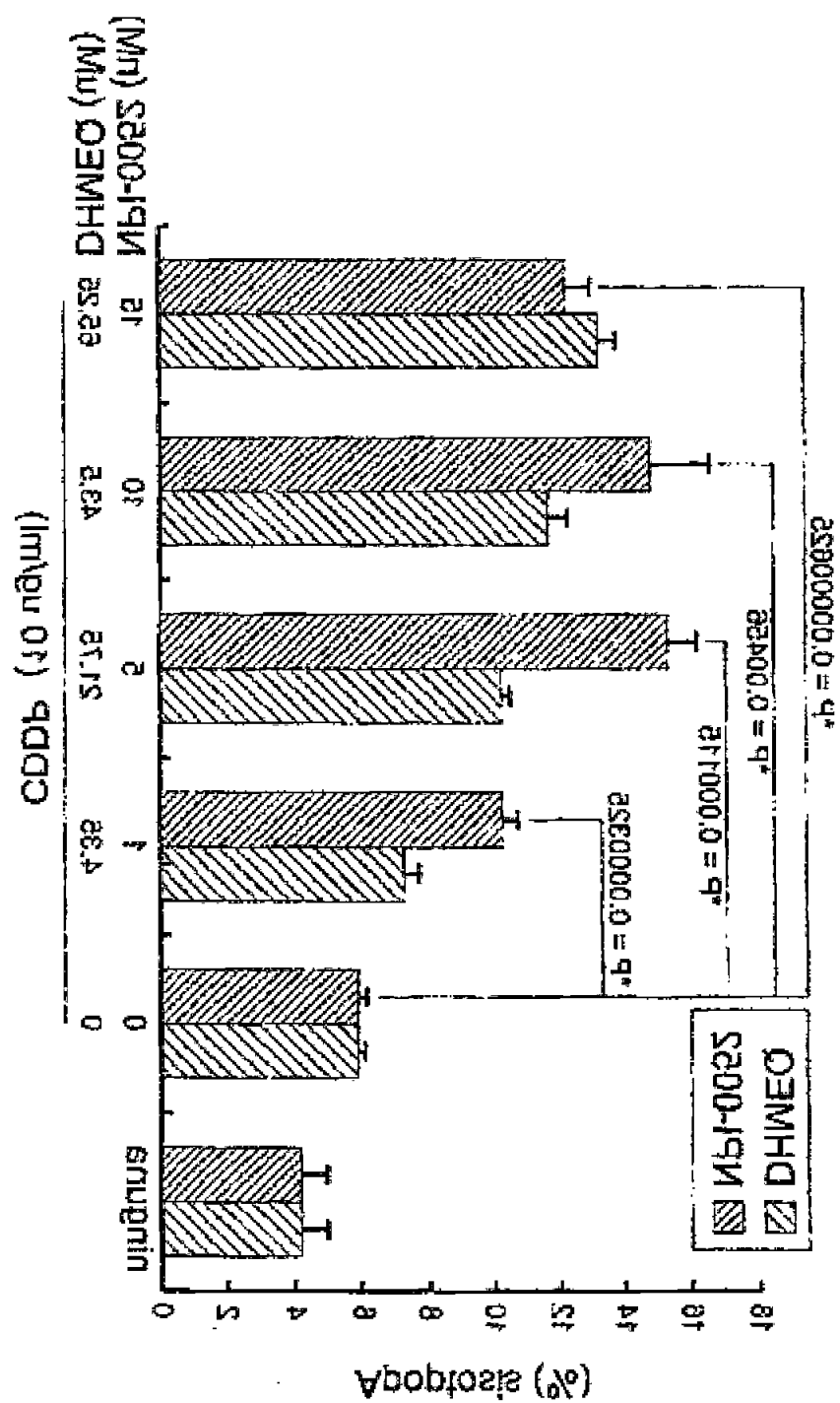


Fig. 4b
 Comparação entre MBI-0025 e DHMEQ em
 células de câncer de pulmão
 induzidas por CDDP

Fig. 5
Sensibilización mediada por Rituximab a apoptosis inducida por NPI

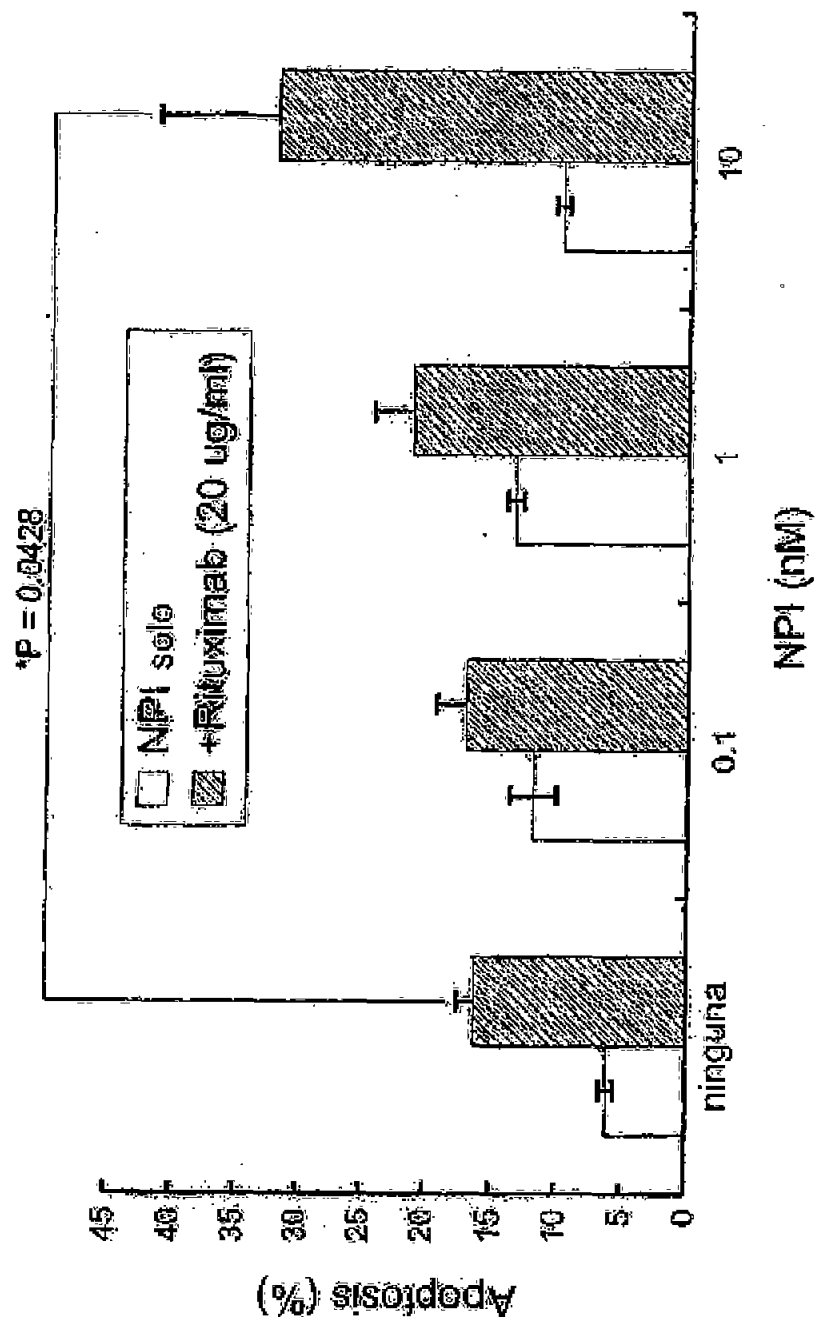
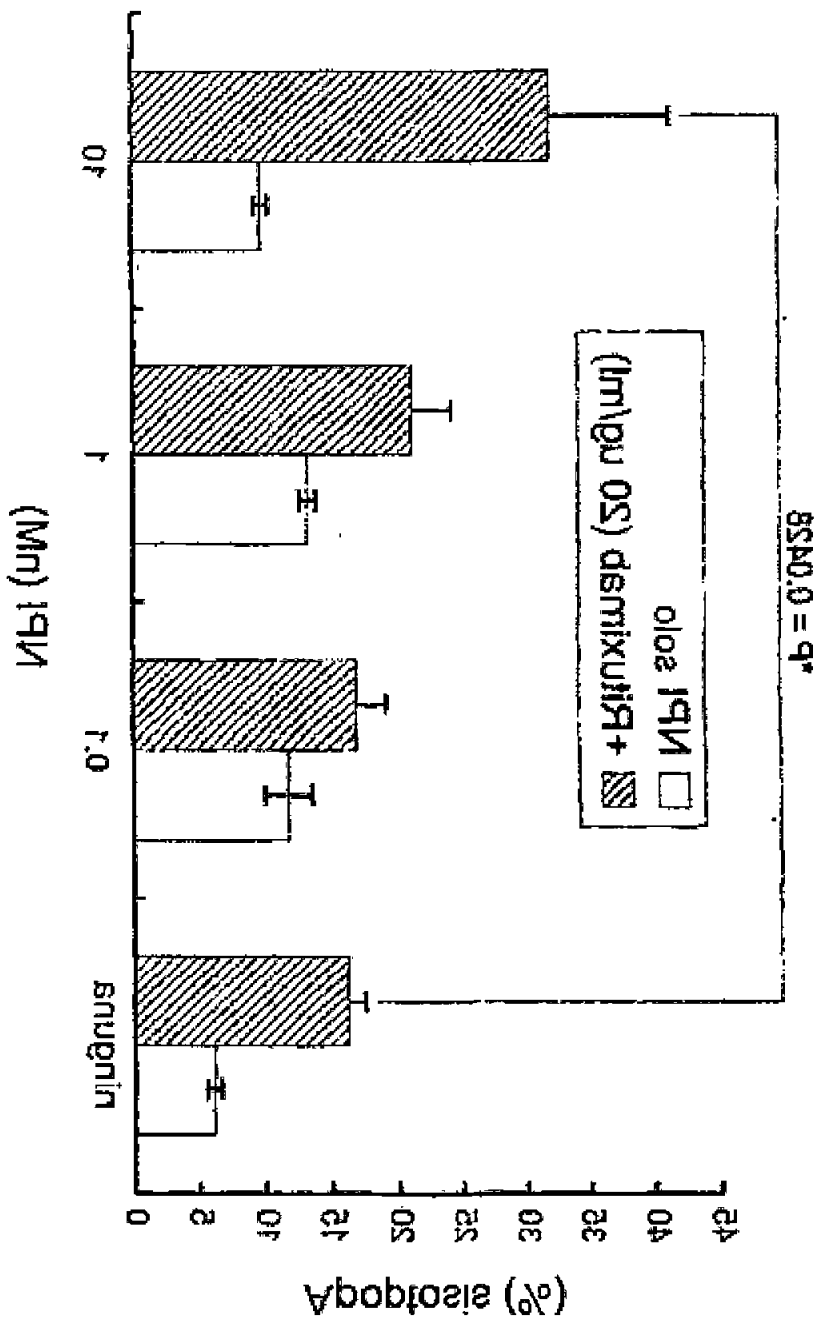
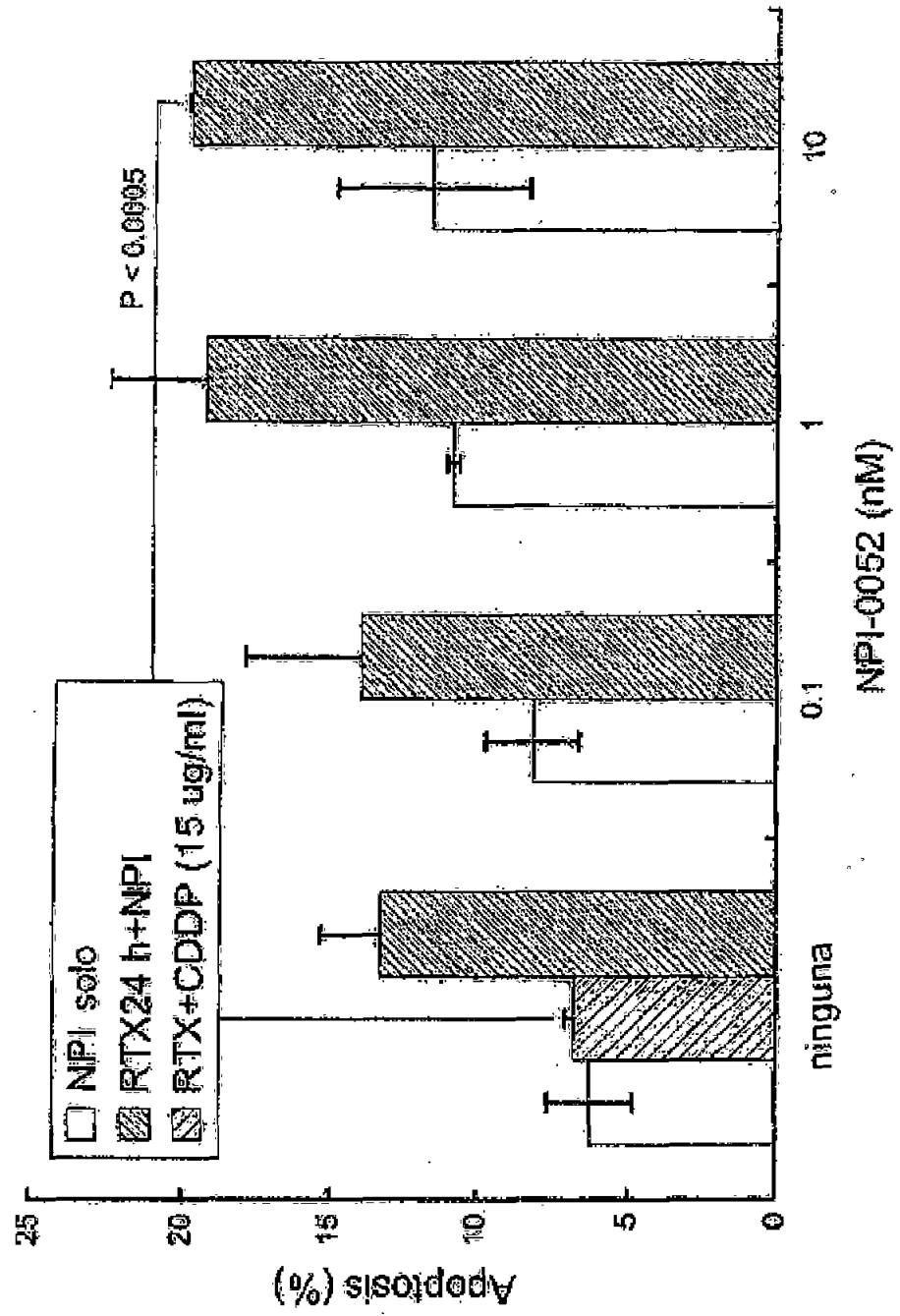


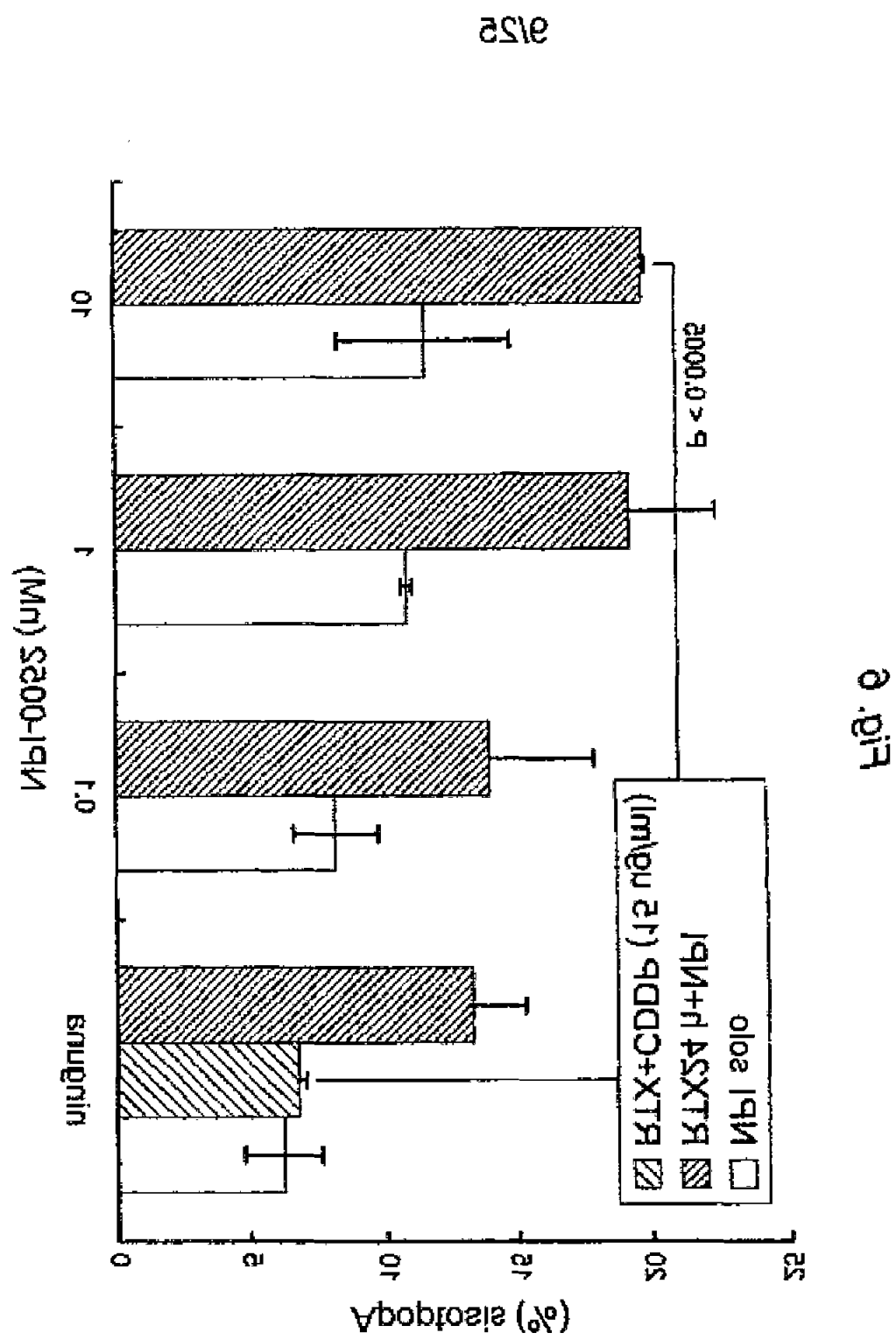
Fig. 2
 Effect of PI3K inhibitor on apoptosis in cells treated with PI3K



9/25

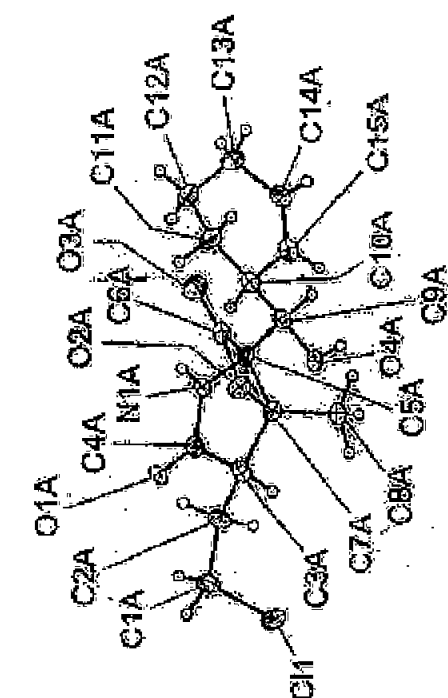
Fig. 6





10/25

Fig. 7



Trazo ORTEP de la estructura de Rayos-X
final de NP1-0052 que ilustra
la estereocimica absoluta

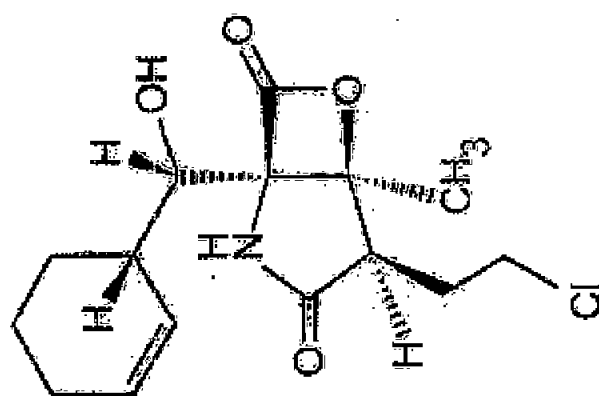


Fig. 7 (hoja 2)

Descripción de Compuesto

- a. Número de Identificación Nereus: **NPI-0052 (Salinosporamide A)**
- b. Clase Farmacológica: **Molécula pequeña, inhibidor 20S proteasoma, anti-cancer, anti-inflamatorio gamma-lactama beta-lactona bicíclica**
- c. Clase Química:
- d. Fórmula Molecular: **$C_{15}H_{29}O_4$**
- e. Peso Molecular: **313.78**
- f. Estructura Química: **Ver Fig. 7 hoja 1**

Forma: Sólido Blanco**Punto de Fusión: 169 – 171°C****Absorbencia de UV (MeOH): λ_{max} nm (log ϵ) 205 (4.03), 225 (3.3)****Rotación Óptica $[\alpha]_D^{25}$: -72.9° (c = 0.55, MeOH)****Log $D^{7.4}$: 2.4 (Ver Sección 7)****Solubilidad en PBS, pH 7.4: 9.6 μ M o 3 μ g/mL**

Almacenamiento: Congelar sólido a -20°C y almacenar en la oscuridad. Una vez reconstituidas en DMSO, las soluciones son estables por varios meses a -80°C (materiales de 20 mM se han probado). NPI-0052 es también estable por al menos 3 meses, como un sólido.

2008-2009-2010-2011-2012-2013-2014-2015-2016-2017-2018-2019-2020-2021-2022-2023-2024-2025-2026-2027-2028-2029-2030-2031-2032-2033-2034-2035-2036-2037-2038-2039-2040-2041-2042-2043-2044-2045-2046-2047-2048-2049-2050-2051-2052-2053-2054-2055-2056-2057-2058-2059-2060-2061-2062-2063-2064-2065-2066-2067-2068-2069-2070-2071-2072-2073-2074-2075-2076-2077-2078-2079-2080-2081-2082-2083-2084-2085-2086-2087-2088-2089-2090-2091-2092-2093-2094-2095-2096-2097-2098-2099-2100-2101-2102-2103-2104-2105-2106-2107-2108-2109-2110-2111-2112-2113-2114-2115-2116-2117-2118-2119-2120-2121-2122-2123-2124-2125-2126-2127-2128-2129-2130-2131-2132-2133-2134-2135-2136-2137-2138-2139-2140-2141-2142-2143-2144-2145-2146-2147-2148-2149-2150-2151-2152-2153-2154-2155-2156-2157-2158-2159-2160-2161-2162-2163-2164-2165-2166-2167-2168-2169-2170-2171-2172-2173-2174-2175-2176-2177-2178-2179-2180-2181-2182-2183-2184-2185-2186-2187-2188-2189-2190-2191-2192-2193-2194-2195-2196-2197-2198-2199-2200-2201-2202-2203-2204-2205-2206-2207-2208-2209-2210-2211-2212-2213-2214-2215-2216-2217-2218-2219-2220-2221-2222-2223-2224-2225-2226-2227-2228-2229-2230-2231-2232-2233-2234-2235-2236-2237-2238-2239-2240-2241-2242-2243-2244-2245-2246-2247-2248-2249-2250-2251-2252-2253-2254-2255-2256-2257-2258-2259-2260-2261-2262-2263-2264-2265-2266-2267-2268-2269-2270-2271-2272-2273-2274-2275-2276-2277-2278-2279-2280-2281-2282-2283-2284-2285-2286-2287-2288-2289-2290-2291-2292-2293-2294-2295-2296-2297-2298-2299-2300-2301-2302-2303-2304-2305-2306-2307-2308-2309-2310-2311-2312-2313-2314-2315-2316-2317-2318-2319-2320-2321-2322-2323-2324-2325-2326-2327-2328-2329-2330-2331-2332-2333-2334-2335-2336-2337-2338-2339-2340-2341-2342-2343-2344-2345-2346-2347-2348-2349-2350-2351-2352-2353-2354-2355-2356-2357-2358-2359-2360-2361-2362-2363-2364-2365-2366-2367-2368-2369-2370-2371-2372-2373-2374-2375-2376-2377-2378-2379-2380-2381-2382-2383-2384-2385-2386-2387-2388-2389-2390-2391-2392-2393-2394-2395-2396-2397-2398-2399-2400-2401-2402-2403-2404-2405-2406-2407-2408-2409-2410-2411-2412-2413-2414-2415-2416-2417-2418-2419-2420-2421-2422-2423-2424-2425-2426-2427-2428-2429-2430-2431-2432-2433-2434-2435-2436-2437-2438-2439-2440-2441-2442-2443-2444-2445-2446-2447-2448-2449-2450-2451-2452-2453-2454-2455-2456-2457-2458-2459-2460-2461-2462-2463-2464-2465-2466-2467-2468-2469-2470-2471-2472-2473-2474-2475-2476-2477-2478-2479-2480-2481-2482-2483-2484-2485-2486-2487-2488-2489-2490-2491-2492-2493-2494-2495-2496-2497-2498-2499-2500-2501-2502-2503-2504-2505-2506-2507-2508-2509-2510-2511-2512-2513-2514-2515-2516-2517-2518-2519-2520-2521-2522-2523-2524-2525-2526-2527-2528-2529-2530-2531-2532-2533-2534-2535-2536-2537-2538-2539-2540-2541-2542-2543-2544-2545-2546-2547-2548-2549-2550-2551-2552-2553-2554-2555-2556-2557-2558-2559-2560-2561-2562-2563-2564-2565-2566-2567-2568-2569-2570-2571-2572-2573-2574-2575-2576-2577-2578-2579-2580-2581-2582-2583-2584-2585-2586-2587-2588-2589-2590-2591-2592-2593-2594-2595-2596-2597-2598-2599-2600-2601-2602-2603-2604-2605-2606-2607-2608-2609-2610-2611-2612-2613-2614-2615-2616-2617-2618-2619-2620-2621-2622-2623-2624-2625-2626-2627-2628-2629-2630-2631-2632-2633-2634-2635-2636-2637-2638-2639-2640-2641-2642-2643-2644-2645-2646-2647-2648-2649-2650-2651-2652-2653-2654-2655-2656-2657-2658-2659-2660-2661-2662-2663-2664-2665-2666-2667-2668-2669-2670-2671-2672-2673-2674-2675-2676-2677-2678-2679-2680-2681-2682-2683-2684-2685-2686-2687-2688-2689-2690-2691-2692-2693-2694-2695-2696-2697-2698-2699-2700-2701-2702-2703-2704-2705-2706-2707-2708-2709-2710-2711-2712-2713-2714-2715-2716-2717-2718-2719-2720-2721-2722-2723-2724-2725-2726-2727-2728-2729-2730-2731-2732-2733-2734-2735-2736-2737-2738-2739-2740-2741-2742-2743-2744-2745-2746-2747-2748-2749-2750-2751-2752-2753-2754-2755-2756-2757-2758-2759-2760-2761-2762-2763-2764-2765-2766-2767-2768-2769-2770-2771-2772-2773-2774-2775-2776-2777-2778-2779-2780-2781-2782-2783-2784-2785-2786-2787-2788-2789-2790-2791-2792-2793-2794-2795-2796-2797-2798-2799-2800-2801-2802-2803-2804-2805-2806-2807-2808-2809-2810-2811-2812-2813-2814-2815-2816-2817-2818-2819-2820-2821-2822-2823-2824-2825-2826

Log 10 : 4.5 : 4.5

(HO₂C, 55.0 = c) °E.SF. : 35 [α]_D 50.0

Absorbancia de UV (MeOH): λ_{max} nm (log ϵ) 502 (4.03), 552 (3.3)

Q^oRT - 601 :ndi3u7 eb otu9

of the following:

1. Introduction

7610910M 0297.9

q. Forming a partnership.

Case Group:

ins, 100mg-ins

emoseetorq 20S robiditni ,eñeupaq eliueòlom

(A *ebimtagosonilis*) S200-1P11: suera11 n0123456789101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899100101102103104105106107108109110111112113114115116117118119120121122123124125126127128129130131132133134135136137138139140141142143144145146147148149150151152153154155156157158159160161162163164165166167168169170171172173174175176177178179180181182183184185186187188189190191192193194195196197198199200201202203204205206207208209210211212213214215216217218219220221222223224225226227228229230231232233234235236237238239240241242243244245246247248249250251252253254255256257258259260261262263264265266267268269270271272273274275276277278279280281282283284285286287288289290291292293294295296297298299300301302303304305306307308309310311312313314315316317318319320321322323324325326327328329330331332333334335336337338339340341342343344345346347348349350351352353354355356357358359360361362363364365366367368369370371372373374375376377378379380381382383384385386387388389390391392393394395396397398399400401402403404405406407408409410411412413414415416417418419420421422423424425426427428429430431432433434435436437438439440441442443444445446447448449450451452453454455456457458459460461462463464465466467468469470471472473474475476477478479480481482483484485486487488489490491492493494495496497498499500501502503504505506507508509510511512513514515516517518519520521522523524525526527528529530531532533534535536537538539540541542543544545546547548549550551552553554555556557558559560561562563564565566567568569570571572573574575576577578579580581582583584585586587588589590591592593594595596597598599600601602603604605606607608609610611612613614615616617618619620621622623624625626627628629630631632633634635636637638639640641642643644645646647648649650651652653654655656657658659660661662663664665666667668669670671672673674675676677678679680681682683684685686687688689690691692693694695696697698699700701702703704705706707708709710711712713714715716717718719720721722723724725726727728729730731732733734735736737738739740741742743744745746747748749750751752753754755756757758759760761762763764765766767768769770771772773774775776777778779780781782783784785786787788789790791792793794795796797798799800801802803804805806807808809810811812813814815816817818819820821822823824825826827828829830831832833834835836837838839840841842843844845846847848849850851852853854855856857858859860861862863864865866867868869870871872873874875876877878879880881882883884885886887888889890891892893894895896897898899900901902903904905906907908909910911912913914915916917918919920921922923924925926927928929930931932933934935936937938939940941942943944945946947948949950951952953954955956957958959960961962963964965966967968969970971972973974975976977978979980981982983984985986987988989990991992993994995996997998999100010011002100310041005100610071008100910101011101210131014101510161017101810191020102110221023102410251026102710281029103010311032103310341035103610371038103910401041104210431044104510461047104810491050105110521053105410551056105710581059106010611062106310641065106610671068106910701071107210731074107510761077107810791080108110821083108410851086108710881089109010911092109310941095109610971098109911001101110211031104110511061107110811091110111111121113111411151116111711181119112011211122112311241125112611271128112911301131113211331134113511361137113811391140114111421143114411451146114711481149115011511152115311541155115611571158115911601161116211631164116511661167116811691170117111721173117411751176117711781179118011811182118311841185118611871188118911901191119211931194119511961197119811991200120112021203120412051206120712081209121012111212121312141215121612171218121912201221122212231224122512261227122812291230123112321233123412351236123712381239124012411242124312441245124612471248124912501251125212531254125512561257125812591260126112621263126412651266126712681269127012711272127312741275127612771278127912801281128212831284128512861287128812891290129112921293

Description de Compuesto

Fig. 7 (cont.)

Fig. 8
Sensibilización mediada por NPI-0052 Rituximab
de línea celular Ramos B-NHL a apoptosis inducida por NPI

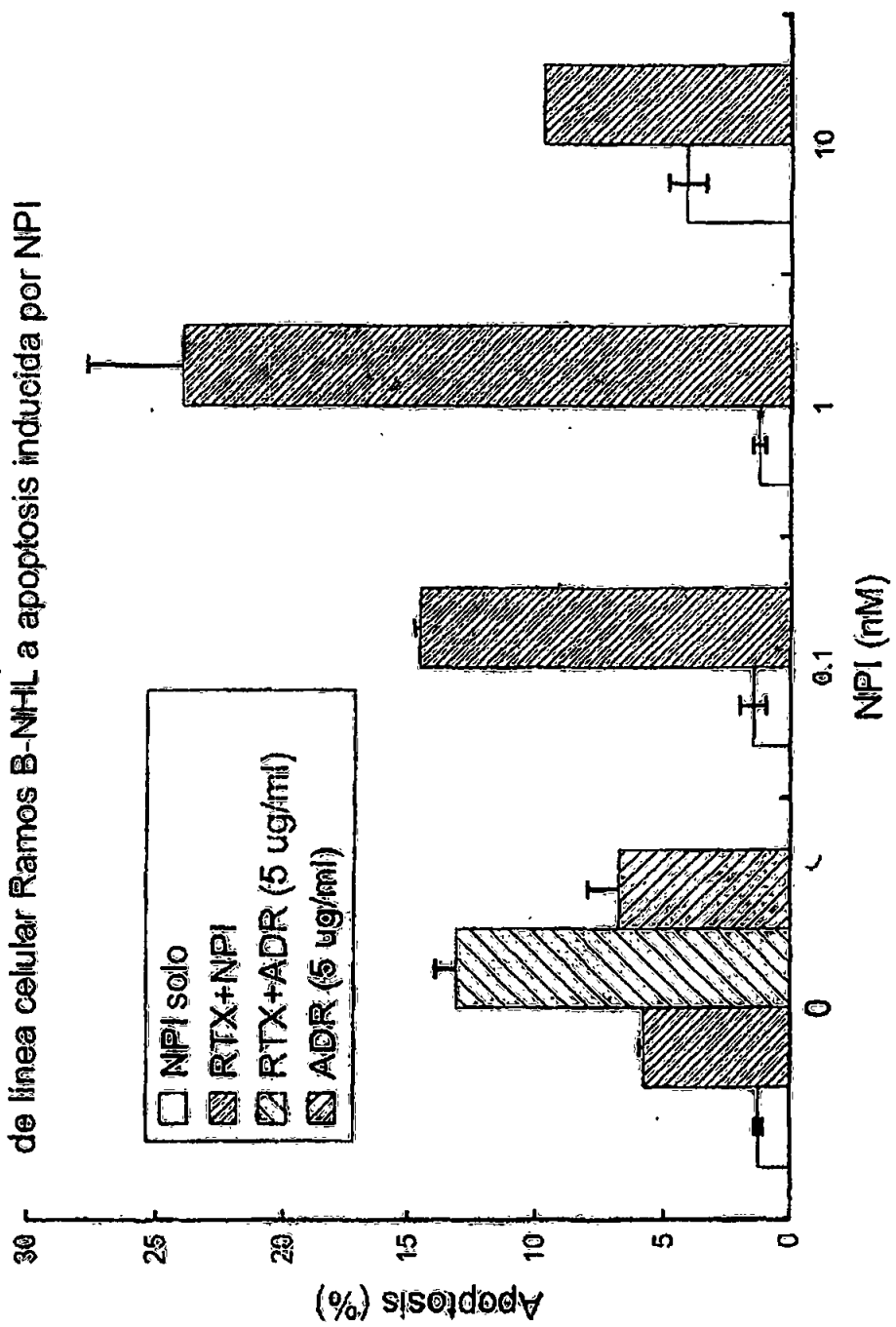
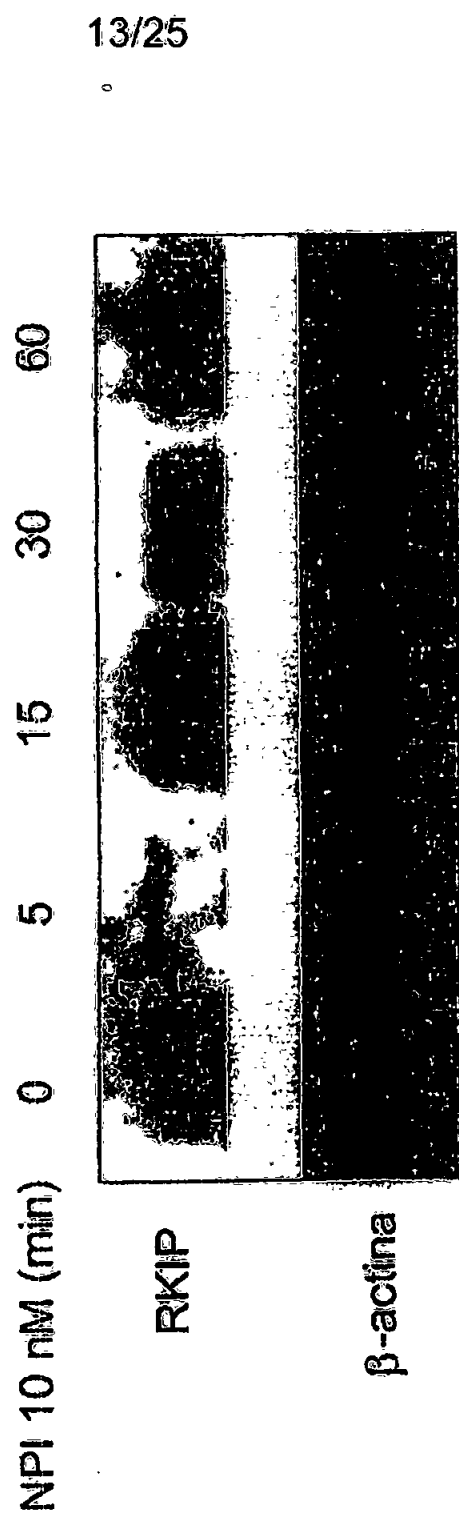


Fig. 9
 NPI-0052 Rituximab induce expresión RKIP en Ramos



some of the most important and interesting

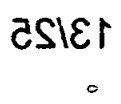


Fig. 10
NPI-0052 Rituximab inhibe expresión YY1 en Ramos

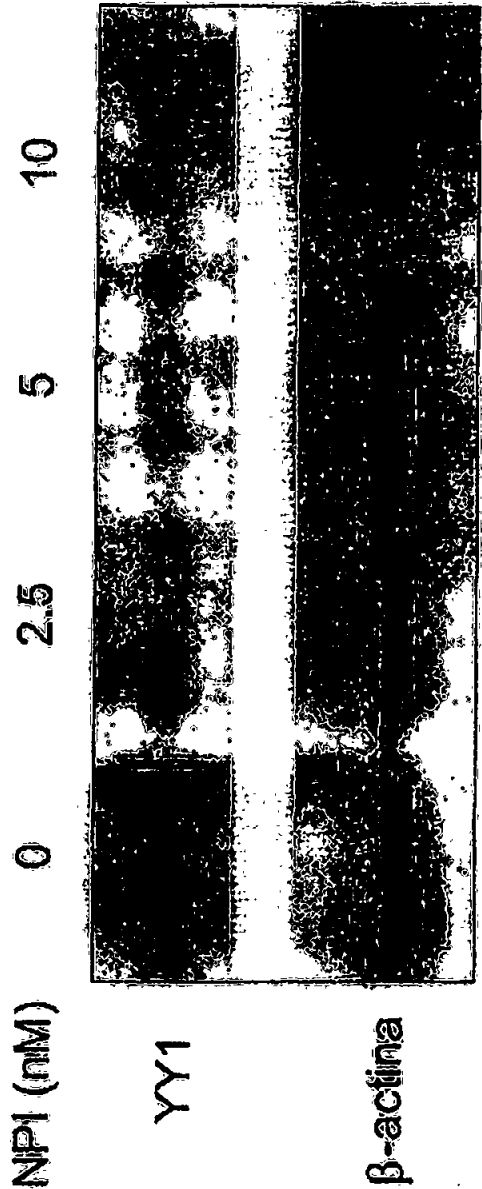


Fig. 10
Schematic diagram of the experimental setup

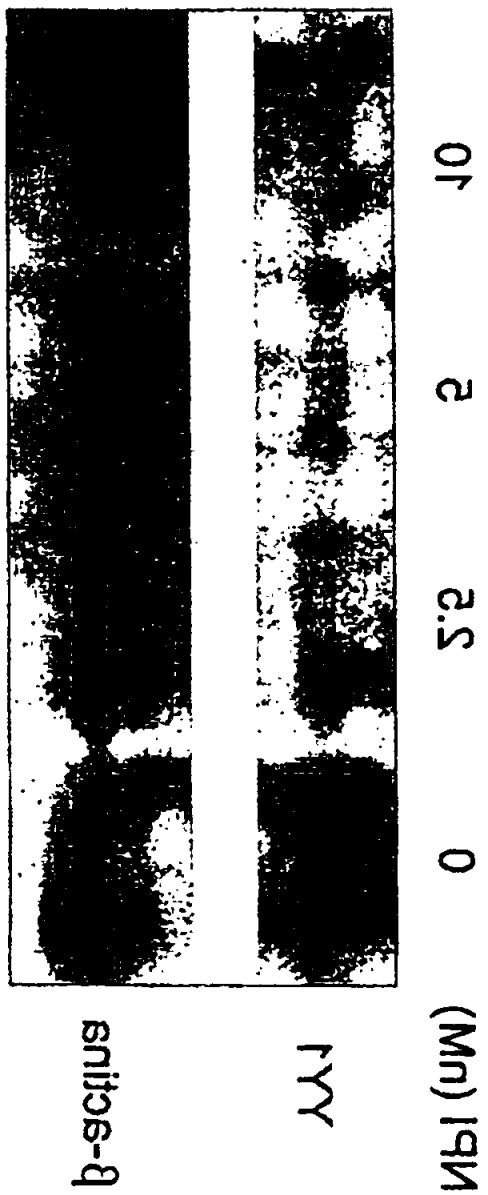
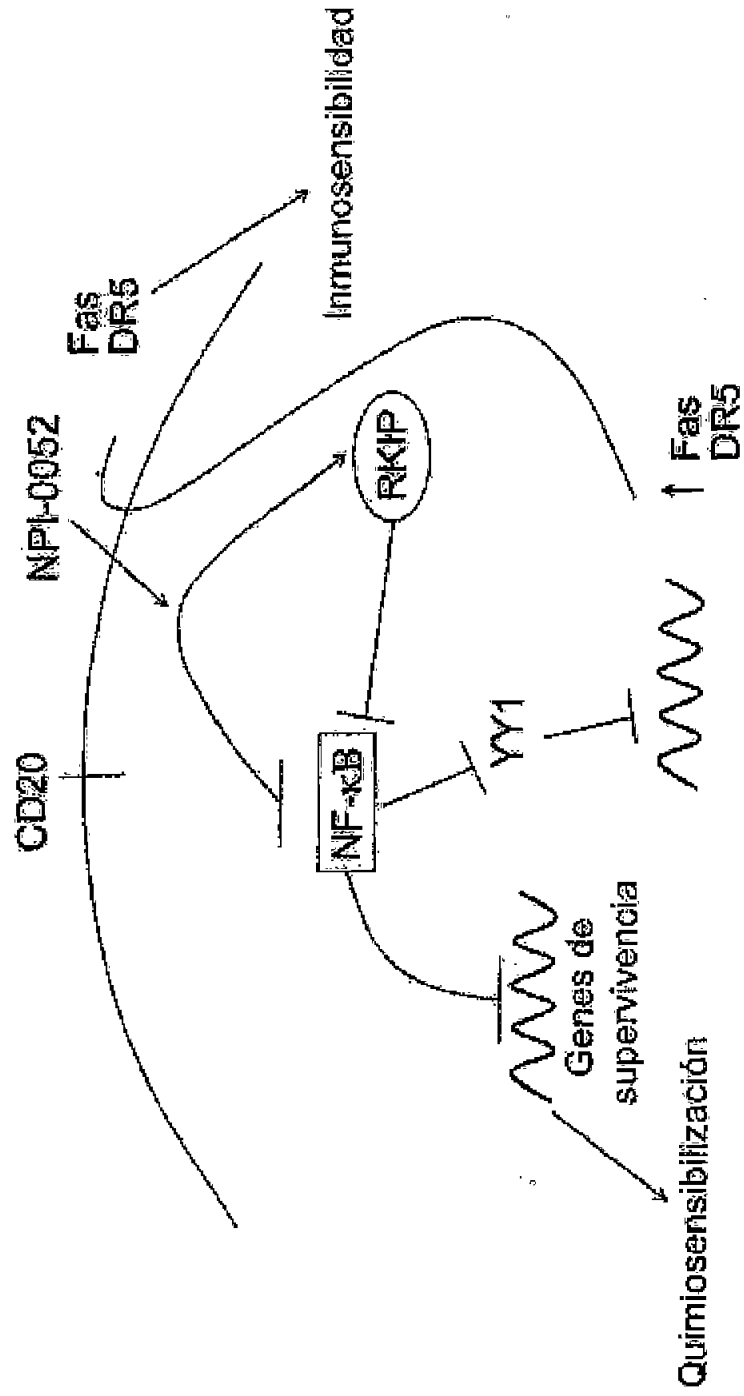


Fig. 11



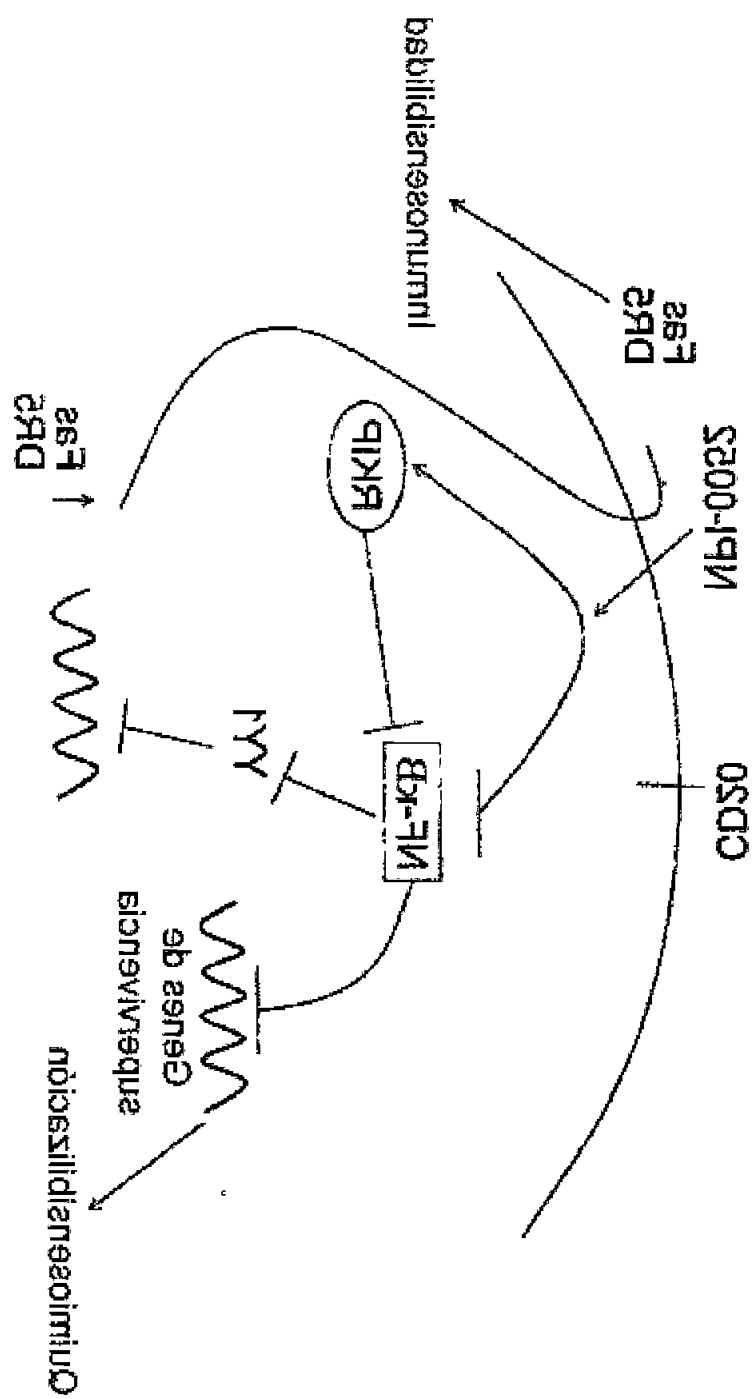
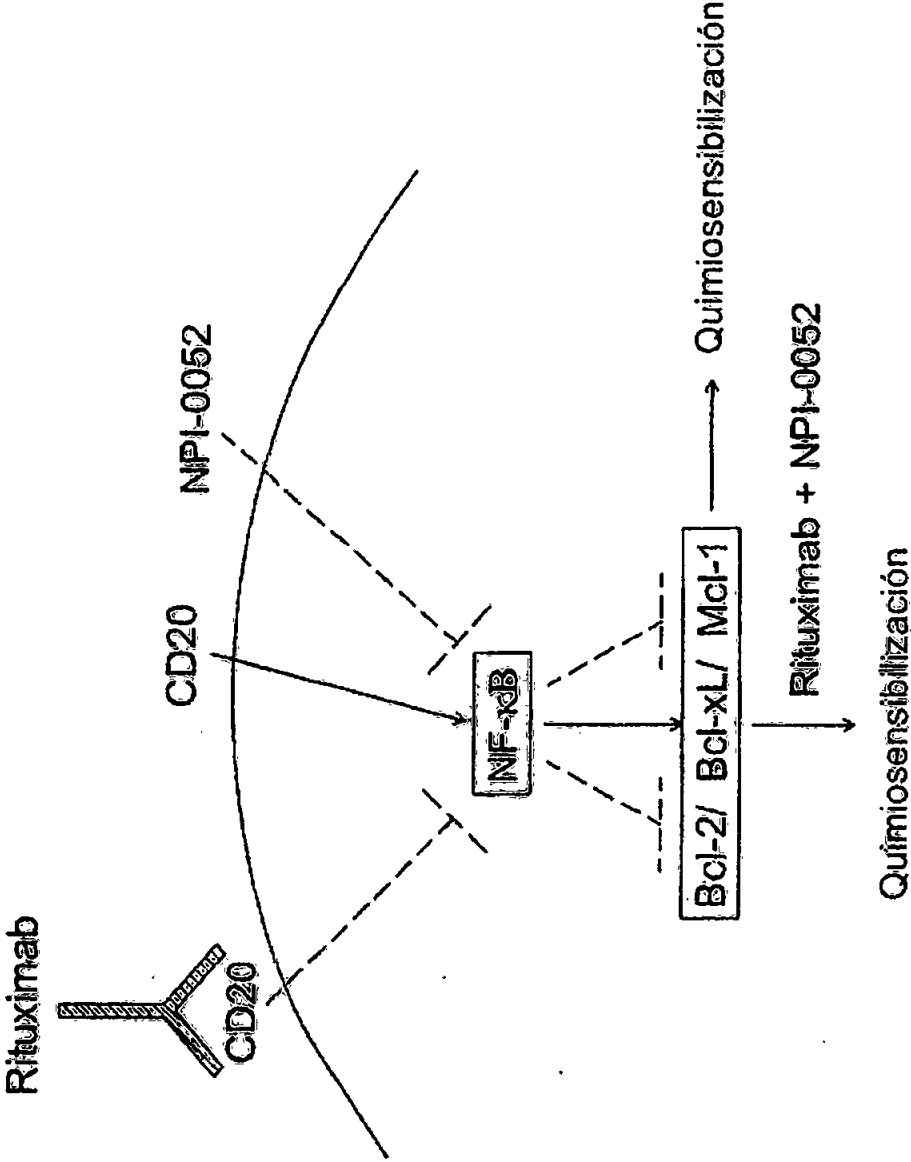


Fig. 12



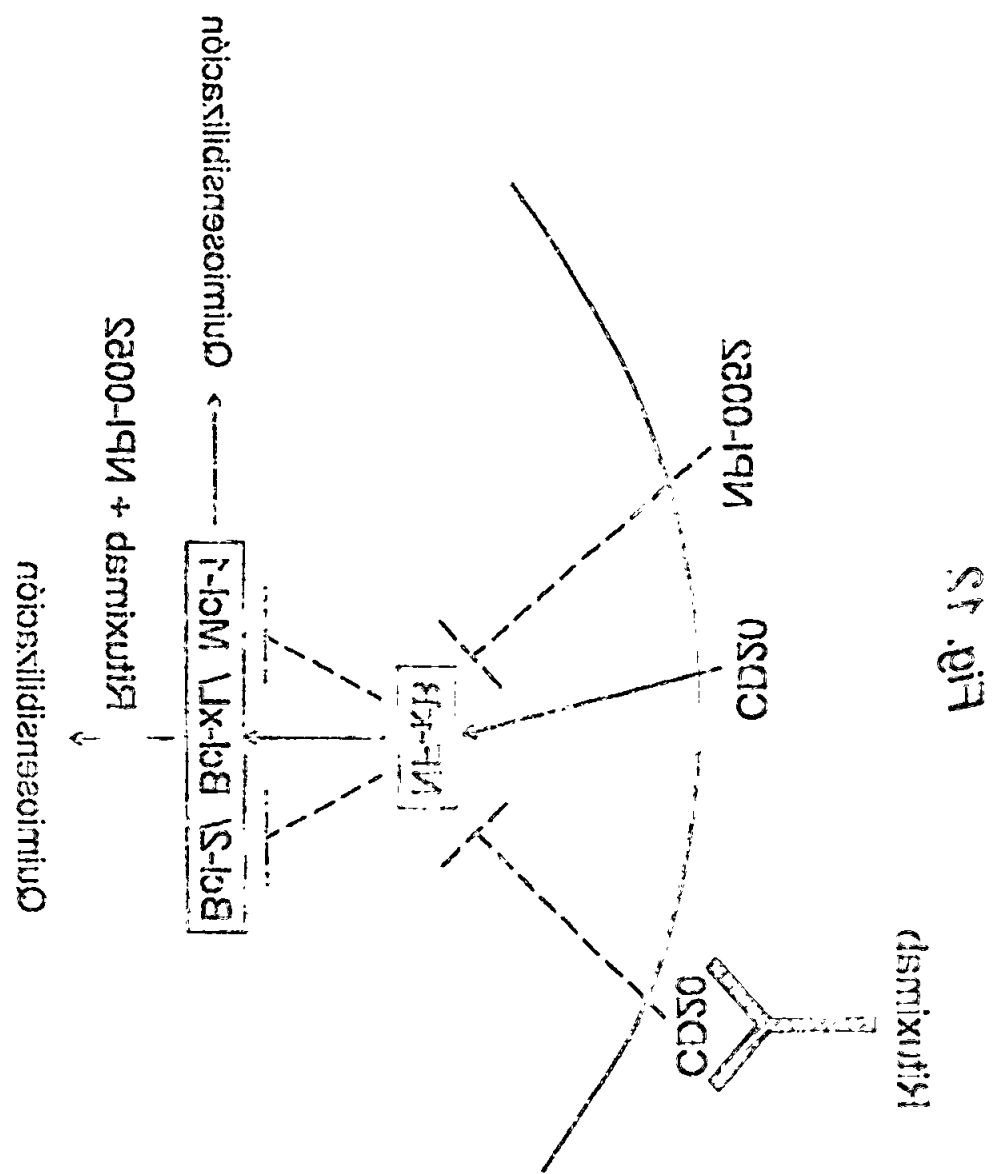
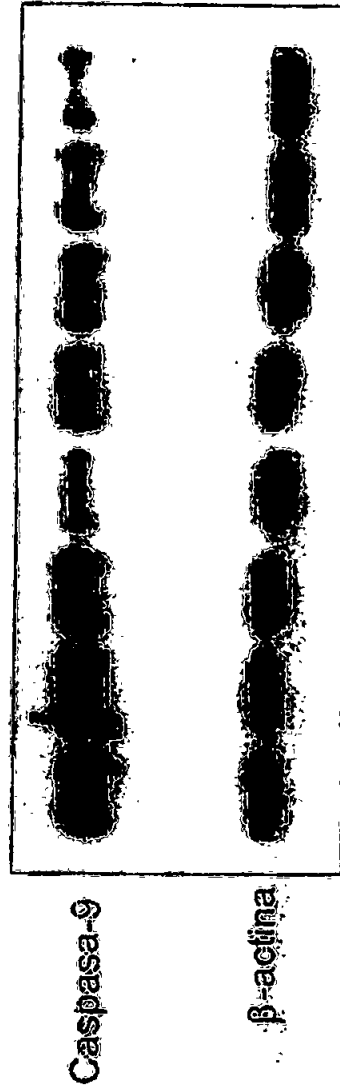


Fig. 13
Tratamiento de combinación de
caspasa-9 activada con CDDP y NPI-0052



Se trataron células Ramos con concentración óptima de NPI-0052 (2.5nM) por 20 h, después se trataron con CDDP por 24 hr adicionales. Se examinó el total de lisados celulares por WB para expresión de caspasa-9 y beta-actina.

Fig. 13
 Tratamiento de compuestos de
 S300-191 con CDDP y M1-0025
 caspasa-9 activa

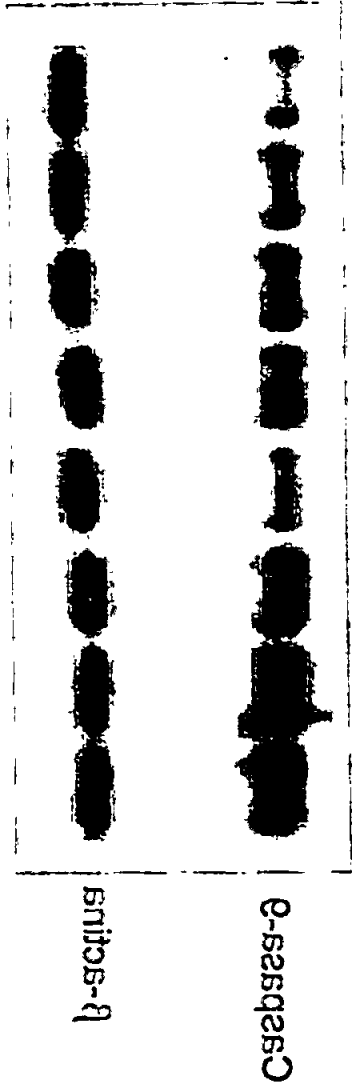
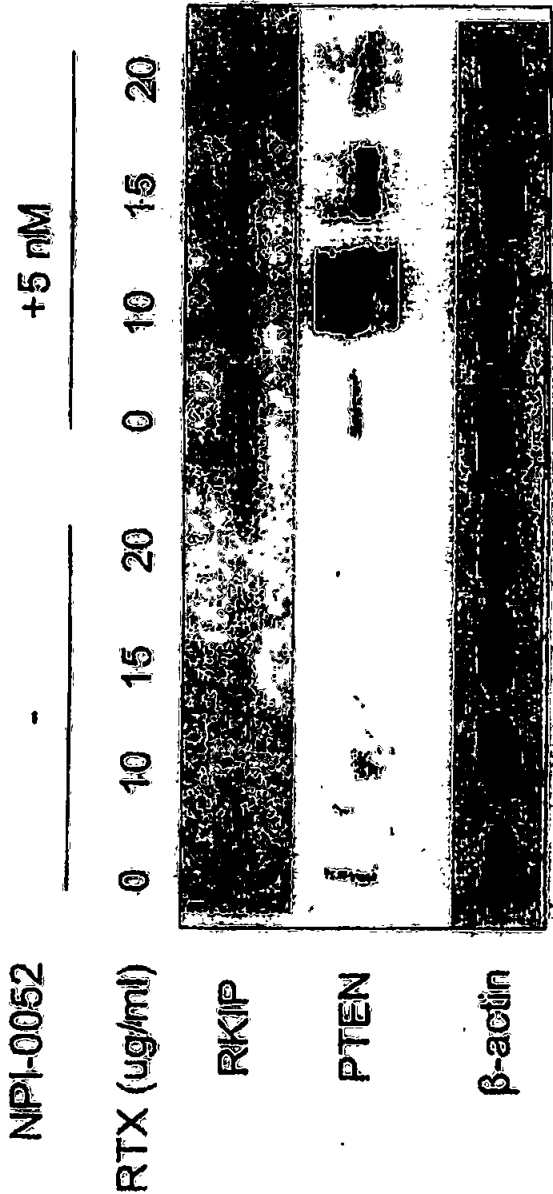
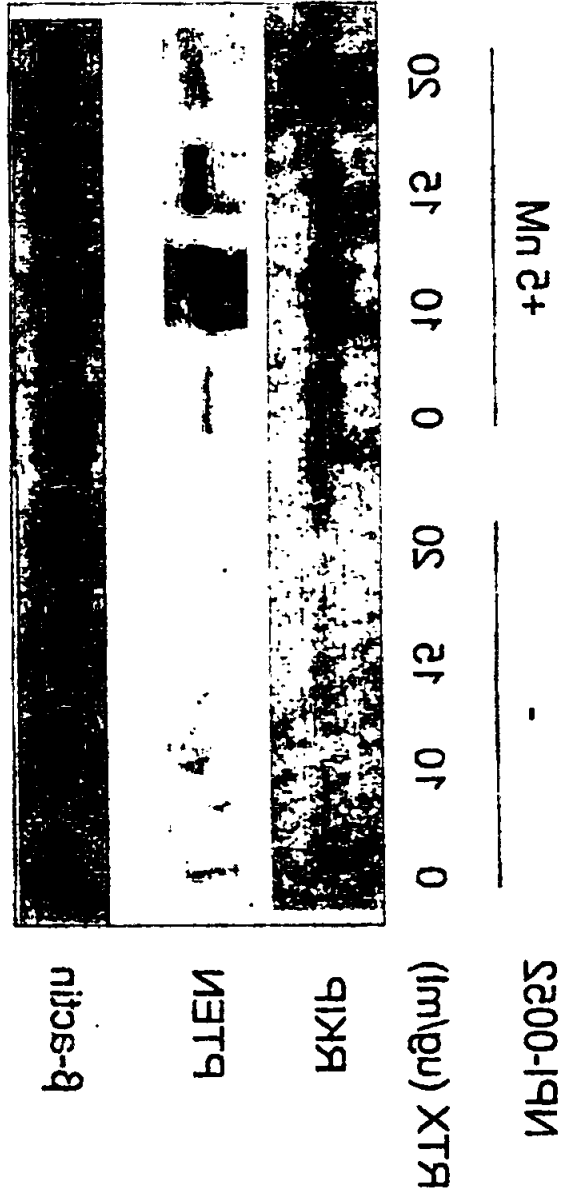


Fig. 15
Tratamiento de combinación entre NPI y
Rituximab induce RKIP y PTEN



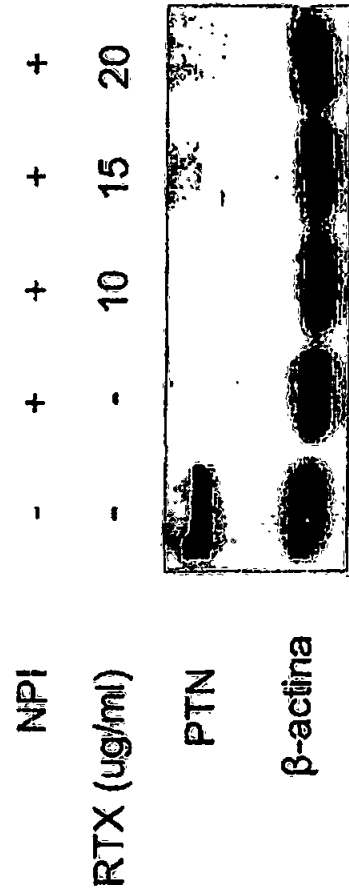
Se trataron células Ramos con concentración óptima de NPI-0052 (5 nM) por 1 h, después se trataron con diversas concentraciones de Rituximab por 24 hr adicionales. Se examinó el total de lisados celulares por WB para expresión de RKIP, PTEN y beta-actina.

Fig. 12
Tratamiento de combinación entre MIP1 y
MIP2 y MIP3 y MIP4



Se trataron células Ramos con concentraciones óptimas de MIP1-0025 y MIP2-0025 (Mn 2) por 1 h, después se trataron con diversas concentraciones de MIP3 y MIP4 por 24 h adicionales. Se examinó el total de las células por WB para expresión de MIP3, MIP4 y MIP5.

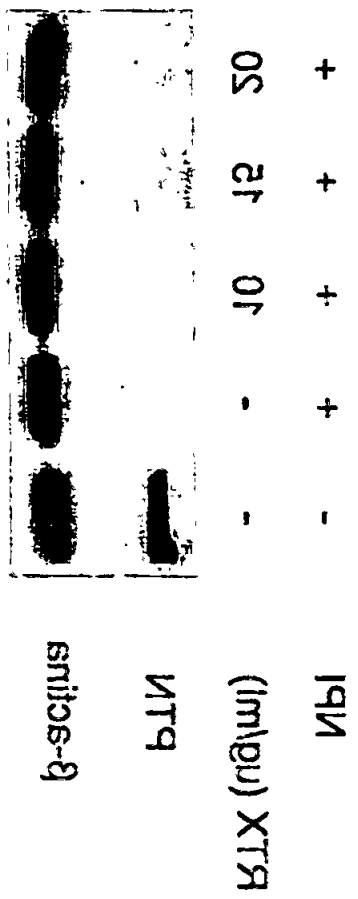
Fig. 16
 Tratamiento de combinación entre NPI y
 Rituximab resulta en inhibición de PTN (pleiotropina)



Se trataron células Ramos con concentración óptima de NPI-0052 (5 nM) por 1 h, después se trataron con diversas concentraciones de Rituximab por 24 hr adicionales. Se examinó el total de lisados celulares por WB para expresión de RKIP, PTEN y beta-actina.

Fig. 10

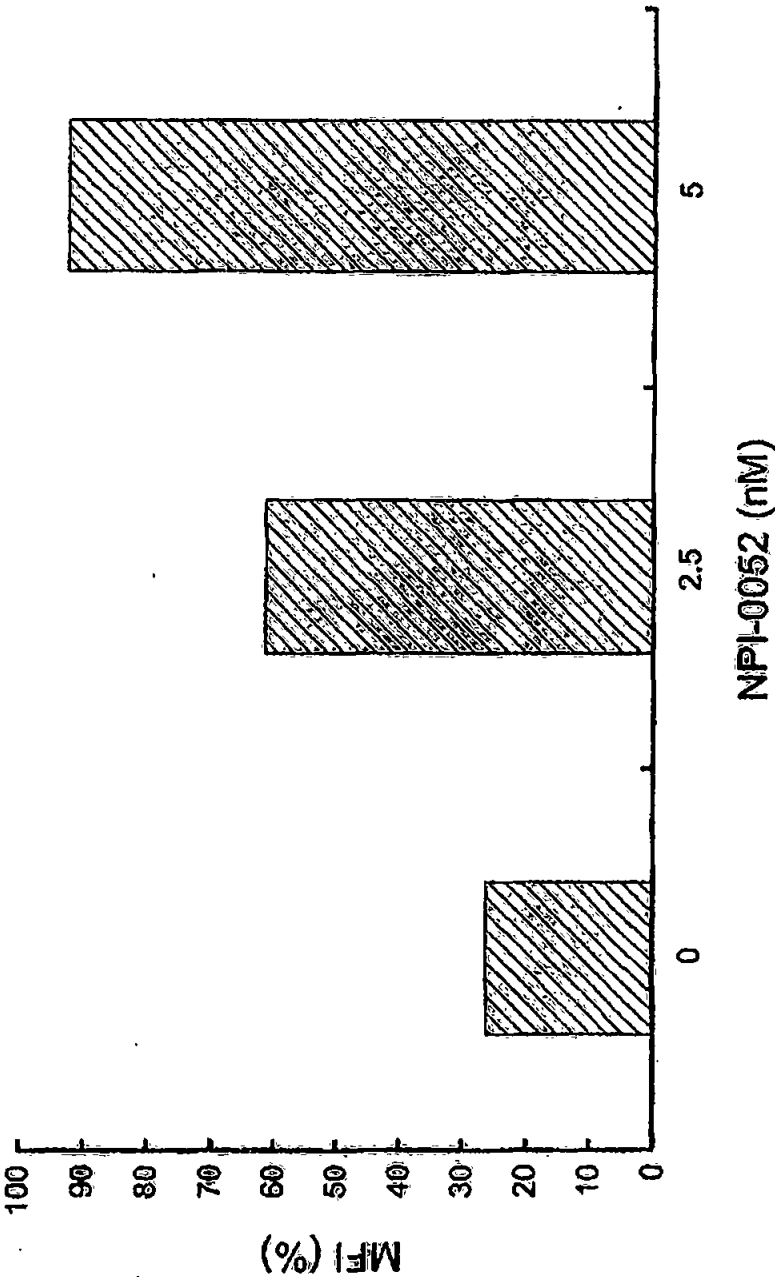
Tratamiento de combinación entre PI3K y Akt
Resistencia a la inhibición de PI3K (inhibición)



50152

Se trataron células Ramos con concentraciones óptimas de PI3K-00025 (Mn 2) por 1 h, después se trataron con diversas concentraciones de Akt por 24 h adicionales. Se examinó el total de las células por WB para expresión de Akt, PI3K y β-actina.

Fig. 17a
Inducción de expresión de DR5 en células Ramos



Se trataron células Ramos con diversas concentraciones de NPI (0 - 5 nM) por 24 h, después se observaron expresiones DR5 por flujo.

Se trataron células Ramos con diversas concentraciones de IFN- γ (0 - 200 U/ml) durante 24 h. Después se observaron expresiones DR β por flujo.

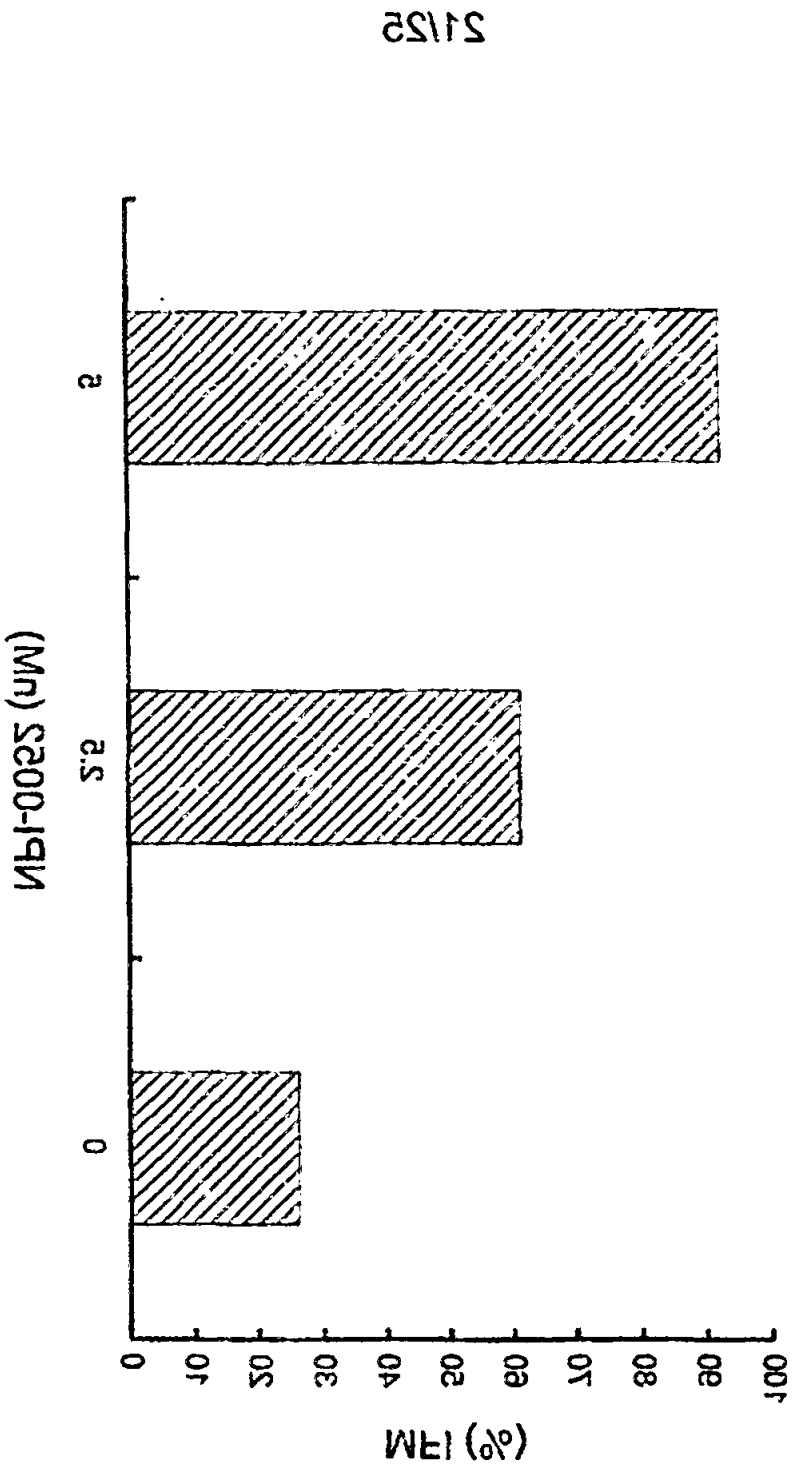
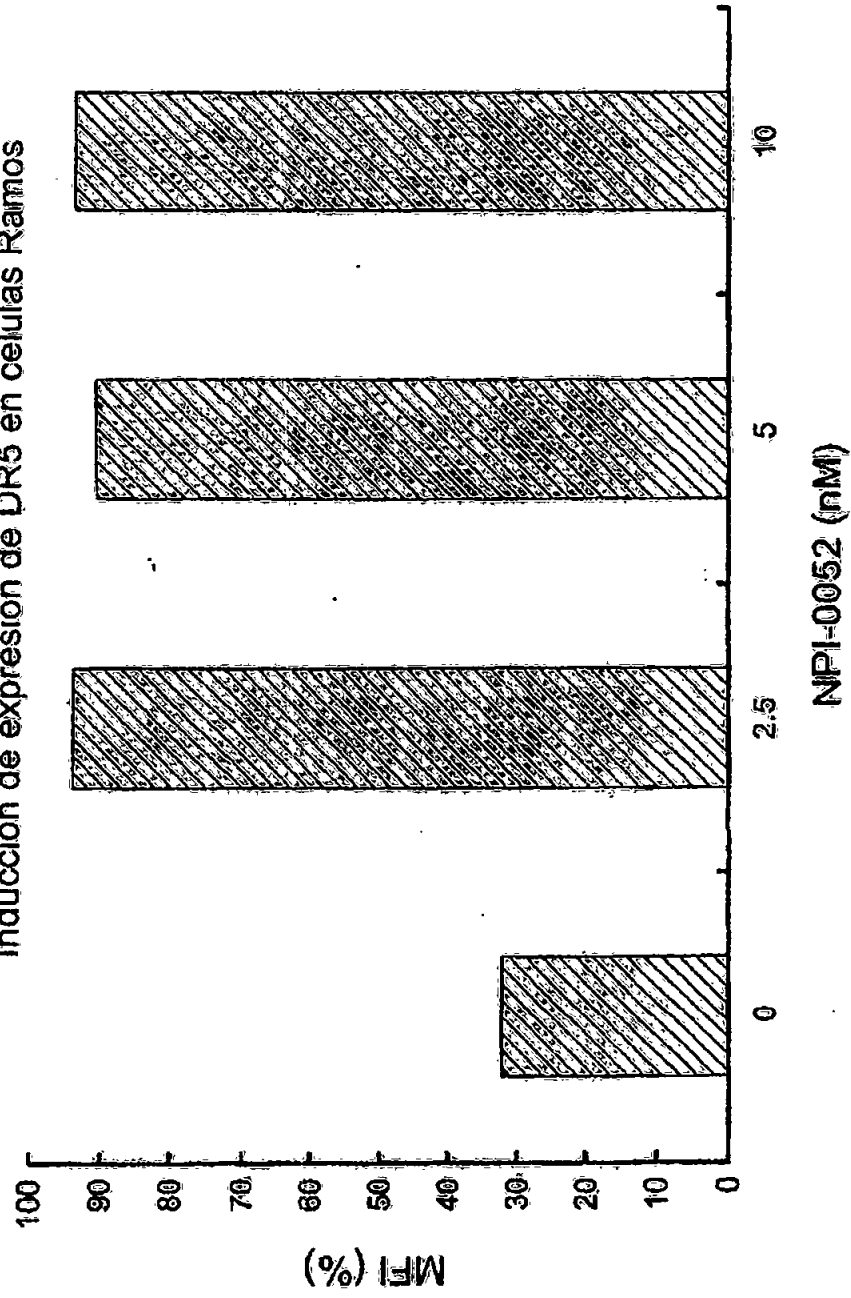


Fig. 17a
Inducción de expresión de DR β en células Ramos

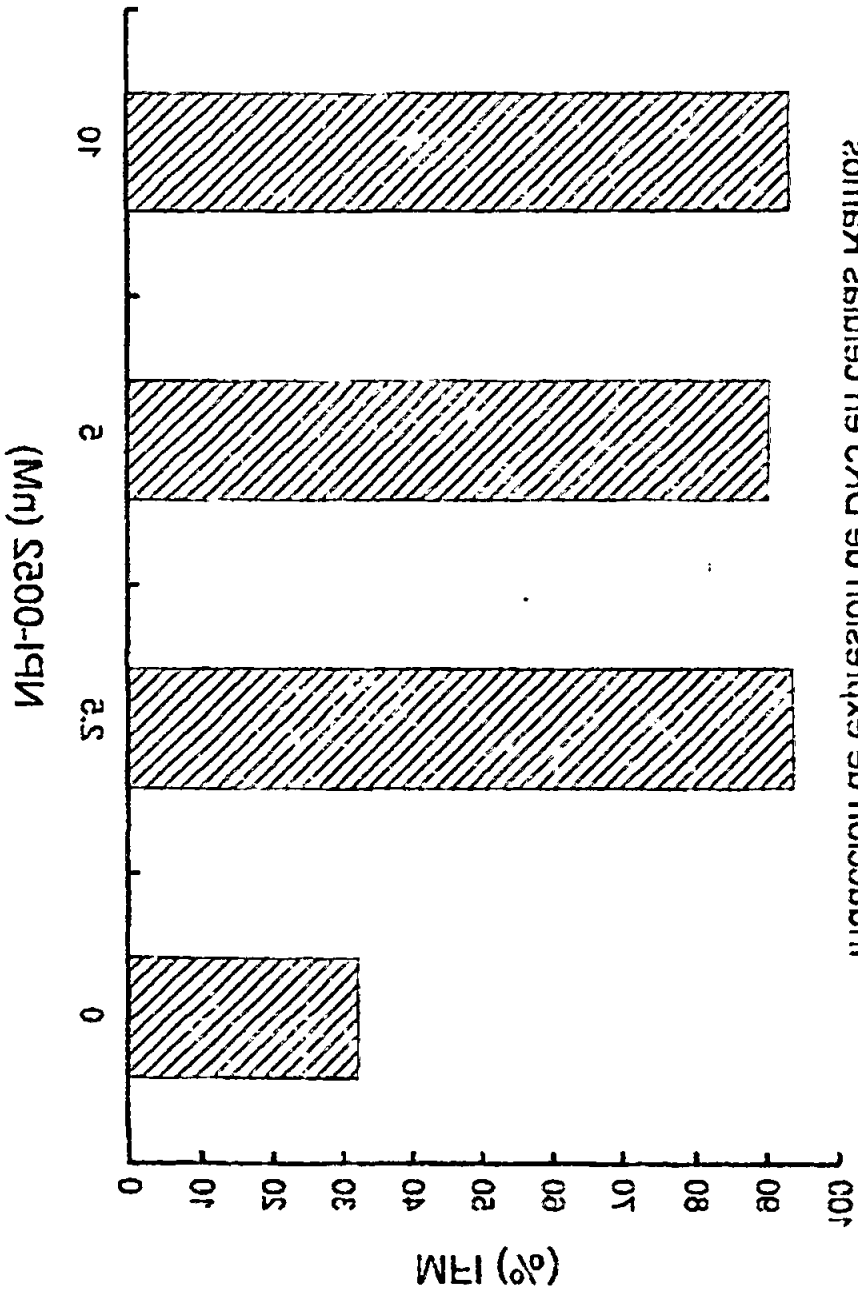
Fig. 17b
Inducción de expresión de DR5 en células Ramos



Se trataron células Ramos RR1 con diversas concentraciones de NPI (0 - 5 NM) por 24 h, después se observaron expresiones DR5 por flujo.

Fig. 1

Inducción de expresión de DR2 en células Rasmussen



55/52

Se notaron células Rasmussen con asociación de concentraciones de 191 a 200 MN (MN 2 - 0) por 24 h. Después se observaron expresiones DR2 por 100 días.

Fig. 18
Células Ramos sensibilizadas con NPI a apoptosis inducida por TRAIL

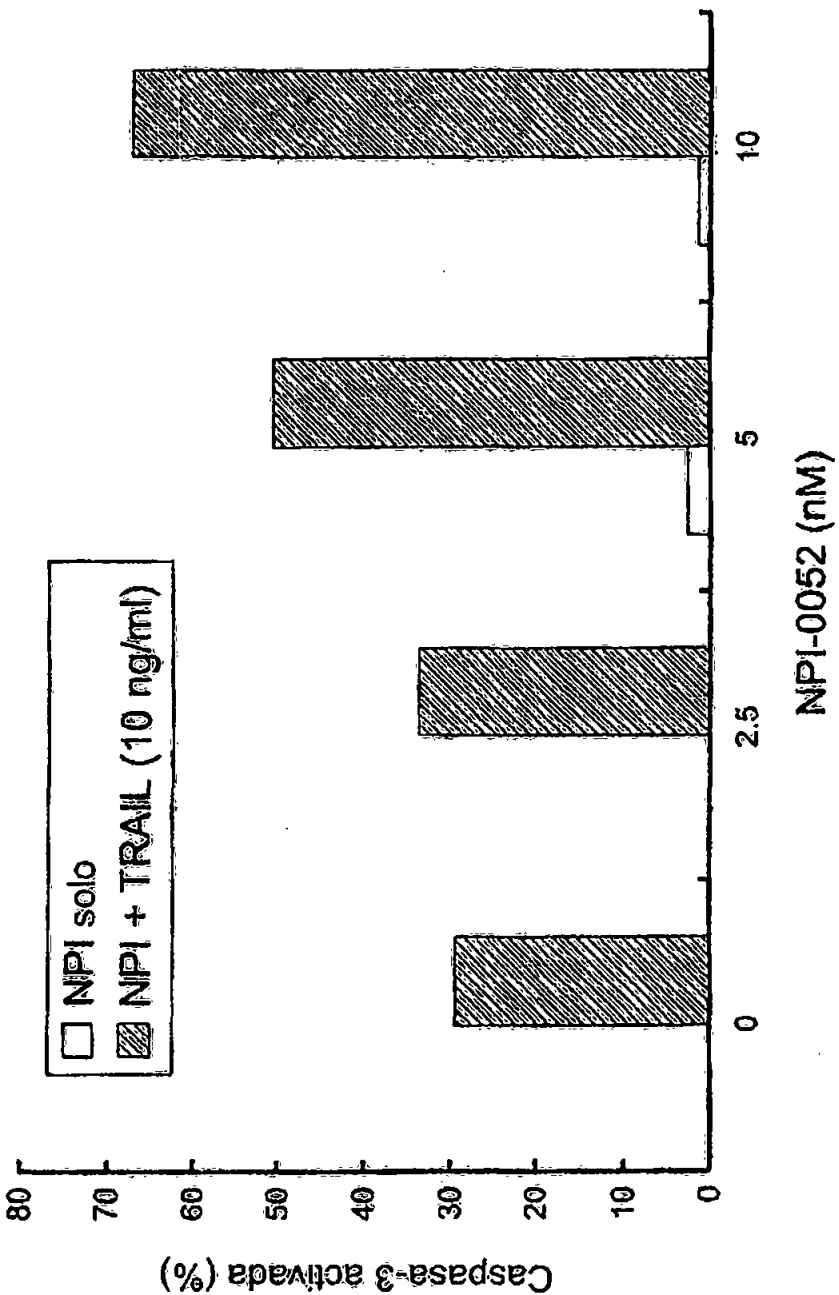


Fig. 18
 Cells treated with PI3K and JAK2 inhibitors and PI3K

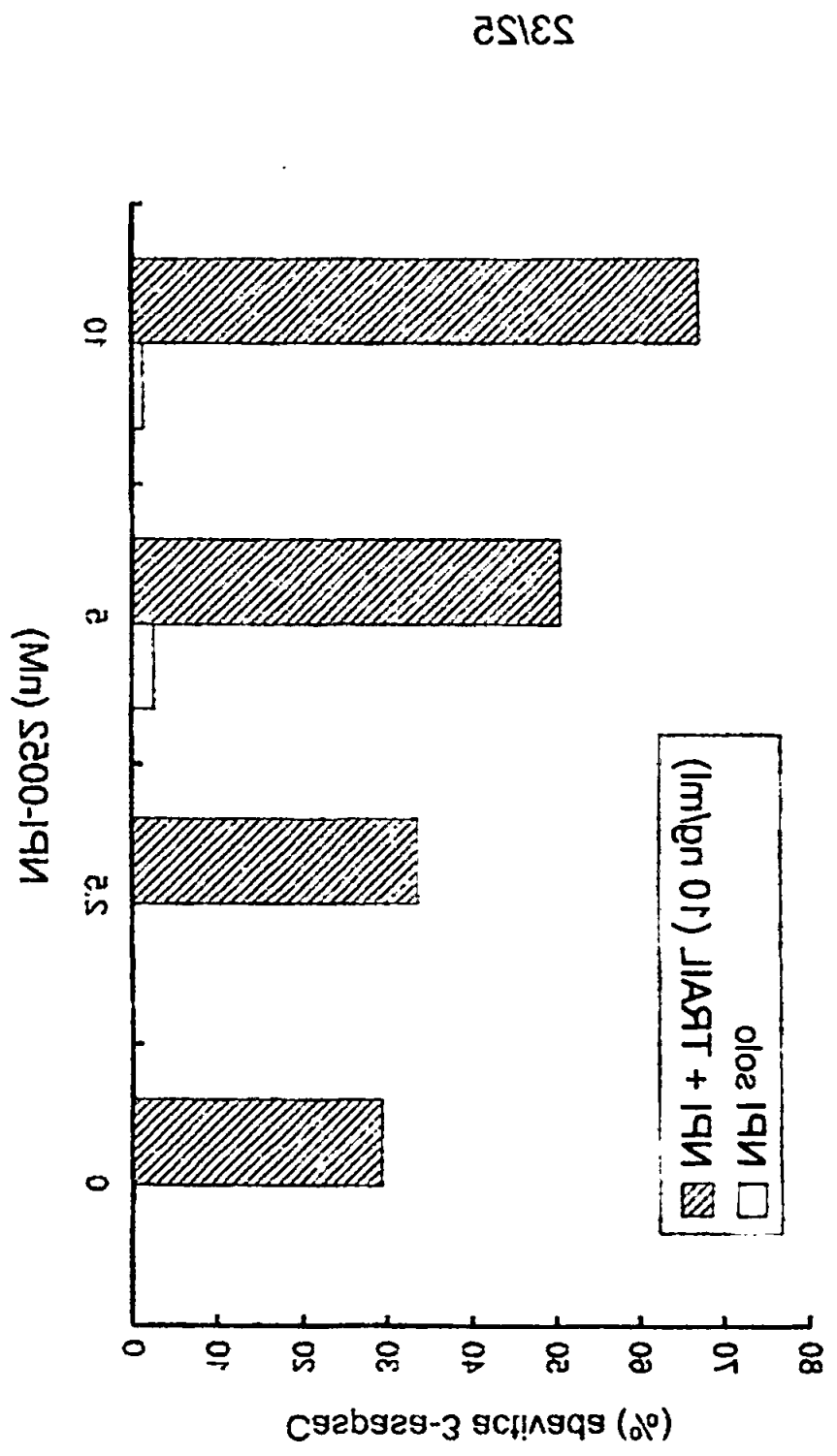
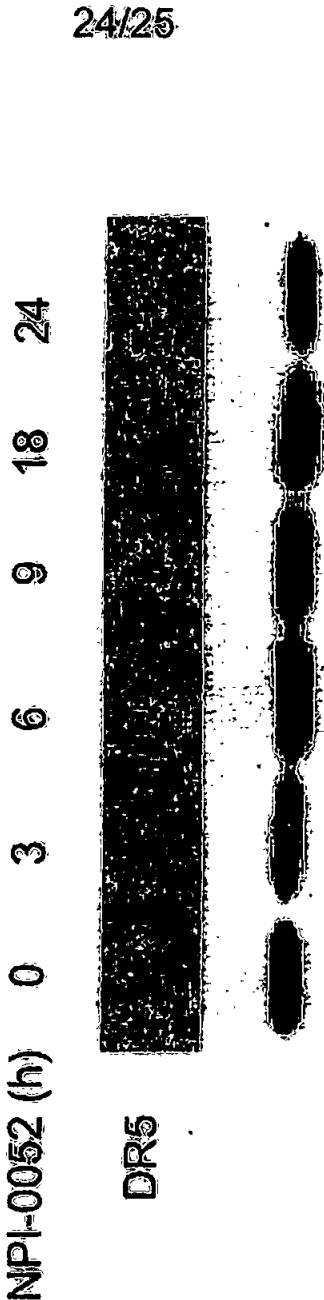


Fig. 19

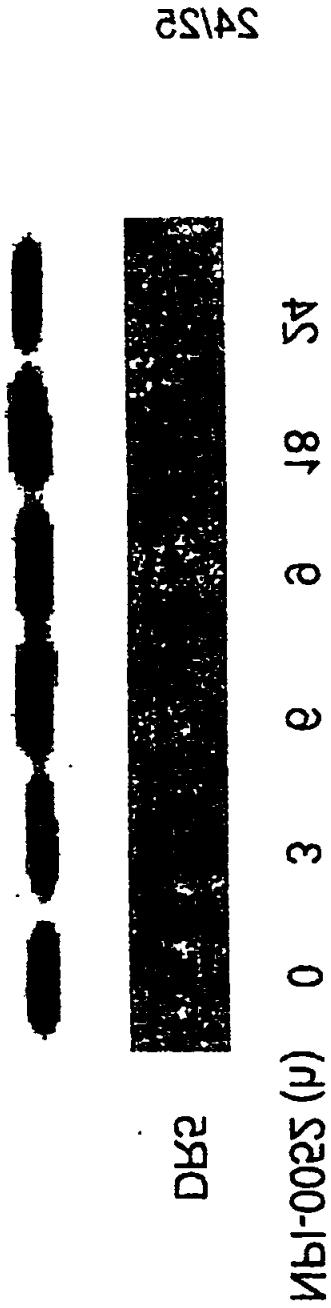
Inducción de expresión de DR5 en células Ramos



Se trataron células Ramos con NPI (2.5 nM) por diversos periodos de tiempo, después se prepararon y examinaron lisados de células totales por Western para DR5 y beta-actina

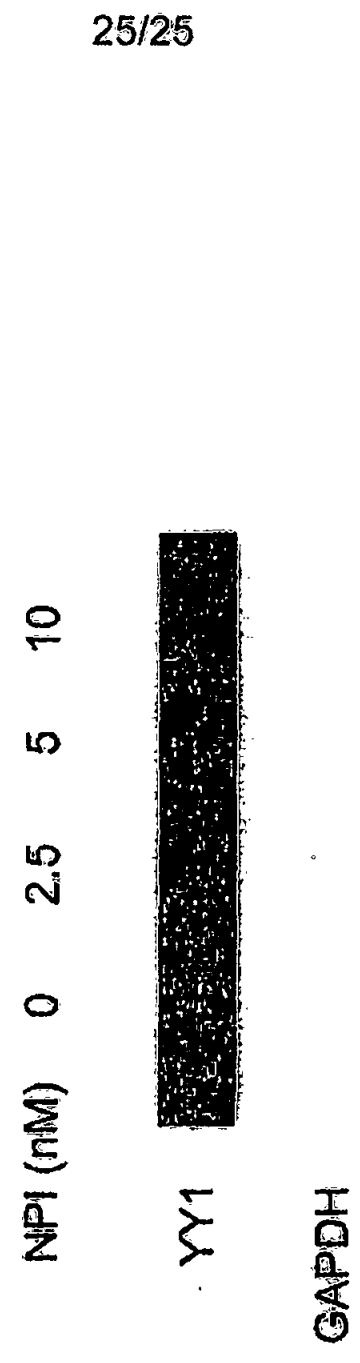
Fig. 12

Inducción de expresión de DR2 en células Ramos



Se tratan células Ramos con MFI 2.5 (Mn 2.5) por 24 h y se analizan por Western blot. Después se preparan y analizan las células de Ramos por Western blot para DR2 y p53.

Fig. 20
 NPI inhibe ARNm YY1 en células Ramos



Se trataron células Ramos con diversas concentraciones de NPI (0 -10 nM) por 24 h. Total de ARNs se prepararon e YY1 se examina por RT-PCR. GAPDH se carga como control.

05. pif

somaz salulôz nê ryy mия edihni IPI

0r 2 2.S 0 (Mn) IPI

52/52

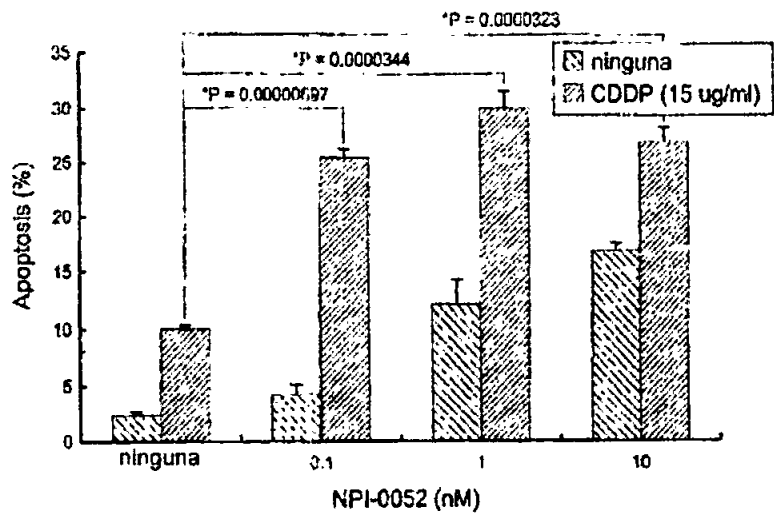


ryy

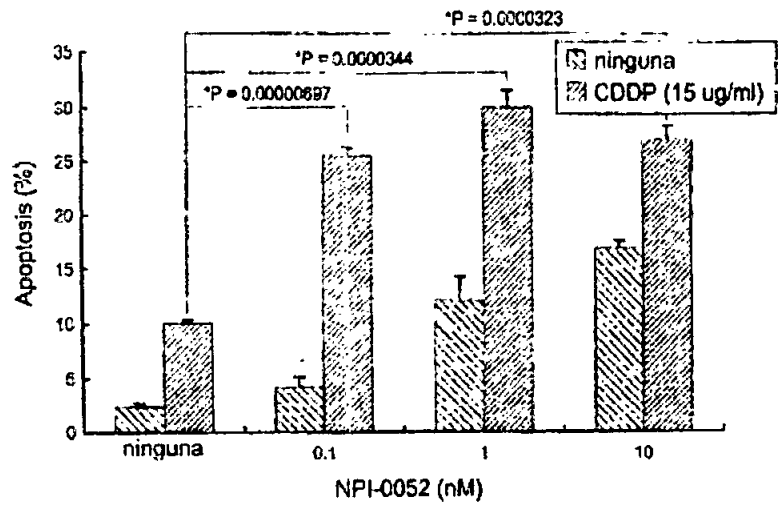
HQPAD

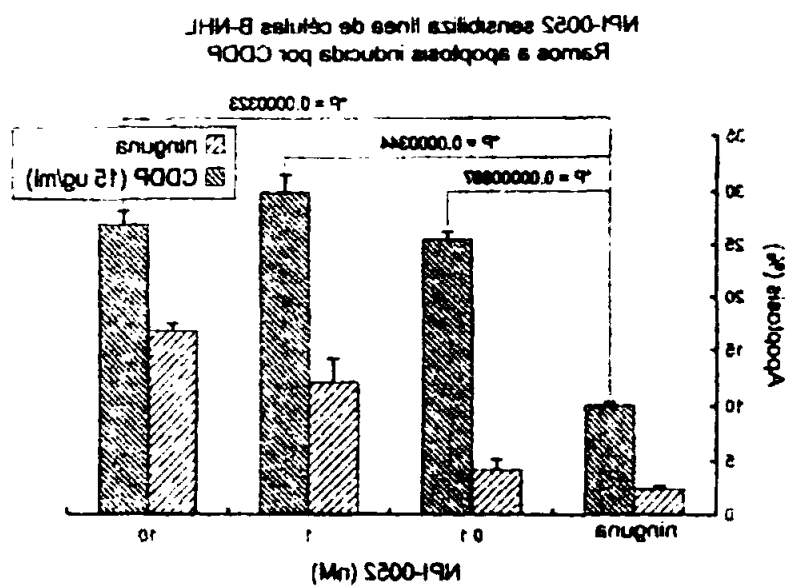
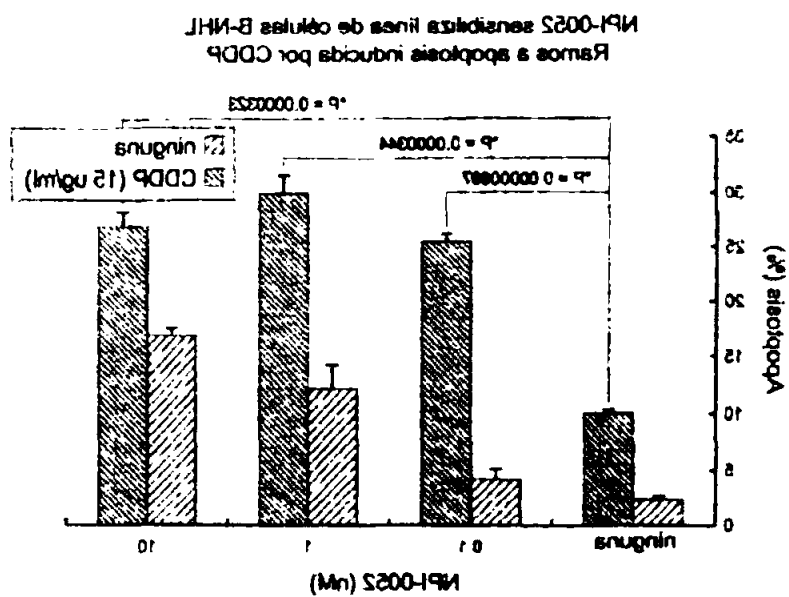
.n 42 10q (Mn 0r- 0) IPI eb senociatnecnoo asarevib noo somaz salulôz notatrit e2
RCP-TR 10q enimeze e ryy e notatqerq e2 sия eb latot
.lotnoco omo egras e2 HQPAD

NPI-0052 sensibiliza línea de células B-NHL
Ramos a apoptosis inducida por CDDP



NPI-0052 sensibiliza línea de células B-NHL
Ramos a apoptosis inducida por CDDP





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 3 DE JUNIO DE 2008

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) 1) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
2) NEREUS PHARMACEUTICALS

(72) Inventor(es) Benjamin BONAVIDA y Michael PALLADINO

(74) Agente: HUMBERTO RUBIO CAMACHO

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
----------------	--------------------	------------	-----------

ESTADOUNIDENSE

60/733,965

04/11/2005

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADOUNIDENSE

60/840,811

28/08/2006

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 18/05/2007

Fecha de presentación de la solicitud: 06/11/2006

N° publicación: WO 2007/056335

No. de solicitud: PCT/US2006/043277

(54) Título: MÉTODOS DE SENSIBILIZACIÓN DE CÁNCER A CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TERAPIA

130

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 3 DE JUNIO DE 2008

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) 1) THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
2) NEREUS PHARMACEUTICALS

(72) Inventor(es) Benjamin BONAVIDA y Michael PALLADINO

(74) Agente: HUMBERTO RUBIO CAMACHO

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	32)	Fecha	(33) País
ESTADOUNIDENSE		60/733,965		04/11/2005	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/840,811		28/08/2006	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

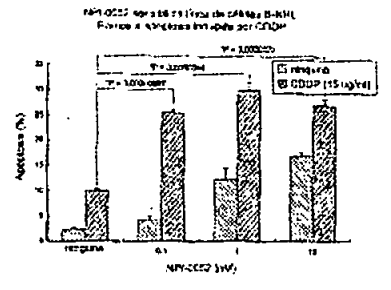
Fecha de presentación de la solicitud: 06/11/2006

No. de solicitud: PCT/US2006/043277

(87) Publicación internacional:

Fecha: 18/05/2007

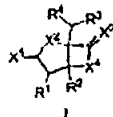
No. de publicación: WO 2007/056335



(54) Título: MÉTODOS DE SENSIBILIZACIÓN DE CÁNCER A CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR TERAPIA

Resumen:

Un método para tratar, evitar o inhibir un cáncer, el método se caracteriza porque comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo para terapia de cáncer y una cantidad sensibilizante efectiva de un compuesto de la Fórmula I:



en donde cada uno de R¹, R² y R³ independientemente se eligen del grupo que consiste de: H, alquilo, alquilo sustituido, alquienilo, alquienilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida y sulfuro; R⁴ es un cicloalquilo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵ o un cicloalquienilo de 5 a 8 miembros opcionalmente sustituido con 1 a 8 grupos R⁵; cada R⁵ independientemente se elige del grupo que consiste de: alquilo, alquilo sustituido, alquienilo, alquienilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo y cicloalquilo sustituido; cada uno de X¹, X², X³ y X⁴ se elige del grupo que consiste de: O, NR⁶ y S; y R⁶ es H o C₁-C₆ alquilo.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055953-00000-0000

Fecha: 2008-06-03 15:30:13

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONI

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 135



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD



- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente: ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud: ☒
- ◆ Descripción de la invención: ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes: ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas: ☒

COMPLETA ☒

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: ☐
- ◆ 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 ☐

Diego Jarama
Firma Responsable

Fecha 3-06-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 62 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

137

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO

REFERENCIA	Radicación No.	8 55953
	Solicitud internacional	PCT/US2006/043277
	Fecha inicio fase nacional	04/06/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8332

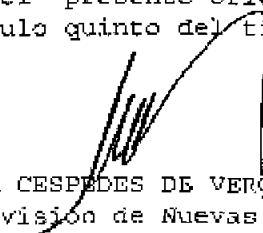
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal a), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 JUN. 2008
adpall