

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 941**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 19204477 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022 EP 3647783**

54 Título: **Identificación de la respuesta del paciente a la administración del modulador del receptor S1P**

30 Prioridad:

**04.04.2013 US 201361808406 P**

**12.04.2013 US 201361811321 P**

**18.04.2013 US 201361813380 P**

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

**26.05.2023**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BORELL, HUBERT;**

**GARDIN, ANNE;**

**JIN, YI;**

**LEGANGNEUX, ERIC y**

**UFER, MIKE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 941 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Identificación de la respuesta del paciente a la administración del modulador del receptor S1P

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a siponimod (BAF312), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece esclerosis múltiple con un tipo metabolizador lento; y una combinación farmacéutica de siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un promotor de la actividad metabólica de CYP2C9; cada uno como se define en las reivindicaciones y a continuación.

### Antecedentes

BAF312 pertenece a la clase de moduladores del receptor S1P. Estos son compuestos que emiten señales como agonistas en uno o más receptores de fosfato de esfingosina-1, por ejemplo, de S1P1 a S1P8. La unión de un agonista a un receptor S1P puede, por ejemplo, dar como resultado la disociación de proteínas G heterotriméricas intracelulares en  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ -GTP, y/o la fosforilación aumentada del receptor ocupado por agonista, y/o la activación de vías de señalización/cinasas corriente abajo.

Los moduladores o agonistas del receptor S1P son compuestos terapéuticos útiles para el tratamiento de diversas afecciones en mamíferos, especialmente, en seres humanos. Por ejemplo, se ha demostrado la eficacia de los moduladores o agonistas del receptor S1P en la prevención del rechazo de trasplantes en modelos en rata (piel, corazón, hígado, intestino delgado), perro (riñón) y mono (riñón). Además, debido a su potencia inmunomoduladora, los moduladores o agonistas del receptor S1P también son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

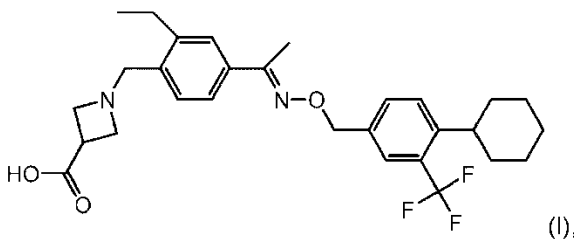
BAF312 generalmente es bien tolerado en pacientes humanos, pero al igual que otros moduladores del receptor S1P, produce un efecto cronotrópico negativo cuando se administra por primera vez, cuya magnitud aumenta con el aumento de la dosis. En el caso de BAF312, el efecto cronotrópico negativo se puede mejorar mediante el uso de una pauta de titulación de dosis como se describe en el documento WO2010/072703.

Sin embargo, el efecto de una dosis dada de BAF312 (incluyendo efectos secundarios tales como el efecto cronotrópico negativo o la duración del período de reposo farmacológico) puede ser diferente en algunos pacientes a diferencia de otros, por ejemplo, dependiendo de cuán exhaustivamente el paciente metabolice BAF312. Por lo tanto, sería deseable, con el fin de mejorar la relación riesgo-beneficio para estos pacientes, poder identificar a los pacientes para los que estos efectos serían significativamente diferentes y ajustar la pauta de tratamiento en consecuencia.

El documento WO2010/072703 describe BAF312 como agonista del receptor S1P útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la esclerosis múltiple, y describe una pauta de dosificación.

### Breve divulgación de la invención

En un primer aspecto de la invención, la invención se refiere a siponimod de fórmula (I),



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece una afección autoinmunitaria, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) someter a ensayo si el paciente tiene o no el genotipo metabolizador lento seleccionado de los genotipos CYP2C9\*3\*3 y CYP2C9\*2\*3; y
- (ii) si se ha identificado que el paciente no tiene el genotipo metabolizador lento, administrar siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente a la dosis terapéutica de referencia; o
- (iii) si se ha identificado que el paciente tiene el genotipo metabolizador lento, ya sea

(a) administrar siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente a una dosis terapéutica inferior a la dosis terapéutica de referencia; o

(b) no administrar siponimod al paciente.

Especialmente, en un segundo aspecto, la invención se refiere a siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como en el primer aspecto de la invención, en donde el genotipo metabolizador lento es el genotipo CYP2C9\*3\*3.

Especialmente, en un tercer aspecto de la invención, la invención se refiere a siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como en el primer aspecto de la invención, en donde el genotipo metabolizador lento es el genotipo CYP2C9\*2\*3.

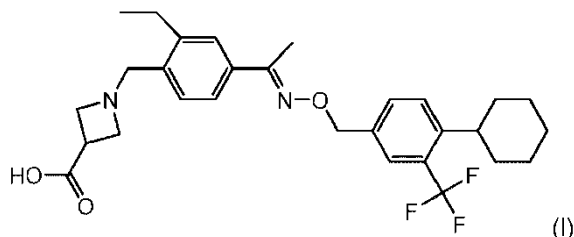
Especialmente, en un cuarto aspecto de la invención, la invención se refiere a siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como en el primer aspecto de la invención, en donde la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple progresiva secundaria con recaídas (EMPSr) o esclerosis múltiple progresiva secundaria sin recaídas (EMPS).

Especialmente, en un quinto aspecto de la invención, la invención se refiere a siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como en uno cualquiera de los aspectos primero a cuarto de la invención, en donde la dosificación terapéutica de referencia es una dosificación diaria en el intervalo de 1,5 a 2,5 mg.

Especialmente, en un sexto aspecto de la invención, la invención se refiere a siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como en uno cualquiera de los aspectos primero a cuarto de la invención, en donde en el caso de un paciente con el tipo metabolizador lento la dosificación terapéutica diaria está en el intervalo de 0,1 a 1 mg.

En otro aspecto de la invención, la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende

(a) siponimid de fórmula (I),



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(b) un promotor de la actividad metabólica de CYP2C9 para su uso simultáneo, por separado o secuencial, en donde el promotor de la actividad metabólica de CYP2C9 se selecciona del grupo que consiste en rifampicina y carbamazepina.

#### Breve descripción de las figuras

La **Figura 1-1** muestra una biotransformación dependiente del tiempo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312. La cinética de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 1 y 10  $\mu\text{M}$  se investigó usando microsomas hepáticos humanos (0,3 mg de proteína/ml). La desaparición de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

La **Figura 1-2** muestra una biotransformación dependiente de proteínas de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312. La dependencia de proteínas del metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 10  $\mu\text{M}$  se investigó (incubaciones de 60 minutos) usando microsomas hepáticos humanos. La desaparición de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

La **Figura 1-3** muestra la cinética enzimática de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en microsomas hepáticos humanos. La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en microsomas hepáticos humanos combinados (0,1 mg/ml) después de 90 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee (parte inferior) ajustados con el modelo de inhibición por sustrato.

| Modelo cinético                          | $V_{\text{máx}}$ [pmol/min/mg] | $K_m^{ap}$<br>[μM] | $V_{\text{máx}}/K_m$ μl/mg/min |
|------------------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Inhibición por sustrato (no competitiva) | $191 \pm 25$                   | $50,3 \pm 9,7$     | 3,8                            |

La **Figura 1-4** muestra una biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 por CYP P450 humanos recombinantes. La biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 por enzimas recombinantes (30 pmol/ml) en membranas de células de insectos que expresan una única isoenzima del citocromo P450 humano y por MHH (108 pmol de CYP/ml) se investigó después de incubaciones de 30 minutos a 10 y 40 μM. La formación de metabolitos se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

La **Figura 1-5** muestra la cinética enzimática del metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 por rhCYP2C9. La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (metabolitos totales) en rhCYP2C9 (50 pmol/ml) después de 60 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee ( $V$  frente a  $V/S$ , parte inferior) ajustado el modelo de inhibición por sustrato usando concentraciones de sustrato de 5-300 μM.

| $V_{\text{máx}}$ [pmol/min/nmol] | $K_m^{ap}$<br>[μM] | $V_{\text{máx}}/K_m$ μl/nmol/min |
|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| $2596 \pm 233$                   | $34,6 \pm 5,0$     | 75,2                             |

La **Figura 1-6** muestra la cinética enzimática del metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 por rhCYP3A4. La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (metabolitos totales) en rhCYP3A4 (50 pmol/ml) después de 30 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee ( $V$  frente a  $V/S$ , parte inferior) usando concentraciones de sustrato de 5-250 μM.

| $V_{\text{máx}}$ [pmol/min/nmol] | $K_m^{ap}$<br>[μM] | $V_{\text{máx}}/K_m$ μl/nmol/min |
|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| $70b \pm 31$                     | $85,1 \pm 8,6$     | 8,30                             |

La **Figura 1-7** muestra la inhibición del metabolismo de BAF312 en MHH por inhibidores químicos. La biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (5 μmol/l) por microsomas hepáticos de rata humanos (0,1 mg/ml) se investigó en presencia y en ausencia de inhibidores diferentes. Los sobrenadantes de las incubaciones después de 90 minutos se analizaron mediante HPLC con radiodetección.

La **Figura 1-8** muestra una comparación de tasas de metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en MHH de donantes individuales con 3 genotipos de CYP2C9 diferentes

#### Divulgación detallada de la invención

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, los términos "comprenden" y "contienen", y variaciones de estos, significan "incluyendo, pero sin limitación" y no tienen por objeto excluir otros restos, aditivos, componentes, elementos integrantes ni etapas (y no los excluyen).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, ha de entenderse que la memoria descriptiva (cuyo término abarca tanto la descripción como las reivindicaciones) contempla tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa. Ha de entenderse que las características, elementos integrantes, rasgos, compuestos, restos químicos o grupos que se describen junto con un aspecto, realización o ejemplo particulares de la invención pueden aplicarse a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descritos en el presente documento, a menos que sea incompatible con ellos.

El término "tratamiento" (método de tratamiento) incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se desarrolla en un animal, particularmente un mamífero y especialmente un ser humano, que puede estar afectado por el estado, trastorno o afección, o predispuesto al mismo, pero que aún no experimenta o muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección; (2) inhibir el estado, trastorno o afección (por ejemplo, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad, o una recaída de la misma en caso de tratamiento de mantenimiento, de al menos un síntoma clínico o subclínico de la misma); y/o (3) aliviar la afección (es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos). El beneficio para un paciente al que ha de tratarse es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o para el médico. Sin embargo, se apreciará que cuando se administra un medicamento a un paciente para tratar una enfermedad, el resultado puede no ser siempre un tratamiento eficaz. La invención se refiere a siponimod o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece esclerosis múltiple según se reivindica, más que a un método de tratamiento como tal.

Se entiende que "BAF312", como se usa en el presente documento, comprende el compuesto de fórmula (I) así como las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

La expresión "dosificación terapéutica" significa la dosis diaria de mantenimiento del fármaco que se administra a los pacientes para el tratamiento o la prevención de la enfermedad que ha de tratarse o prevenirse. Esta dosificación puede seleccionarse para proporcionar el equilibrio óptimo entre eficacia y seguridad.

La expresión "genotipo metabolizador lento" incluye pacientes que experimentan una exposición significativamente mayor después de la administración de BAF312 que los pacientes normales a una dosis de fármaco dada, por ejemplo, 2 mg una vez al día de BAF312. El genotipo metabolizador lento incluye el subtipo o subtipos del genotipo de CYP2C9 asociados a un metabolismo lento del ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico. El genotipo metabolizador lento se selecciona de los genotipos CYP2C9\*3\*3 y CYP2C9\*2\*3, por ejemplo, el genotipo CYP2C9\*3\*3.

En una realización preferida, el genotipo metabolizador lento es el genotipo CYP2C9\*3\*3.

La expresión "dosificación o dosificaciones terapéuticas de referencia" significa la dosificación diaria terapéutica para pacientes que no tienen el genotipo metabolizador lento. La dosis terapéutica de referencia puede ser superior o igual a 0,2 mg, por ejemplo, superior o igual a 0,4 mg, superior o igual a 1,0 mg o superior o igual a 1,5 mg. La dosis terapéutica de referencia puede ser inferior o igual a 8 mg, por ejemplo, inferior o igual a 5 mg, inferior o igual a 4 mg o inferior o igual a 2,5 mg.

En una realización preferida, la dosis terapéutica de referencia está en el intervalo de 1,5 a 2,5 mg, por ejemplo, aproximadamente 2 mg por día.

En el caso de pacientes que tengan el genotipo metabolizador lento, la dosificación terapéutica diaria puede ser inferior a la dosificación terapéutica de referencia. Por ejemplo, la dosificación terapéutica para esta clase de pacientes puede ser superior o igual a 0,1 mg, tal como superior o igual a 0,25 mg o superior o igual a 0,4 mg. La dosificación terapéutica puede ser inferior o igual a 1 mg, tal como inferior o igual a 0,9 mg o inferior o igual a 0,75 mg.

En una realización preferida, en el caso de pacientes que tienen el genotipo metabolizador lento, la dosificación terapéutica diaria puede estar en el intervalo de 0,25-0,75 mg, por ejemplo, 0,25 mg, 0,5 mg o 0,75 mg, preferentemente 0,5 mg.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad", "dosis" o "dosificación" de BAF312 medida en miligramos se refiere a los miligramos de BAF312 (forma libre) presentes en una preparación, independientemente de la forma de la preparación. Una "dosis de 2 mg de BAF312" significa que la cantidad de BAF312 (forma libre) en una preparación es de 2 mg, independientemente de la forma de la preparación. Por lo tanto, cuando está en forma de sal, por ejemplo, la sal hemifumarato de BAF312, el peso de la forma de sal necesaria para proporcionar una dosis de 2 mg de BAF312 sería superior a 2 mg debido a la presencia del ion hemifumarato adicional.

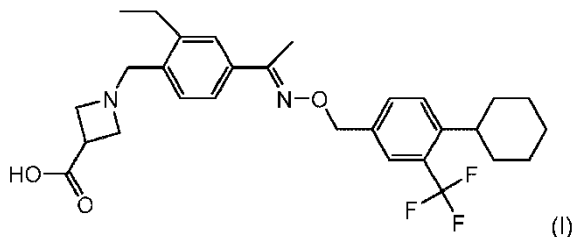
Los pacientes que necesitan tratamiento con BAF312 son pacientes que padecen esclerosis múltiple. Por lo tanto, los pacientes que necesitan tratamiento son pacientes que padecen esclerosis múltiple, por ejemplo, esclerosis múltiple recurrente (EMR), esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP), esclerosis múltiple progresiva secundaria con recaídas (EMPSr), esclerosis múltiple progresiva secundaria sin recaídas (EMPS), por ejemplo, para pacientes que padecen EMPSr o EMPS.

En una realización preferida, el paciente padece esclerosis múltiple progresiva secundaria con recaídas (EMPSr) o esclerosis múltiple progresiva secundaria sin recaídas (EMPS).

En un aspecto, cuando se identifica que el paciente es del tipo metabolizador lento, no se puede administrar al paciente ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico si se considera que el

paciente pertenece a una categoría de riesgo mayor. Por ejemplo, no puede administrarse ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico a pacientes metabolizadores lentos con riesgo de efectos secundarios cardíacos, por ejemplo, pacientes con riesgo de insuficiencia cardíaca, arritmias, pacientes con bloqueos auriculoventriculares de alto grado o síndrome del seno enfermo, pacientes con antecedentes de episodios de síncope o pacientes que requieren o están en tratamiento con beta-bloqueantes, o pacientes que requieren o están en tratamiento antiarrítmico, tal como pacientes en tratamiento con fármacos antiarrítmicos de Clase Ia (por ejemplo, quinidina, procainamida) o de Clase III (por ejemplo, amiodarona, sotalol).

BAF312 (con la DCI Siponimod) tiene el nombre químico ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico y tiene la estructura de fórmula (I) a continuación:



el ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico se puede administrar en forma de una base libre, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (incluyendo formas polimórficas de la sal) o en forma de un profármaco.

Las formas de sal farmacéuticamente aceptables incluyen clorhidrato, malato, oxalato, tartrato y hemifumarato.

En un aspecto preferido, el ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico se administra en forma de una sal hemifumarato.

### **Ensayos de genotipo del paciente**

*In vitro*, se identificó al CYP2C9 como la principal enzima metabolizadora en los microsomas hepáticos. Puesto que esta enzima es genéticamente polimórfica, se anticiparon los efectos del polimorfismo genético en el metabolismo oxidativo. Además de los métodos clásicos de fenotipado enzimático, el enfoque que usa microsomas individuales de donantes genotipados se diseñó para abordar este efecto *in vitro*. El análisis de sensibilidad del genotipo CYP2C9 posterior demostró actividades metabólicas sustancialmente reducidas en los microsomas hepáticos de donantes individuales con genotipos CYP2C9\*2\*2 y CYP2C9\*3\*3 especiales en comparación con los donantes de tipo silvestre.

Como entiende el experto en la materia, el genotipo del paciente desempeña una función importante en la determinación del fenotipo observado, es decir, la capacidad observada de la enzima CYP2C9 para metabolizar BAF312. En el caso de la enzima CYP2C9, existe una estrecha correlación entre el genotipo CYP2C9 medido y el fenotipo metabolizador lento observado. Por lo tanto, el ensayo del genotipo es un buen predictor del fenotipo observado.

Para evitar dudas, en un aspecto de la invención, el genotipo del paciente (incluyendo si el paciente tiene o no el genotipo metabolizador lento) puede someterse a ensayo por correlación con el fenotipo observado.

El fenotipo CYP2C9 puede someterse a ensayo mediante la administración de un sustrato sonda de CYP2C9 y el cálculo de la denominada relación metabólica (= concentración plasmática de metabolito/compuesto precursor).

Los ensayos del genotipo del paciente para pacientes que pertenecen a la subclase de metabolizadores lentos pueden realizarse mediante cualquier método de ensayo de referencia, por ejemplo, mediante un método de genotipado de referencia, por ejemplo, cribado por PCR. El genotipo del paciente puede determinarse mediante un método de ensayo *in vitro*, por ejemplo, un método de genotipado. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* pueden realizarse tomando un fluido corporal (por ejemplo, sangre o saliva, por ejemplo, sangre) o una muestra de tejido del paciente y analizando la muestra mediante cualquier método de ensayo de referencia (por ejemplo, cribado por PCR) para determinar el genotipo del paciente. En una realización, el genotipo del paciente se determina mediante el análisis de una muestra de sangre, saliva o tejido extraída del paciente. En una realización preferida, el genotipo del paciente se determina mediante el análisis de una muestra de sangre extraída del paciente.

El genotipo del paciente puede someterse a ensayo *in vivo* midiendo la exposición del paciente a BAF312 después de la administración y, en los casos en los que exista una buena correlación entre el comportamiento metabólico observado y un genotipo específico, asignando el genotipo del paciente basándose en el comportamiento del fenotipo observado.

### Realizaciones específicas

La invención proporciona las siguientes realizaciones específicas de los aspectos de la invención:

ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece esclerosis múltiple, teniendo dicho paciente el genotipo CYP2C9\*3\*3, comprendiendo dicho método administrar ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente en una cantidad diaria en el intervalo de 0,25 - 0,75 mg, por ejemplo, en una cantidad diaria de aproximadamente 0,5 mg.

ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece esclerosis múltiple, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) someter a ensayo si el paciente tiene o no el genotipo CYP2C9\*3\*3; y
- (ii) si el paciente no tiene el genotipo CYP2C9\*3\*3, administrar ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente a una dosis de aproximadamente 2 mg por día; o

- (iii) si el paciente tiene el genotipo CYP2C9\*3\*3, ya sea

- (a) administrar ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente en una cantidad diaria en el intervalo de 0,25-0,75 mg, por ejemplo, en una cantidad diaria de aproximadamente 0,5 mg;

o

- (b) no administrar ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico al paciente.

En un aspecto preferido para las realizaciones específicas anteriores, el paciente es un paciente que padece EMPS o EMPSr.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - Identificación de CYP2C9 como principal enzima metabolizadora del ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico

#### Lista de abreviaturas

CHAPS 3-[3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato

$CL_{int}$  Aclaramiento intrínseco

CYP Citocromo P450

IFF Interacción fármaco-fármaco

DETC dietilditiocarbamato

BT Biotransformación

MHH Microsomas hepáticos humanos

HPLC Cromatografía de líquidos de alto rendimiento

$K_m$  Constante de Michaelis-Menten (concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima)

$K_m^{ap}$

Constante aparente de Michael-Menten

LSC Recuento de centelleo líquido

*min* minutos

*NADP<sup>+</sup>* Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina-forma oxidada

*NADPH* Fosfato de dinucleótido de dihidronicotinamida y adenina (forma reducida de *NADP<sup>+</sup>*)

*R* Coeficiente de correlación entre dos conjuntos de datos

*rhCYP* Citocromo P450 humano recombinante

*rpm* Revoluciones por minuto

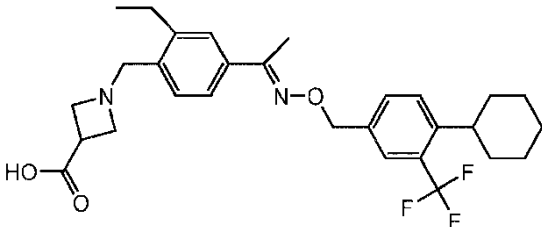
*TAO* troleandomicina

*UV* Ultravioleta

*V<sub>máx</sub>* Velocidad máxima (velocidad de reacción a una concentración de sustrato saturada)

## 1. Materiales y métodos

### 1.1 Sustancia de ensayo

|                                              |                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Compuesto marcado:</i>                    | El marcaje y la purificación de [ <sup>14</sup> C]BAF312 fueron realizados por Isotope Laboratories Basel, Novartis Pharma AG, Suiza |
| <i>Fórmula molecular / Peso (sin marcar)</i> | C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> / 516,61                                                |
| <i>Pureza radioquímica</i>                   | 98,9 %                                                                                                                               |
| <i>Actividad específica</i>                  | 4,218 MBq/mg                                                                                                                         |
| <i>Estructura química</i>                    |                                                  |

Se prepararon soluciones madre de [<sup>14</sup>C]BAF312 5 mM en tampón de fosfato 100 mM pH 7,4 que contenía CHAPS al 0,25 % (para aumentar la solubilidad) y se diluyeron adecuadamente para incubaciones en tampón de fosfato 100 mM pH 7,4.

### 1.2 Compuestos químicos

Se adquirieron furafilina, quercetina, quinidina, sulfafenazol, ketoconazol, CHAPS, TAO y tranilcipromina en Sigma Chemicals (San Luis, MO, EE.UU.). Se adquirió DETC en Fluka AG (Buchs, Suiza) y trietilentiofosforamida en Acros Organics (Geel, Bélgica)

Se preparó tampón de fosfato pH 7,4 (100 mM) mezclando 60 ml de solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM (Fluka AG, Buchs, Suiza) y 470 ml de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 100 mM (Merck, Darmstadt, Alemania). El pH se ajustó con precisión a 7,4 con la solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM. Se obtuvo agua destilada (calidad de HPLC) en Fluka AG (Buchs, Suiza). El β-NADPH era de Sigma (San Luis, MO, EE.UU.). Se adquirió tampón Tris pH 7,4 (1 M) de Applichem (Darmstadt, Alemania) y se diluyó posteriormente a 0,1 M con agua (Fluka).

Se usó Irga Safe Plus como cóctel de recuento de centelleo líquido (ref. 6013249, Packard Bioscience, Meriden, CT, EE.UU.). Para la radiodetección en línea en el análisis por HPLC, se usó el centelleador líquido Rialuma® (Lumac-LSC, Groningen, Países Bajos). Se usaron los siguientes productos químicos para preparar los disolventes de HPLC: ácido



trifluoroacético (calidad analítica, ref. 97100, Fluka), ácido fórmico (calidad analítica, ref. 00264, Merck), acetonitrilo (calidad de gradiente, ref. 0030, Merck) y agua (calidad cromatográfica, ref. 94486, Fluka). Otros reactivos, compuestos químicos y sales tampón eran de Merck (Darmstadt, Alemania) o Fluka AG (Buchs, Suiza) y eran de calidad analítica.

### 5 1.3 Microsomas hepáticos humanos

Se obtuvo una combinación de microsomas hepáticos preparados a partir de 47 donantes individuales de BD Biosciences (Woburn, MA, EE.UU., N.º de catálogo 452161, Lote 26). Los ensayos de patogenia de cada uno de los hígados de la combinación se realizaron usando un protocolo de PCR. Se encontró que cada hígado era negativo para VIH1 y 2, VLTH 1 y 2 y hepatitis B y C. El contenido total de P450 fue de 360 pmol/mg de proteína. El fabricante proporcionó las actividades catalíticas de las enzimas (actividades en pmol/(mg de proteína • min)): fenacetina O-desetilasa (CYP1A2, 460), cumarina 7-hidroxilasa (CYP2A6, 1300), (S)-mefenitoína N-desmetilasa (CYP2B6, 55), paclitaxel 6a-hidroxilasa (CYP2C8, 190), diclofenaco 4'-hidroxilasa (CYP2C9, 2900), (S)-mefenitoína 4'-hidroxilasa (CYP2C19, 56), bufuralol 1'-hidroxilasa (CYP2D6, 94), cloroxazona 6-hidroxilasa (CYP2E1, 2000), testosterona 6β-hidroxilasa (CYP3A4, 4300), ácido láurico 12-hidroxilasa (CYP4A11, 1400), sulfuro de metil p-tolil oxidasa (FMO, 2100), 3-glucuronidación de estradiol (UGT1A1, 1200), glucuronidación de trifluoperazina (UGT1A4, 490), glucuronidación de propofol (UGT1A9, 4900) y citocromo c reductasa (410).

### 20 1.4 Enzimas P450 humanas recombinantes

Los microsomas preparados a partir de células de insectos infectadas con baculovirus (BTI-TN-5B1-4) que expresaban las siguientes enzimas P450 humanas y las preparaciones de membranas de células de insectos (control negativo) se obtuvieron en BD Biosciences (Woburn, MA, EE.UU.).

25

| Enzima                                     | N.º de Cat. | N.º de lote | Actividad de CYP a) | P450 (pmol/ml) | Proteína (mg/ml) |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|---------------------|----------------|------------------|
| CYP1A1 + P450 reductasa                    | 456211      | 15          | 27,8                | 1000           | 14,3             |
| CYP1A2 + P450 reductasa                    | 456203      | 27          | 21                  | 1000           | 7,0              |
| CYP1B1 + P450 reductasa                    | 456220      | 4           | 5                   | 1000           | 4,7              |
| CYP2A6 + P450 reductasa                    | 456204      | 14          | 9,6                 | 2000           | 13               |
| CYP2B6 + P450 reductasa                    | 456210      | 7           | 5                   | 1000           | 8,3              |
| CYP2C8 + P450 reductasa + b <sub>5</sub>   | 456252      | 16          | 7,9                 | 1000           | 2,6              |
| CYP2C9*1 + P450 reductasa + b <sub>5</sub> | 456258      | 28          | 20                  | 1000           | 2,4              |
| CYP2C18 + P450 reductasa                   | 456222      | 12          | 0,8                 | 1000           | 6,8              |
| CYP2C19 + P450 reductasa                   | 456259      | 18          | 25                  | 1000           | 4,3              |
| CYP2D6*1 + P450 reductasa                  | 456217      | 15705       | 55                  | 1000           | 6,6              |
| CYP2E1+ P450 reductasa + b <sub>5</sub>    | 456206      | 12          | 10                  | 2000           | 6,3              |
| CYP2J2 + P450 reductasa + b <sub>5</sub>   | 456264      | 1           | 18                  | 1000           | 4,8              |
| CYP3A4 + P450 reductasa + b <sub>5</sub>   | 456202      | 61          | 120                 | 1000           | 6,9              |
| CYP3A5 + P450 reductasa                    | 456235      | 16          | 4,4                 | 2000           | 4,6              |
| CYP3A7 + P450 reductasa + b <sub>5</sub>   | 456237      | 7           | 1,1                 | 1000           | 5,4              |
| CYP4A11 + P450 reductasa                   | 456221      | 8           | 32                  | 1000           | 8,7              |
| CYP4F2 + P450 reductasa + b <sub>5</sub>   | 456272      | 2           | 1,6                 | 1000           | 1,8              |
| CYP4F3A + P450 reductasa + b <sub>5</sub>  | 456273      | 3           | 45                  | 500            | 13               |

| Enzima                                    | N.º de Cat. | N.º de lote | Actividad de CYP a) | P450 (pmol/ml) | Proteína (mg/ml) |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|---------------------|----------------|------------------|
| CYP4F3B + P450 reductasa + b <sub>5</sub> | 456274      | 3           | 12                  | 1000           | 2,3              |
| CYP4F12 + P450 reductasa + b <sub>5</sub> | 456275      | 1           | 9,9                 | 1000           | 4,7              |
| CYP19 + P450 reductasa                    | 456260      | 2           | 5,8                 | 1000           | 4,2              |
| Control de insectos                       | 456201      | 52          | n.d.                | n.d.           | 5                |

a): pmol de producto /min/pmol de proteína (CYP1A1: 7-etoxirresorufina desetilasa, CYP1A2: fenacetina desetilasa, CYP1B1: 7-etoxirresorufina desetilasa, CYP2A6: cumarina 7-hidroxilasa, CYP2B6: 7-etoxi-4-trifluorometilcumarina desetilasa, CYP2C8: paclitaxel 6a-hidroxilasa, CYP2C9: diclofenaco 4'-hidroxilasa, CYP2C18 (lote 1): 7-etoxi-4-trifluorometilcumarina desetilasa, CYP2C18 (lotes 2 y 12): diclofenaco 4'-hidroxilasa, CYP2C19: (S)-mefenitoína 4'-hidroxilasa, CYP2D6\*1 y 2D6\*10: bufuralol 1'-hidroxilasa, CYP2E1: p-nitrofenol hidroxilasa, CYP2J2: terfenadina hidroxilasa, CYP3A4: testosterona 6β-hidroxilasa, CYP3A5: testosterona 6β-hidroxilasa, CYP3A7: testosterona 6β-hidroxilasa, CYP4A11: ácido láurico ω-hidroxilasa, CYP4F2: 20-hidroxi leucotrieno B<sub>4</sub>, CYP 4F3A: 20-hidroxi leucotrieno B<sub>4</sub>, CYP 4F3B: 20-hidroxi leucotrieno B<sub>4</sub>, CYP4F12: terfenadina hidroxilasa, CYP19: aromatas).

n.d.: no detectable

### 1.5 Incubación de [<sup>14</sup>C]BAF312 con microsomas hepáticos humanos y CYP humanos recombinantes

- 5 Las incubaciones se realizaron en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,4. Las incubaciones típicas de 200 (o 400) µl de volumen total se prepararon de la siguiente manera: se añadieron 10 µl de MgCl<sub>2</sub> 100 mM (5 mM), soluciones madre de CHAPS, sustrato y microsomas o isoenzimas de citocromo P450 humano recombinante al volumen adecuado del tampón. El detergente CHAPS se añadió a una concentración final como máximo del 0,025 % (p/v) durante toda la incubación con el fin de aumentar la solubilidad de la sustancia de ensayo. La reacción se inició mediante la adición de 20 µl de NADPH
- 10 10 mM fresco (1 mM). Las concentraciones finales se proporcionan entre paréntesis. Las concentraciones finales de disolvente orgánico fueron como máximo del 0,5 % (v/v). Para algunos experimentos, se prepararon volúmenes de incubación mayores manteniendo proporcionalmente la cantidad de todas las soluciones. Las muestras se incubaron a 37 °C en un termomezclador (Eppendorf 5355) con agitación a 500 rpm.
- 15 Las reacciones de incubación se detuvieron y la proteína se precipitó mediante la adición de un volumen igual de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo. Después de 30 min a -80 °C (o durante la noche a -20 °C) las muestras se centrifugaron a 30.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se extrajo. Se analizaron alícuotas mediante LSC (20 µl) y el sobrenadante se diluyó adecuadamente con agua para obtener una solución final que contenía menos del 30 % de acetonitrilo. Para las muestras con una concentración menor de sustrato, los sobrenadantes se evaporaron a
- 20 aproximadamente la mitad de los volúmenes iniciales a presión reducida a 40 °C con el concentrador SpeedVac® (modelo AES 2010, Savant Inc., Holbrook, NY, EE.UU.), después se mezcló con ácido fórmico al 0,5 % en acetonitrilo para obtener una solución final que contenía menos del 30 % de acetonitrilo. Se analizaron soluciones de muestra mediante HPLC combinada con radiodetección. (para el método de HLPC, véase la Sección 1.6)
- 25 El sedimento residual se aclaró dos veces con 0,5 ml de una mezcla de ácido fórmico al 0,25 % en agua/acetonitrilo (1:1, v/v) y se disolvió (aproximadamente una hora con agitación a 20 °C) en 0,5 ml de una mezcla que contenía Soluene-350 al 50 % (v/v) (0,5 M en tolueno) e isopropanol al 50 % (v/v). La radiometría de alícuotas del sobrenadante y de la cantidad total de sedimento disuelto se realizó en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 2500 TR, Packard Canberra Instr. Co. Meriden, CT, EE.UU.) después de mezclar con 10 ml de cóctel de recuento de centelleo líquido.

#### 1.5.1 Microsomas hepáticos humanos

##### Dependencia del tiempo

|                                |                                                                               |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Microsomas hepáticos humanos   | 0,30 mg/ml                                                                    |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                        |
| Tampón                         | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 %, + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM |
| Sustrato (concentración final) | 1 y 10 µM                                                                     |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                 |

## ES 2 941 941 T3

|                            |                                                                                      |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Inicio de la reacción      | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                               |
| Incubador                  | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                             |
| Tiempo de incubación       | 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 90, 120, 60, 90, 120, 150 y 180 min                        |
| Agente de parada           | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C |
| Precipitación de proteínas | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                            |
| Número de muestras         | 1 por condición                                                                      |

### Dependencia de la concentración de proteínas

|                                |                                                                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Microsomas hepáticos humanos   | 0, 0,025, 0,05, 0,01, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1 y 1,3 mg/ml                    |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                               |
| Tampón                         | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM         |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                       |
| Sustrato (concentración final) | 10 µM                                                                                |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                        |
| Inicio de la reacción          | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                               |
| Incubador                      | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                             |
| Tiempo de incubación           | 60 min                                                                               |
| Agente de parada               | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C |
| Precipitación de proteínas     | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                            |
| Número de muestras             | 2 por condición                                                                      |

### Cinética enzimática en MHH

|                                |                                                                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Microsomas hepáticos humanos   | 0,1 mg/ml                                                                            |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                               |
| Tampón                         | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM         |
| Sustrato (concentración final) | Concentraciones de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 µM   |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                       |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                        |
| Inicio de la reacción          | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                               |
| Incubador                      | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                             |
| Tiempo de incubación           | 90 min                                                                               |
| Agente de parada               | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C |
| Precipitación de proteínas     | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                            |
| Número de muestras             | 2 por condición                                                                      |

## ES 2 941 941 T3

### Inhibición por inhibidores específicos

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Microsomas hepáticos humanos    | 0,1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Volumen de incubación           | 200 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Tampón                          | Fosfato 100 mM, pH 7,4, + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Sustrato (concentración final)  | 5 y 40 µM (en CHAPS al 0,0003 % y al 0,002 %)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Disolvente                      | Metanol: ≤ 0,5 %                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Inhibidor (concentración final) | (Solución madre en metanol):<br>*furafilina (Inhibidor de 1A2): 2 y 10 µM<br>*dietilditiocarbamato (DETC, inhibidor de 2E1): Quercetina 5 y 30 µM (inhibidor de 2C8): 2 y 10 µM<br>Trietilentioposforamida (inhibidor de 2B6): Sulfafenazol 5 y 20 µM (inhibidor de 2C9): Tranilcipromina 2 y 10 µM (inhibidor de 2C19): Quinidina 2 y 10 µM (inhibidor de 2D6): Ketoconazol 0,1 y 1 µM (inhibidor de 3A4): 0,1 y 1 µM |
| Preincubación                   | 3 min a 37 °C; *: 15 min a 37 °C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Inicio de la reacción           | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                 | *iniciar la reacción con sustrato después de 15 min de preincubación a 37 °C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Incubador                       | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Tiempo de incubación            | 90 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Agente de parada                | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Precipitación de proteínas      | Centrifugación durante 15 min, 30.000 g                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Número de muestras              | 2 por condición                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

### MHH de donantes únicos con diferentes genotipos de CYP2C9

|                                |                                                                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Microsomas hepáticos humanos   | 0,1 mg/ml                                                                               |
|                                | Donante único de MHH con genotipo de CYP2C9 1*/1* (HG6), 2*/2* (HG103), 3*/3* (HK27)    |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                                  |
| Tampón                         | Tris 100 mM (pH 7,4) que contiene CHAPS al 0,0005 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM |
| Sustrato (concentración final) | [14C]BAF312 5 µM                                                                        |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                          |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                           |
| Inicio de la reacción          | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                                  |
| Incubador                      | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                                |
| Tiempo de incubación           | 60 min                                                                                  |
| Agente de parada               | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C    |
| Precipitación de proteínas     | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                               |
| Número de muestras             | 2 por condición                                                                         |

1.5.2 CYP recombinantesCartografiado de enzimas

|                                |                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Isoenzimas                     | 30 pmol de CYP/ml                                                                                                                                                                                             |
|                                | control de células de insectos, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6*1, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4A11, CYP4F2, CYP4F3A, CYP4F3B, CYP4F12, CYP19 |
|                                | MHH (combinación, 0,3 mg/ml),                                                                                                                                                                                 |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                                                                                                                                                        |
| Tampón                         | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM                                                                                                                                  |
| Sustrato (concentración final) | 10 y 40 µM                                                                                                                                                                                                    |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                                                                                                                                                |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                                                                                                                                                 |
| Inicio de la reacción          | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                                                                                                                                                        |
| Incubador                      | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                                                                                                                                                      |
| Tiempo de incubación           | 30 min                                                                                                                                                                                                        |
| Agente de parada               | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C                                                                                                                          |
| Precipitación de proteínas     | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                                                                                                                                                     |
| Número de muestras             | 2 por condición                                                                                                                                                                                               |

Cinética enzimática de CYP3A4

|                                |                                                                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| CYP recombinantes              | 3A4, Lote 61                                                                         |
| Concentración de enzimas       | 50 pmol/ml (0,345 mg de proteína/ml)                                                 |
| Volumen de incubación          | 200 µl                                                                               |
| Tampón                         | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM         |
| Disolvente                     | Sin disolvente                                                                       |
| Sustrato (concentración final) | 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 µM                            |
| Preincubación                  | 3 min a 37 °C                                                                        |
| Inicio de la reacción          | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                               |
| Incubador                      | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                             |
| Tiempo de incubación           | 30 min                                                                               |
| Agente de parada               | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C |
| Precipitación de proteínas     | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                            |
| Número de muestras             | 2 por condición                                                                      |

Cinética enzimática de CYP2C9

|                            |                                                                                      |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| CYP recombinantes          | 2C9, Lote 28                                                                         |
| Concentración de enzimas   | 50 pmol/ml (0,12 mg de proteína/ml)                                                  |
| Volumen de incubación      | 200 µl o más                                                                         |
| Tampón                     | Fosfato 100 mM, pH 7,4, CHAPS al 0,025 % + 10 µl de MgCl <sub>2</sub> 100 mM         |
| Disolvente                 | Sin disolvente                                                                       |
| Sustrato                   | 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 µM                            |
| (concentración final)      |                                                                                      |
| Preincubación              | 3 min a 37 °C                                                                        |
| Inicio de la reacción      | 20 µl de β-NADPH 10 mM                                                               |
| Incubador                  | Termomezclador Eppendorf, 500 rpm, 37 °C                                             |
| Tiempo de incubación       | 60 min                                                                               |
| Agente de parada           | 200 µl de ácido fórmico al 0,5 % enfriado con hielo en acetonitrilo, 30 min a -80 °C |
| Precipitación de proteínas | Centrifugación durante 15 min, 30.000 x g                                            |
| Número de muestras         | 2 por condición                                                                      |

**1.6 Instrumentación y condiciones de HPLC**

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Equipo:                             | Sistema de HPLC Agilent 1100                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sistema de suministro de disolvente | Una bomba binaria (modelo G1312A, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania)                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Automuestreador                     | Modelo G2260A, Agilent Technologies                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Inyección de muestra                | a través de un bucle de muestra de acero inoxidable de 900 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Detector ultravioleta               | Modelo G1365B, Agilent Technologies Longitud de onda fija de 265 nm con una celda de flujo convencional (modelo G1315-60012, volumen de 13 µl, paso óptico de 10 mm, 12 MPa (120 bar)).                                                                                                                                                                            |
| Software                            | Agilent ChemStation para LC 3D, Revisión A.09.01 Control de radiactividad: Radiostar, (Berthold, Wildbad, Alemania), Versión 3.0                                                                                                                                                                                                                                   |
| Control de radiactividad            | La radiactividad en línea se controló usando un detector de radiactividad por HPLC (modelo LB 506 C-1, Berthold Technologies GmbH, Regensburg, Suiza), con una celda de centelleador líquido Z 500-4 de 0,5 ml. Los efluentes de HPLC se mezclaron con Rialuma® (Lumac, Groningen, Países Bajos), bombeado a un caudal de 3 ml/min (bomba Berthold modelo LB 5035) |
| Condiciones de cromatografía:       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Columna                             | Nucleosil 100 C18 Nautilus, 250 x 4 mm D.I., 5 µm (Macherey-Nagel, N.º de pedido 721130.40, Duren, Alemania)                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Precolumna                          | Nucleosil 100 C18 Nautilus, 8 x 4 mm D.I., 5 µm (N.º de pedido 721140.40)                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Temperatura de la columna           | 40 °C (horno de columna Agilent G1316A)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Caudal                              | 1 ml/min (flujo de disolvente total A + B)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Disolventes                         | A: Ácido fórmico al 0,5 % + Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                                     | B: Ácido fórmico al 0,5 % + Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Gradiente de HPLC:

| Gradiente de HPLC (rampas lineales) |        |
|-------------------------------------|--------|
| Tiempo (min)                        | % de B |
| 0                                   | 40     |
| 3                                   | 40     |
| 5                                   | 45     |
| 20                                  | 55     |
| 22                                  | 100    |
| 30                                  | 100    |
| 30,5                                | 40     |
| 36                                  | 40     |

5 1.7 Análisis de la cinética enzimática

Los parámetros de cinética enzimática  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  de la biotransformación por MHH y las principales enzimas metabolizadoras se calcularon usando el software SigmaPlot Versión 8.0 (S1), módulo Enzyme Kinetics Versión 1.1 (SPSS Science Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El aclaramiento intrínseco se calculó mediante la ecuación:  $CL_{\text{int}} = V_{\text{máx}}/K_m$ .

10

Las concentraciones medias de enzimas CYP específicas en microsomas hepáticos humanos se obtuvieron a partir de valores bibliográficos (Rowland Yeo K, Rostami-Hodjegan A y Trucker GT (2004)) *Abundance of cytochromes P450 in human liver: a meta-analysis. Br. J. Clinical Pharmacology*; 57:687-688). Para algunos CYP humanos recombinantes, los parámetros cinéticos enzimáticos se estimaron mediante cálculo asumiendo un comportamiento de tipo Michaelis-Menten para las dos concentraciones utilizadas, resolviendo un sistema de ecuaciones lineales para 2 ecuaciones lineales con 2 variables:

15

$$V_1 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S_1]}{K_m + [S_1]}, \quad V_2 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S_2]}{K_m + [S_2]}$$

20

2. Resultados2.1 Evaluación de las condiciones de incubación

En un conjunto inicial de experimentos, se evaluó el intervalo lineal de la biotransformación *in vitro* de BAF312 con respecto al tiempo de incubación. Se realizaron incubaciones de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 1 y 10  $\mu\text{M}$  con una concentración de proteínas de 0,3 mg/ml de microsomas hepáticos humanos de 0 a 180 min y la desaparición del compuesto precursor en el sobrenadante se determinó mediante HPLC con radiodetección. Como se muestra en las Figuras 1-1, el metabolismo total de BAF312 en microsomas hepáticos humanos aumentó de forma lineal hasta 90 min de tiempo de incubación (sustrato 10  $\mu\text{M}$ ) y 180 min de tiempo de incubación (sustrato 1  $\mu\text{M}$ ). Una segunda serie de incubaciones a un tiempo de incubación fijo (60 min) usando [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 10  $\mu\text{M}$  y concentraciones de proteínas microsómicas diferentes (0-1,3 mg/ml) dio como resultado un aumento lineal, dependiente de la concentración de enzimas, de la biotransformación de hasta aproximadamente 0,1 mg/ml (Figura 1-2). En consecuencia, la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 se investigó en incubaciones realizadas en condiciones lineales con respecto al tiempo (90 min) y el contenido de proteínas (0,1 mg/ml).

25

30

35

2.2 Biotransformación dependiente de la concentración de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en microsomas hepáticos humanos

Después de establecer las condiciones de reacción lineales, se determinaron los parámetros de cinética enzimática  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$  incubando microsomas hepáticos humanos combinados (0,1 mg/ml) con 15 concentraciones de sustrato que variaban de 1 a 300  $\mu\text{M}$  durante 90 min. (Tabla 1-1). Los datos experimentales (tasas de formación de metabolitos totales) se analizaron mediante análisis de regresión no lineal considerando diferentes modelos cinéticos (Michaelis-Menten, Hill, isoenzima, activación aleatoria por sustrato, inhibición por sustrato) proporcionados por el módulo Enzyme Kinetics, SigmaPlot (S1). Representando los datos experimentales en forma de gráfico de Michaelis-Menten y Eadie-Hofstee ( $V$  frente a  $V/S$ ) (véase la Figura 1-3), los datos cinéticos se ajustaron con el modelo cinético de inhibición por sustrato (no competitivo). A partir de la ecuación de este modelo, se calcularon las constantes cinéticas aparentes del metabolismo total  $K_m$  de  $50,3 \pm 9,7 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}}$  de  $191 \pm 25 \text{ pmol/min/mg}$ . El aclaramiento intrínseco derivado ( $V_{\text{máx}}/K_m$ ) del metabolismo hepático de BAF312 fue de  $3,8 \mu\text{l/mg/min}$ .

40

45

### 2.3 Biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 por isoenzimas de CYP humanos recombinantes

Se usaron microsomas preparados a partir de células de insectos infectadas con baculovirus (BTI-TN-5B1-4) que expresaban una única isoenzima del citocromo P450 humano para evaluar la implicación de enzimas específicas en la biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312. Se realizaron experimentos de incubación con un panel de 21 CYP humanos recombinantes (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9\*1, 2C18, 2C19, 2D6\*1, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 3A7, 4A11, 4F2, 4F3A, 4F3B, 4F12 y CYP19) en condiciones similares para cada isoenzima con incubación de BAF312 10 y 40 µM y 30 pmol de CYP/ml durante 30 min. En ambas concentraciones (Tabla 1-2, Figura 1-4), CYP2C9\*1 mostró un recambio significativo en las condiciones experimentales utilizadas. También se observaron actividades metabólicas menores en la incubación con CYP3A4, mientras que se detectaron algunas trazas de metabolismo con otras isoenzimas de CYP (2B6, 2C8, 2C19, 2J2, 3A5, 1A1).

Se encontró que CYP2C9 es la isoenzima de P450 más eficiente para el metabolismo de BAF312.

CYP2C9 está sujeta a un polimorfismo genético significativo (CYP2C9\*1, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3) que varía en gran medida entre diferentes poblaciones étnicas. El sulfafenazol es un inhibidor potente de CYP2C9, tanto *in vitro* como *in vivo*.

CYP3A4 y CYP3A5 recombinantes fueron capaces de metabolizar BAF312 con actividad baja.

Los parámetros cinéticos enzimáticos de las isoenzimas CYP2C9 y CYP3A4 para el metabolismo de BAF312 se determinaron incubando concentraciones diferentes de [<sup>14</sup>C]BAF312 con la isoenzima. El perfil cinético con CYP2C9 y 3A4 se muestra en la Figura 1-5 y la Figura 1-6. Se determinaron las constantes cinéticas para ambos CYP3A4 (Km: 85,1 ± 8,6 µM; Vmáx: 706 ± 31 pmol/min/nmol) y CYP2C9 (Km: 34,5 ± 5 µM; Vmáx: 2596 ± 233 pmol/min/nmol). Los aclaramientos intrínsecos derivados (Vmáx/Km) de la formación de metabolitos totales de BAF312 son 8,3 µl/nmol/min y 75,2 µl/nmol/min para CYP3A4 y 2C9, respectivamente.

Para otros CYP que metabolizan BAF312, las constantes cinéticas Km y Vmáx se estimaron resolviendo 2 ecuaciones lineales con 2 variables (Sección 1.7), lo que permitió estimar la eficiencia enzimática o "aclaramiento intrínseco" CLint para las diversas enzimas.

Con respecto a su importancia en el aclaramiento metabólico hepático de BAF312, se calculó aclaramiento intrínseco CLint con respecto a su abundancia en microsomas hepáticos humanos (Rowland Yeo, *et al.* 2004) (Tabla 1-3). CYP2C9 contribuyó predominantemente (79,2 %) al aclaramiento intrínseco total en los microsomas hepáticos humanos. CYP3A (incluidos 3A4 y 3A5) contribuye con el 18,5 %. Las contribuciones de otras enzimas metabolizadoras de fármacos conocidas (CYP2B6, 2C8, 2C19) fueron bajas.

### 2.4 Inhibición de la biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 por inhibidores químicos

Se realizaron experimentos *in vitro* usando inhibidores químicos selectivos (Newton, *et al.*, 1995; Tucker, *et al.*, 2001) para atenuar el metabolismo microsómico de BAF312 por enzimas CYP específicas en microsomas hepáticos humanos (Tabla 1-4). La biotransformación de BAF312 se sometió a ensayo a una concentración de sustrato 5 µM en presencia de los 8 inhibidores químicos individuales. Con ketoconazol 1 µM, las tasas de metabolismo de BAF312 se inhibieron en un 25 %. Se observó una inhibición fuerte significativa con sulfafenazol 2 µM y 10 µM (65-77 %), que es un inhibidor específico de CYP2C9. La quercetina presentó una inhibición ligera (11-31 %). La tranilcipromina también mostró una inhibición ligera (1-29 %). Otros inhibidores químicos sometidos a ensayo no inhibieron sustancialmente el metabolismo de BAF312 (Tabla 1-4).

### 2.5 Análisis de sensibilidad *in vitro* de genotipos de CYP2C9 diferentes

CYP2C9 es una isoenzima polimórfica con capacidad metabólica variable en diferentes sujetos. Puesto que la biotransformación de BAF312 en sus metabolitos hidroxilados fue catalizada principalmente por esta isoenzima, se puede anticipar un efecto significativo del polimorfismo genético de esta isoenzima en el metabolismo. Para investigar adicionalmente este problema, se realizó un análisis de sensibilidad *in vitro*. El metabolismo de [<sup>14</sup>C]BAF312 se estudió en microsomas hepáticos de donantes individuales con genotipos especiales (Tabla 1-5) para esta enzima. La Figura 1-8 muestra la comparación de las tasas de biotransformación de los donantes CYP2C9\*1/\*1, 2C9\*2/\*2 y 2C9\*3/\*3. En comparación con CYP2C9\*1/\*1 (tipo silvestre), las tasas de metabolismo de BAF312 en MHH de donantes CYP2C9\*2/\*2 y 2C9\*3/\*3 fueron sustancialmente más bajas. En los microsomas hepáticos humanos, fue evidente una disminución significativa de 10 veces en la tasa de formación de metabolitos hidroxilados en las muestras de CYP2C9\*3/\*3 en comparación con las muestras de CYP2C9\*1/\*1. También hubo una reducción marcada (de hasta el 65 %) de la formación de metabolitos hidroxilados en la muestra de hígado con genotipo CYP2C9\*2/\*2. Estos resultados confirman el potencial de polimorfismo genético en el metabolismo oxidativo de este compuesto.



El fenotipado de la enzima CYP se realiza tradicionalmente mediante tres enfoques básicos (inhibidores químicos específicos o anticuerpos inhibidores, citocromos P450 recombinantes y análisis de correlación) documentados en la bibliografía científica y reconocidos por la FDA (Bjornsson *et al.*, 2003; Ogilvie *et al.*, 2008). Cada uno de estos enfoques tiene sus ventajas, pero también sus inconvenientes, por lo que se recomienda encarecidamente una combinación de enfoques (se deben usar al menos dos, a condición de que los resultados de ambos métodos sean similares). Para BAF312, se investigó la biotransformación *in vitro* en microsomas hepáticos de donantes individuales con genotipos especiales de CYP2C9. Se demostró un efecto significativo del polimorfismo genético de CYP2C9. Los resultados de estos métodos adicionales estaban en línea con los datos de dos enfoques (inhibición química y cinética de enzimas recombinantes) descritos y, por lo tanto, proporcionaron más respaldo y confianza adicional a la conclusión del fenotipado de enzimas contra BAF312. La aplicación del análisis de sensibilidad del genotipo usando microsomas individuales de donantes genotipados proporciona un enfoque adicional como método alternativo para el fenotipado por reacción de xenobióticos, particularmente cuando su metabolismo es catalizado predominantemente por una enzima polimórfica genética.

En conjunto, todos los datos *in vitro* obtenidos a partir de tres enfoques de fenotipado independientes concluyen que CYP2C9 contribuye predominantemente a la biotransformación microsómica en hígado humano de [<sup>14</sup>C]BAF312 con contribución parcial de CYP3A. Otras enzimas CYP también pueden contribuir en menor medida.

#### Referencias a la bibliografía publicada

Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J y Wrighton SA (2003) *The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. Drug Metab Dispos* 31:815-832.

[Guengerich FP (1996)] *In vitro techniques for studying drug metabolism. Journal of Pharmacokinetics & Biopharmaceutics*, 24:521-533.

[Newton DJ, Wang R W, Lu AYH (1995)] *Cytochrome P450 inhibitors: Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. Drug Metabolism and disposition*; 25:154-158.

Ogilvie BW, Usuki E, Yerino P y Parkinson A (2008) *In vitro approaches for studying the inhibition of drug-metabolizing enzymes and identifying the drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs (Reaction phenotyping) with emphasis on cytochrome P450*, en: *Drug-drug Interactions* (Rodrigues AD ed), págs. 231-358, Informa Healthcare, Nueva York.

[Rettie AE y Jones JP GT (2005)] *Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. Annu. Rev. Pharmacol*; 45:477-494.

[Rowland Yeo K, Rostami-Hodjegan A y Trucker GT (2004)] *Abundance of cytochromes P450 in human liver: a meta-analysis. Br. J. Clinical Pharmacology*; 57:687-688.

[Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, *et al.* (1994)] *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. JPET*; 270: 414-423.

[Tucker GT, Houston JB, Huang SM (2001)] *Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-towards a consensus. Br J Clin Pharmacol*; 52:107-17.

#### Referencias a software informático

Módulo de cinética enzimática S1, Versión 1.1 para SigmaPlot 2002, Versión 8.0, SPSS Science Inc., Chicago, IL, EE.UU.

S2 Simcyp Versión 4.10.02, Simcyp Ltd., Sheffield, Reino Unido.

Tablas**Tabla 1.1 Biotransformación dependiente de la concentración de [<sup>14</sup>C]BAF312**

La biotransformación dependiente de la concentración de [<sup>14</sup>C]BAF312 por MHH (0,1 mg de proteína/ml) se investigó después de incubaciones de 90 min. La formación de metabolitos (M5, M6, M7) en el sobrenadante se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección. Se proporcionaron los valores medios de 2 incubaciones.

| Concentración media de [ <sup>14</sup> C]BAF312 [μM] | Velocidad de formación de metabolitos totales [pmol/min/mg de proteína] |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Concentración [μM]                                   |                                                                         |
| 0,97                                                 | 4,2                                                                     |
| 2,88                                                 | 11,3                                                                    |
| 4,81                                                 | 18,6                                                                    |
| 9,64                                                 | 31,9                                                                    |
| 14,49                                                | 42,0                                                                    |
| 19,36                                                | 46,0                                                                    |
| 29,04                                                | 60,2                                                                    |
| 38,73                                                | 66,9                                                                    |
| 58,29                                                | 68,7                                                                    |
| 77,67                                                | 73,3                                                                    |
| 97,04                                                | 67,2                                                                    |
| 145,58                                               | 57,5                                                                    |
| 194,06                                               | 51,1                                                                    |
| 242,39                                               | 37,5                                                                    |
| 290,94                                               | 35,0                                                                    |

**Tabla 1.2 Formación de metabolitos por isoenzimas P450 recombinantes**

La biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 (10 μM y 40 μM) por microsomas recombinantes que expresan una única isoenzima del citocromo P450 humano (30 pmol/ml) y por MHH (108 pmol/ml) se investigó después de 30 minutos de incubación. La formación de metabolitos se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

| Enzima              | N.º de Cat. de Gentest | N.º de Lote. | Tasa de metabolismo (pmol/min/nmol de CYP 450) |              |
|---------------------|------------------------|--------------|------------------------------------------------|--------------|
|                     |                        |              | BAF312 10 μM                                   | BAF312 40 μM |
| Combinación de MHH  | 456201                 | 26           | 5,9                                            | 25,3         |
| Control de insectos | 452161                 | 52           | nd                                             | nd           |
| CYP1A1              | 456211                 | 15           | 13,3                                           | 28,9         |
| CYP 1A2             | 456203                 | 27           | nd                                             | nd           |
| CYP 1 B1            | 456220                 | 4            | nd                                             | nd           |
| CYP 2A6             | 456204                 | 14           | nd                                             | nd           |
| CYP 2B6             | 456210                 | 7            | 17,8                                           | 44,4         |
| CYP2C8              | 456252                 | 16           | 11,1                                           | 13,3         |
| CYP2C9              | 456258                 | 28           | 129,4                                          | 211,1        |
| CYP2C18             | 456222                 | 12           | nd                                             | nd           |
| CYP2C19             | 456259                 | 18           | 6,7                                            | 22,2         |
| CYP 2D6*1           | 456217                 | 15705        | nd                                             | nd           |
| CYP2E1              | 456206                 | 12           | nd                                             | nd           |
| CYP 2J2             | 456264                 | 1            | 2,8                                            | 8,9          |
| CYP 3A4             | 456202                 | 61           | 23,3                                           | 53,3         |
| CYP 3A5             | 456235                 | 16           | 3,9                                            | 2,2          |

La biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (10  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ ) por microsomas recombinantes que expresan una única isoenzima del citocromo P450 humano (30 pmol/ml) y por MHH (108 pmol/ml) se investigó después de 30 minutos de incubación. La formación de metabolitos se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

| Enzima                   | N.º de Cat. de Gentest | N.º de Lote. | Tasa de metabolismo (pmol/min/nmol de CYP 450) |                         |
|--------------------------|------------------------|--------------|------------------------------------------------|-------------------------|
|                          |                        |              | BAF312 10 $\mu\text{M}$                        | BAF312 40 $\mu\text{M}$ |
| CYP 3A7                  | 456237                 | 7            | nd                                             | nd                      |
| CYP 4A11                 | 456221                 | 8            | nd                                             | nd                      |
| CYP 4F2                  | 456272                 | 2            | nd                                             | nd                      |
| CYP 4F3A                 | 456273                 | 3            | nd                                             | nd                      |
| CYP 4F3B                 | 456274                 | 3            | nd                                             | nd                      |
| CYP 4F12                 | 456275                 | 1            | nd                                             | nd                      |
| CYP 19                   | 456260                 | 2            | nd                                             | nd                      |
| <b>nd: no detectable</b> |                        |              |                                                |                         |

*Tabla 1-3 Constantes cinéticas enzimáticas y contribución estimada de varios CYP al aclaramiento metabólico de BAF312 en microsomas hepáticos humanos*

| Enzima               | $K_m$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $V_{m\acute{a}x}$<br>(pmol/(min·nmol de CYP)) | CL<br>( $V_{m\acute{a}x}/K_m$ ) $\mu\text{l}/(\text{min}\cdot\text{nmol}$<br>de CYP) | abundancia <sup>A</sup><br>(pmol de<br>P450/mg) | Cono<br>Específico.<br>(% de CYP<br>total) | CL<br>Rel. $\mu\text{l}/(\text{min}\cdot\text{nmol}$<br>de CYP total) | Contribución<br>(% de CL Rel.<br>total) |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| CYP 1A1              | 25,5                       | 47,3                                          | 1,9                                                                                  |                                                 |                                            |                                                                       |                                         |
| CYP 1A2              |                            |                                               |                                                                                      | 52                                              | 9,47%                                      |                                                                       |                                         |
| CYP 1B1              |                            |                                               |                                                                                      |                                                 |                                            |                                                                       |                                         |
| CYP 2A6              |                            |                                               |                                                                                      | 36                                              | 6,56%                                      |                                                                       |                                         |
| CYP 2B6              | 40,0                       | 88,9                                          | 2,2                                                                                  | 11                                              | 2,00%                                      | 0,04                                                                  | 0,4%                                    |
| CYP 2C8              | 2,9                        | 14,3                                          | 5                                                                                    | 24                                              | 4,37                                       | 0,22                                                                  | 1,7%                                    |
| CYP 2C9              | 34,5                       | 2596                                          | 75,2                                                                                 | 73                                              | 13,30%                                     | 10,01                                                                 | 79,2%                                   |
| CYP 2C18             |                            |                                               |                                                                                      |                                                 | 0,20%                                      |                                                                       |                                         |
| CYP 2C19             | 140                        | 100                                           | 0,7                                                                                  | 14                                              | 2,55%                                      | 0,02                                                                  | 0,1                                     |
| CYP 2D6              |                            |                                               |                                                                                      | 8                                               | 1,46%                                      |                                                                       |                                         |
| CYP 2E1              |                            |                                               |                                                                                      | 61                                              | 11,11%                                     |                                                                       |                                         |
| CYP 2J2              | 374                        | 106,7                                         | 0,3                                                                                  |                                                 |                                            |                                                                       |                                         |
| CYP 3A4 <sup>B</sup> | 85,1                       | 706                                           | 8,3                                                                                  | 155                                             | 28,23%                                     | 2,34                                                                  | 18,5%                                   |
| CYP 3A5              |                            |                                               |                                                                                      |                                                 |                                            |                                                                       |                                         |

| Enzima      | $K_m$<br>( $\mu M$ ) | $V_{m\acute{a}x}$<br>(pmol/(min·nmol<br>de CYP)) | CL<br>( $V_{m\acute{a}x}/K_m$ ) $\mu l/(min·nmol$<br>de CYP) | abundancia <sup>A</sup><br>(pmol de<br>P450/mg) | Cono<br>Específico.<br>(% de CYP<br>total) | CL<br>Rel. $\mu l/(min·nmol$<br>de CYP total) | Contribución<br>(% de CL Rel.<br>total) |
|-------------|----------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| CYP<br>3A7  |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| CYP<br>4A11 |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| CYP<br>4F2  |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| CYP<br>4F3A |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| CYP<br>4F3B |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| CYP<br>4F12 |                      |                                                  |                                                              |                                                 |                                            |                                               |                                         |
| Total       |                      |                                                  |                                                              | 434                                             | 79%                                        | 12,63                                         | 100%                                    |

Nota al pie de la Tabla 1-3: Los parámetros cinéticos enzimáticos  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  de CYP3A4 y CYP2C9 se obtuvieron a partir de experimentos cinéticos. Los valores de otras isoenzimas se estimaron resolviendo la ecuación de Michaelis-Menten  $V=V_{m\acute{a}x} \cdot S/(K_m+S)$  para las 2 concentraciones de sustrato y sus números de tasa. A: los valores de abundancia de CYP fueron de Rowland Yeo *et al.* (2004) y el software Simcyp; B: para CYP3A4, se usó el valor de abundancia de CYP3A.

**Tabla 1-4 Inhibición del metabolismo por inhibidores específicos de isoenzimas de CYP450 en microsomas hepáticos humanos**

La biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 en microsomas hepáticos humanos (0,1 mg/ml) se investigó en ausencia y presencia de inhibidor específico. La formación de metabolitos se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

| Inhibidor                                               | BAF312 5 $\mu M$   |                        |
|---------------------------------------------------------|--------------------|------------------------|
|                                                         | Tasa (pmol/min/mg) | Actividad relativa (%) |
| Sin inhibidor (A)                                       | 17,3               | 100                    |
| Sin inhibidor (B)                                       | 17,7               | 100                    |
| Furafilina 2 $\mu M$ (CYP1A2)                           | 16,7               | 95                     |
| Furafilina 10 $\mu M$ (CYP1A2)                          | 16,1               | 91                     |
| Trietilfosforamida 5 $\mu M$ (CYP2B6)                   | 18,3               | 106                    |
| Trietilfosforamida 20 $\mu M$ (CYP2B6)                  | 18,8               | 109                    |
| Quercetina 2 $\mu M$ (CYP2C8)                           | 15,3               | 89                     |
| Quercetina 10 $\mu M$ (CYP2C8)                          | 11,9               | 69                     |
| Sulfafenazol 2 $\mu M$ (CYP2C9)                         | 6,1                | 35                     |
| Sulfafenazol 10 $\mu M$ (CYP2C9)                        | 3,9                | 23                     |
| Tranilcipromina 2 $\mu M$ (CYP2C19)                     | 15,3               | 89                     |
| Tranilcipromina 10 $\mu M$ (CYP2C19)                    | 12,2               | 71                     |
| Quinidina 0,1 $\mu M$ (CYP2D6)                          | 15,6               | 90                     |
| Quinidina 1 $\mu M$ (CYP2D6)                            | 16,4               | 95                     |
| DETC 5 $\mu M$ (CYP2E1)                                 | 15,8               | 89                     |
| DETC 30 $\mu M$ (CYP2E1)                                | 13,6               | 77                     |
| Ketoconazol 0,1 $\mu M$ (CYP3A4)                        | 16,2               | 94                     |
| Ketoconazol 1 $\mu M$ (CYP3A4)                          | 13,0               | 75                     |
| A: blanco normal; B: Blanco con 15 min de preincubación |                    |                        |

Tabla 1-5 Comparación de genotipos de CYP2C9 de tasas de metabolismo de [<sup>14</sup>C]BAF312 de MHH de donantes individuales

| Donantes individuales (obtenidos en BD Bioscience) |               |             |             | Actividad catalítica (proporcionada por el fabricante)           |                                                                    | Tasa de formación de metabolitos |
|----------------------------------------------------|---------------|-------------|-------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Genotipo de CYP2C9                                 | N.º de pedido | N.º de lote | Designación | CYP2C9 (4'-hidroxilación de diclofenaco) pmol/min/mg de proteína | CYP 3A4 (6β-hidroxilación de testosterona) pmol/min/mg de proteína | pmol/min/mg de proteína          |
| CYP2C9*1/*1                                        | 452006        | 2           | HG 6        | 2700                                                             | 3000                                                               | 30,4                             |
| CYP2C9*2/*2                                        | 452103        | 1           | HG 103      | 2200                                                             | 2800                                                               | 10,5                             |
| CYP2C9*3/*3                                        | 452027        | 1           | HK 27       | 480                                                              | 4900                                                               | 2,7                              |

5 Ejemplo 2 - Efecto *in vivo* de genotipo CYP2C9\*3\*3 sobre la metabolización del ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico

10 Como parte de un ensayo más amplio, a dos pacientes con genotipo CYP2C9\*3\*3 (metabolizador lento) se les administró ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico y los niveles de fármaco resultantes en las muestras de plasma sanguíneo del paciente medidos y comparados con los de los pacientes CYP2C9\*1\*1 (metabolizador normal).

15 Se encontró que los dos pacientes CYP2C9\*3\*3 experimentaron una exposición al fármaco aproximadamente 4 veces mayor que la de los pacientes CYP2C9\*1\*1. Estos datos preliminares *in vivo* confirmaron simulaciones previas de Simcyp, que predijeron una relación de ABC media de 4,1 veces en los grupos de 45 poblaciones virtuales de Simcyp basándose en los resultados *in vitro* descritos en el Ejemplo 1 (sección 2.5).

Se podría realizar una investigación adicional, por ejemplo, como se describe en el plan de estudio a continuación.

20 Plan de estudio

Puede usarse un estudio abierto multicéntrico en voluntarios sanos con genotipos de CYP2C9 diferentes para evaluar el efecto del subtipo de CYP2C9 sobre el metabolismo del ácido 1-{4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil}-azetidina-3-carboxílico.

25 El estudio se puede dividir en dos partes: Parte 1 y Parte 2.

30 Todos los sujetos completarán la Parte 1, se someterán a un período de reposo farmacológico de seis semanas (42 días) antes de la visita de final del estudio para los sujetos que portan el genotipo CYP2C9 \*1/\*1 (EM) mientras que se espera que los sujetos con genotipos \*2/\*3 y \*3/\*3 (PM) continúen en la Parte 2. Los sujetos de reemplazo para la Parte 2 no necesitan someterse a la Parte 1 antes de ingresar al estudio.

Durante la Parte 1, un total de hasta 36 sujetos recibirán el fármaco de estudio:

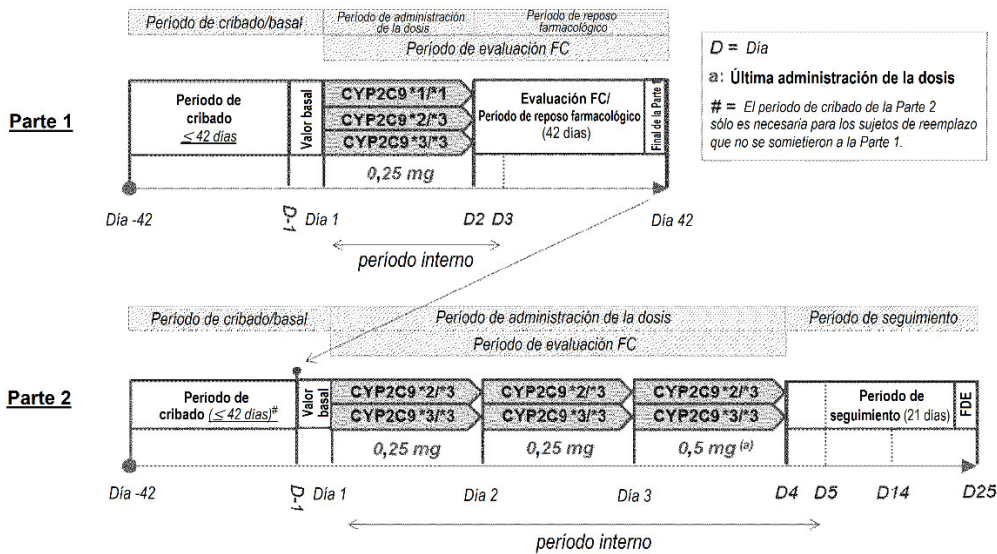
- 35
- de 6 a 18 sujetos CYP2C9 \*1/\*1,
  - de 6 a 9 sujetos CYP2C9 \*2/\*3,
  - de 6 a 9 sujetos CYP2C9 \*3/\*3.

40 Los sujetos CYP2C9 \*1\*1 se emparejaron por peso corporal (+/- 10 %) con los sujetos CYP2C9\*2/\*3 y \*3/\*3. Durante la Parte 2, un total de hasta 18 sujetos con fenotipo CYP2C9 PM recibirán el fármaco de estudio:

- 45
- de 6 a 9 sujetos CYP2C9 \*2/\*3,
  - de 6 a 9 sujetos CYP2C9 \*3/\*3.

50

## Diseño del estudio



### Parte 1:

La Parte 1 de este estudio consistirá un período de cribado de hasta 41 días, un día basal (Día -1), un día de tratamiento (Día 1), seguido de un período de reposo farmacológico de 6 semanas, período de evaluación FC hasta el Día 42 (correspondiente a aproximadamente 6 veces el T1/2 previsto de 170 h en portadores de CYP2C9\*3\*3). Las evaluaciones FC se realizarán en los puntos temporales que se muestran en el Programa de evaluación.

Los sujetos que cumplan con los criterios de elegibilidad en el cribado serán admitidos a las evaluaciones basales. Todos los resultados de la evaluación de seguridad basal deben estar disponibles antes de la administración de la dosis.

Los sujetos serán admitidos en el sitio de estudio en la mañana del día anterior a la administración de la dosis (Día -1) para evaluaciones basales. El primer día de administración de la dosis se producirá el Día 1 cuando se administrará una dosis única de 0,25 mg de siponimod.

Las evaluaciones de finalización de la Parte 1 tendrán lugar después de un período de reposo farmacológico completo (es decir, 6 semanas desde la administración de la dosis).

Las evaluaciones de seguridad incluirán exámenes físicos, signos vitales, evaluaciones de laboratorio clínico convencionales (hematología, incluyendo recuento linfocitario, bioquímica sanguínea y análisis de orina), ECG de 12 derivaciones, vigilancia cardíaca en línea, registro Holter-ECG, vigilancia de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves.

Los sujetos estarán confinados en el sitio de estudio desde la mañana del Día -1 hasta 48 horas después de la administración del fármaco y serán dados de alta del sitio en la mañana del Día 3. Todas las demás visitas del estudio serán visitas ambulatorias.

### Parte 2:

La Parte 2 consistirá en un período de cribado de hasta 41 días, una visita basal (Día -1), un período de tratamiento de 3 días, seguido de un período de seguimiento (21 días) y una visita de Finalización del estudio.

Los sujetos que se someten tanto a la Parte 1 como a la Parte 2 deben someterse a un período de reposo farmacológico de seis semanas antes de continuar en la Parte 2 con la Visita basal (es decir, un mínimo de seis semanas entre la administración del fármaco en la parte 1 y la primera administración del fármaco en la parte 2).

La elegibilidad se evaluará en el cribado y en la primera visita basal para cualquier sujeto del estudio, incluyendo los sujetos de reemplazo.

Todos los resultados de la evaluación de seguridad basal deben estar disponibles antes de la administración de la dosis.

Los sujetos serán admitidos en el sitio de estudio en la mañana del día anterior a la administración de la dosis (Día -1) para evaluaciones basales. El primer día de administración de la dosis se producirá el Día 1 cuando se administrarán 0,25 mg de siponimod. La misma dosis de 0,25 mg se administrará el Día 2, seguida de 0,5 mg el Día 3. Después de la

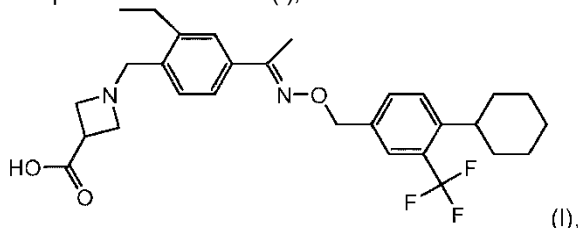
última dosis del Día 3, se realizarán evaluaciones farmacocinéticas hasta 24 horas después de la dosis. Se realizarán evaluaciones de seguridad hasta 48 horas después de la dosis.

- 5 Los sujetos estarán confinados en el sitio de estudio desde la mañana del Día -1 hasta 48 horas después de la última administración del fármaco y serán dados de alta del sitio en la mañana del Día 5. Los sujetos se someterán a la visita de Final del estudio desde el Día 25 hasta el Día 31 (ventana de visita: hasta + 6 días).

- 10 Las evaluaciones de seguridad incluirán exámenes físicos, signos vitales, evaluaciones de laboratorio clínico convencionales (hematología, incluyendo linfocitos, bioquímica sanguínea y análisis de orina), ECG de 12 derivaciones, vigilancia cardíaca en línea, registro Holter-ECG, vigilancia de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves.

## REIVINDICACIONES

1. Siponimod de fórmula (I),



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece esclerosis múltiple, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (i) someter a ensayo si el paciente tiene o no el genotipo metabolizador lento seleccionado de los genotipos CYP2C9\*3\*3 y CYP2C9\*2\*3; y
- 10 (ii) si se ha identificado que el paciente no tiene el genotipo metabolizador lento, administrar siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente a la dosis terapéutica de referencia; o
- (iii) si se ha identificado que el paciente tiene el genotipo metabolizador lento, ya sea
- (a) administrar siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al paciente a una dosis terapéutica inferior a la dosis terapéutica de referencia;
- 15 o
- (b) no administrar siponimod al paciente.

2. Siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genotipo metabolizador lento es el genotipo CYP2C9\*3\*3.

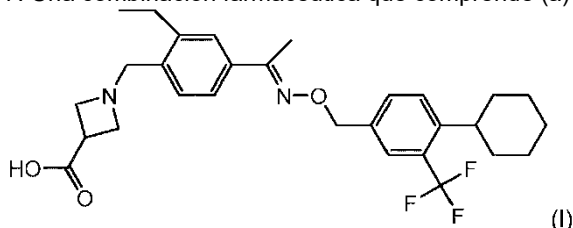
20 3. Siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genotipo metabolizador lento es el genotipo CYP2C9\*2\*3.

4. Siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la esclerosis múltiple es esclerosis múltiple progresiva secundaria con recaídas (EMPSr) o esclerosis múltiple progresiva secundaria sin recaídas (EMPS).

5. Siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la dosificación terapéutica de referencia es una dosificación diaria en el intervalo de 1,5 a 2,5 mg.

6. Siponimod, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde en el caso de un paciente con el tipo metabolizador lento, la dosificación terapéutica diaria está en el intervalo de 0,1 a 1 mg.

35 7. Una combinación farmacéutica que comprende (a) siponimod de fórmula (I),



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) un promotor de la actividad metabólica de CYP2C9 para su uso simultáneo, por separado o secuencial, en donde el promotor de la actividad metabólica de CYP2C9 se selecciona del grupo que consiste en rifampicina y carbamazepina.

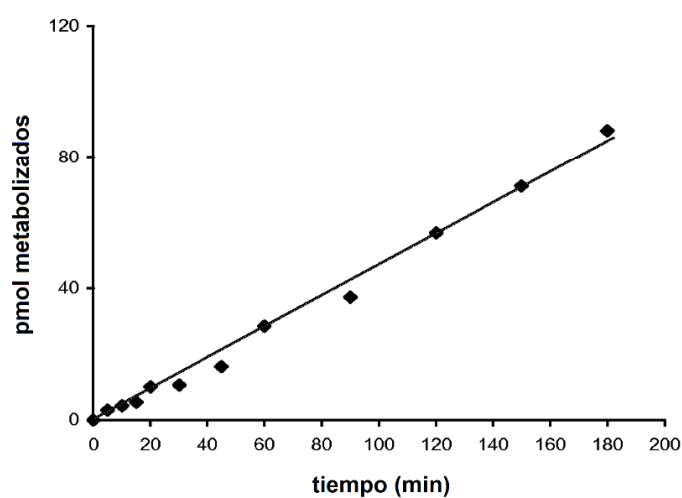
40



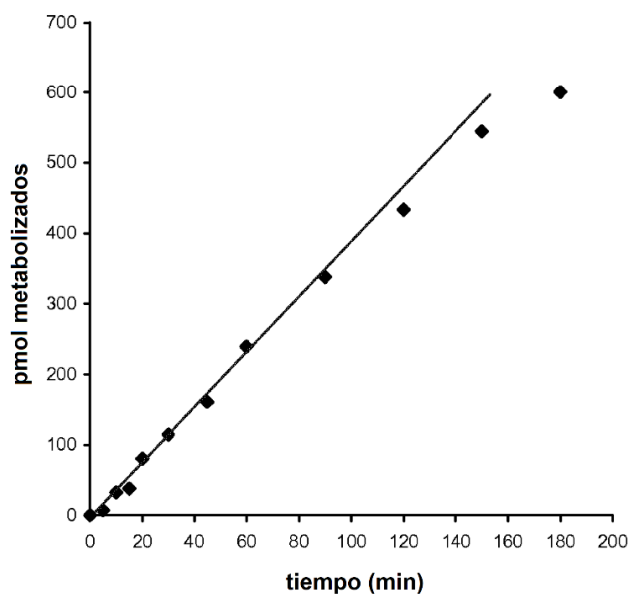
**Figura 1-1 Biotransformación dependiente del tiempo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312**

La cinética de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 1 y 10  $\mu\text{M}$  se investigó usando microsomas hepáticos humanos (0,3 mg de proteína/ml). La desaparición de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.

[ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 1  $\mu\text{M}$

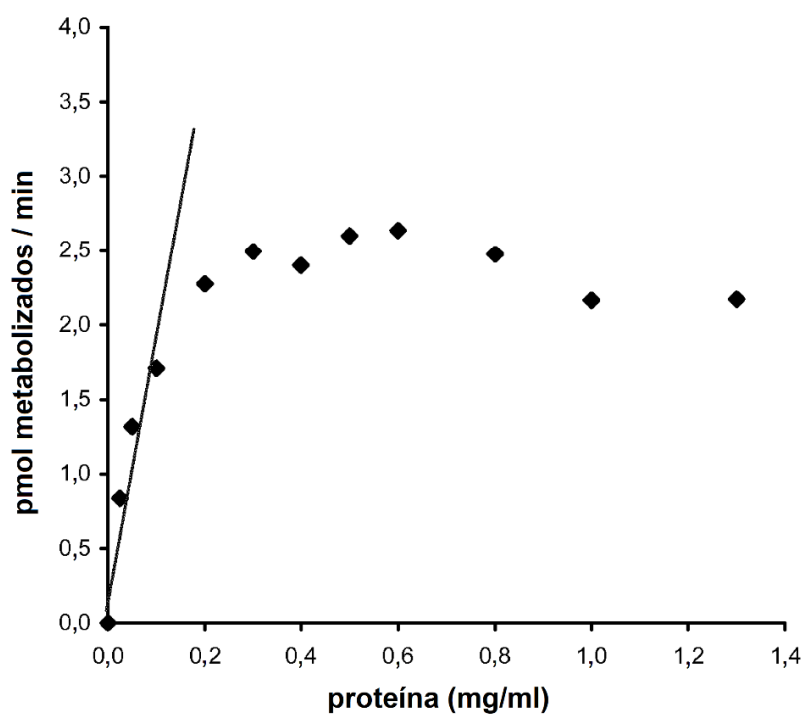


[ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 10  $\mu\text{M}$



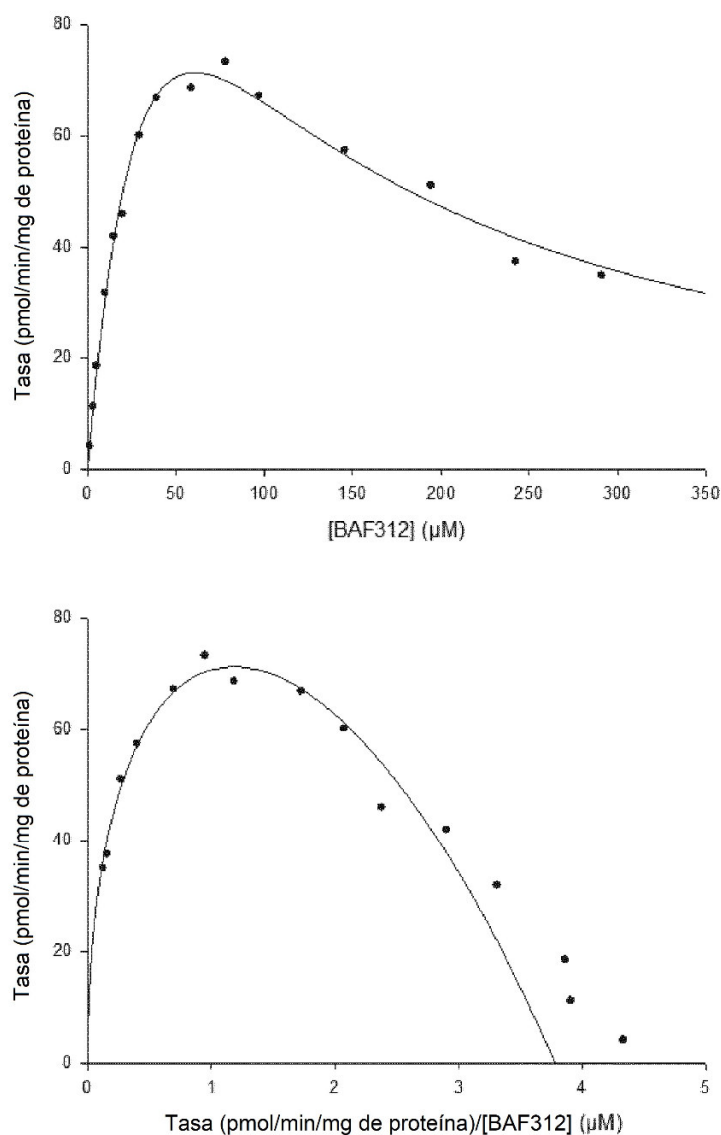
**Figura 1-2 Biotransformación dependiente de proteínas de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312**

La dependencia de proteínas del metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 10  $\mu\text{M}$  se investigó (incubaciones de 60 minutos) usando microsomas hepáticos humanos. La desaparición de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.



**Figura 1-3 Cinética enzimática de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en microsomas hepáticos humanos**

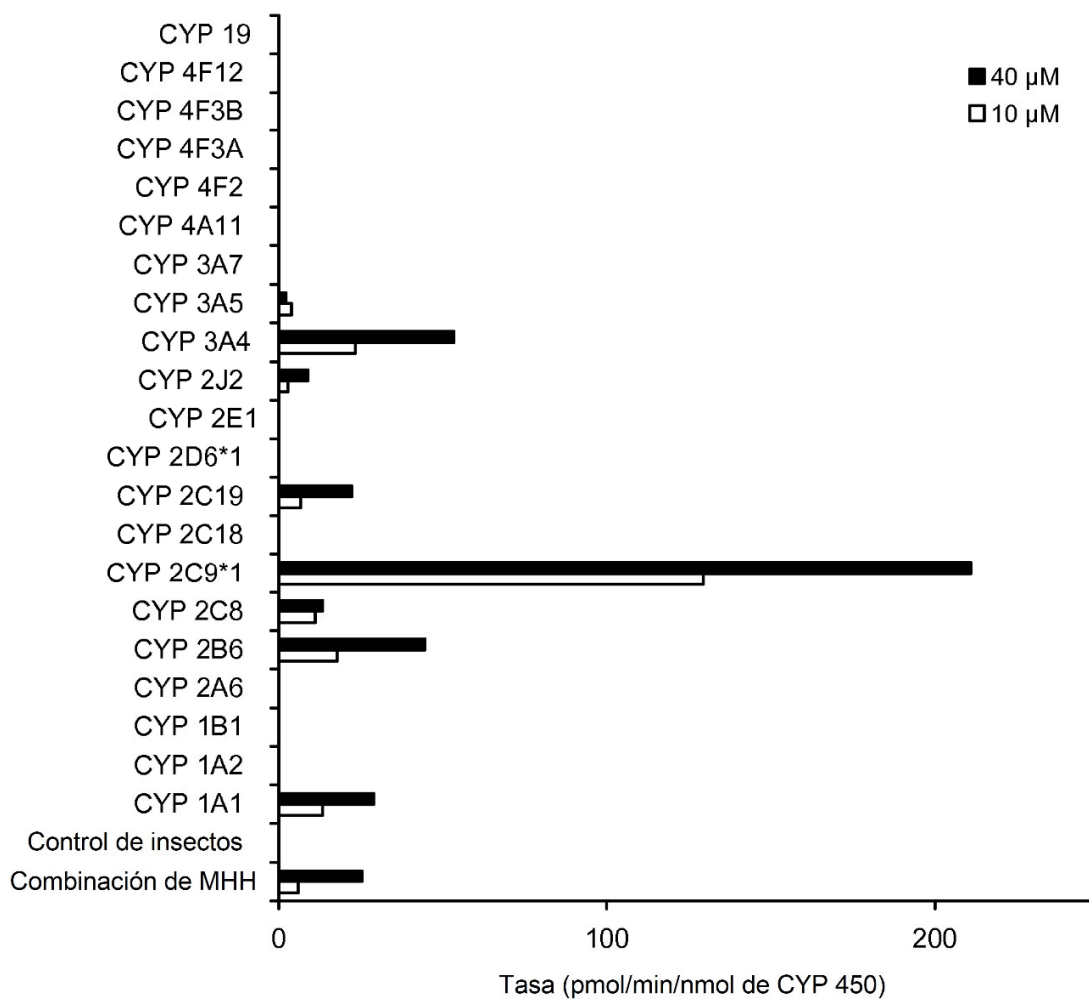
La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 en microsomas hepáticos humanos combinados (0,1 mg/ml) después de 90 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee (parte inferior) ajustados con el modelo de inhibición por sustrato.



| Modelo cinético                             | $V_{\text{máx}}$<br>[pmol/min/mg] | $K_m^{\text{ap}}$<br>[μM] | $V_{\text{máx}}/K_m$<br>μl/mg/min |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Inhibición por sustrato<br>(no competitiva) | $191 \pm 25$                      | $50,3 \pm 9,7$            | 3,8                               |

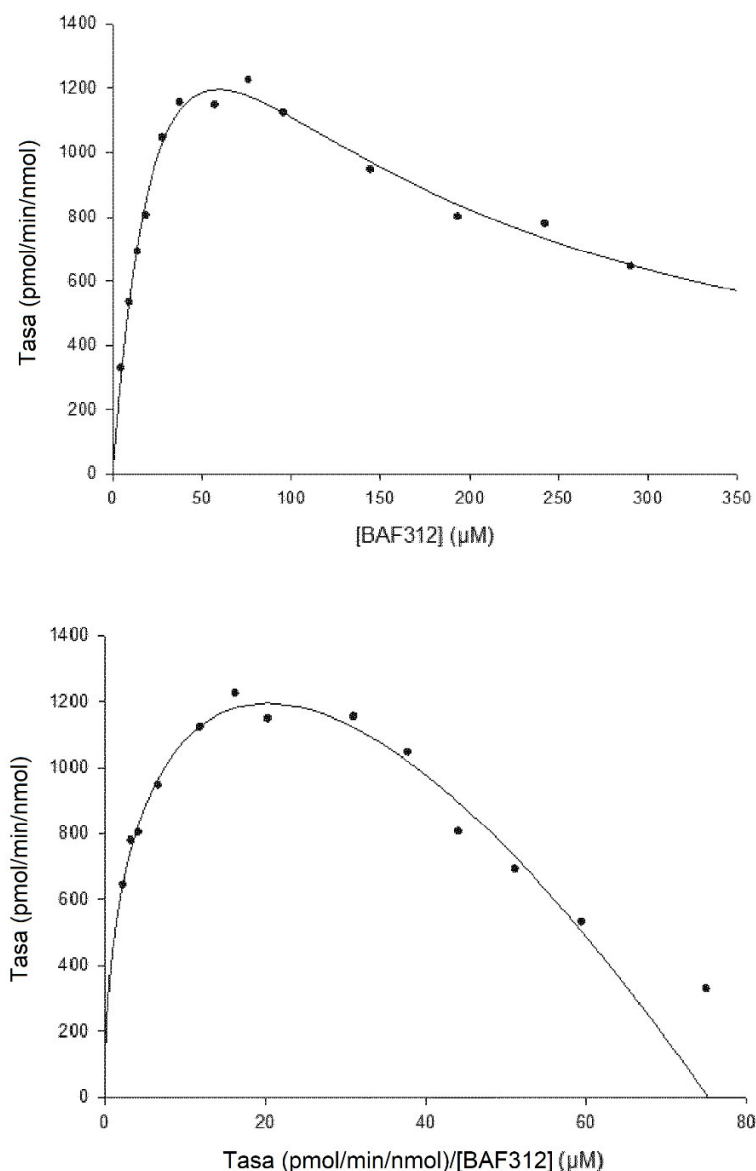
**Figura 1-4 Biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 por CYP P450 humanos recombinantes**

La biotransformación de [<sup>14</sup>C]BAF312 por enzimas recombinantes (30 pmol/ml) en membranas de células de insectos que expresan una única isoenzima del citocromo P450 humano y por MHH (108 pmol de CYP/ml) se investigó después de incubaciones de 30 minutos a 10 y 40 µM. La formación de metabolitos se determinó mediante análisis por HPLC combinado con radiodetección.



**Figura 1-5 Cinética enzimática del metabolismo de [ $^{14}$ C]BAF312 por rhCYP2C9**

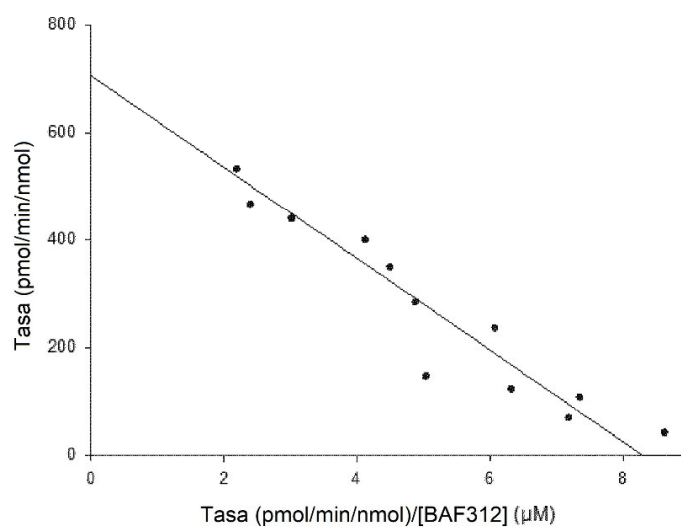
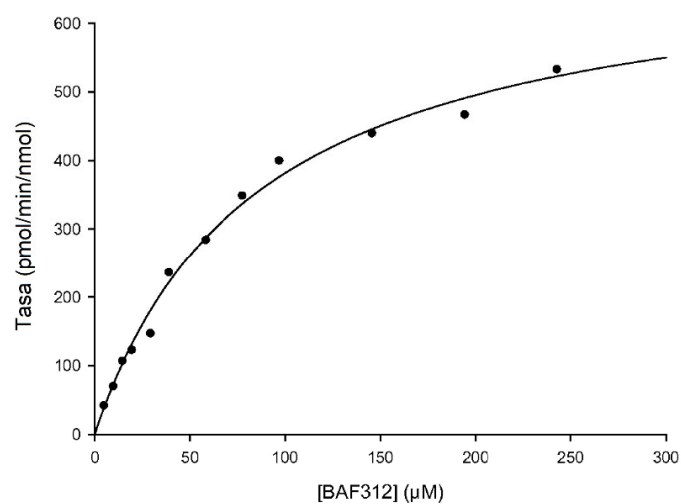
La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}$ C]BAF312 (metabolitos totales) en rhCYP2C9 (50 pmol/ml) después de 60 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee (V frente a V/S, parte inferior) ajustado el modelo de inhibición por sustrato usando concentraciones de sustrato de 5-300  $\mu$ M.



| $V_{\text{máx}}$<br>[pmol/min/nmol] | $K_m^{\text{ap}}$<br>[ $\mu$ M] | $V_{\text{máx}}/K_m$<br>$\mu$ l/nmol/min |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|
| $2596 \pm 233$                      | $34,5 \pm 5,0$                  | 75,2                                     |

**Figura 1-6 Cinética enzimática del metabolismo de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 por rhCYP3A4**

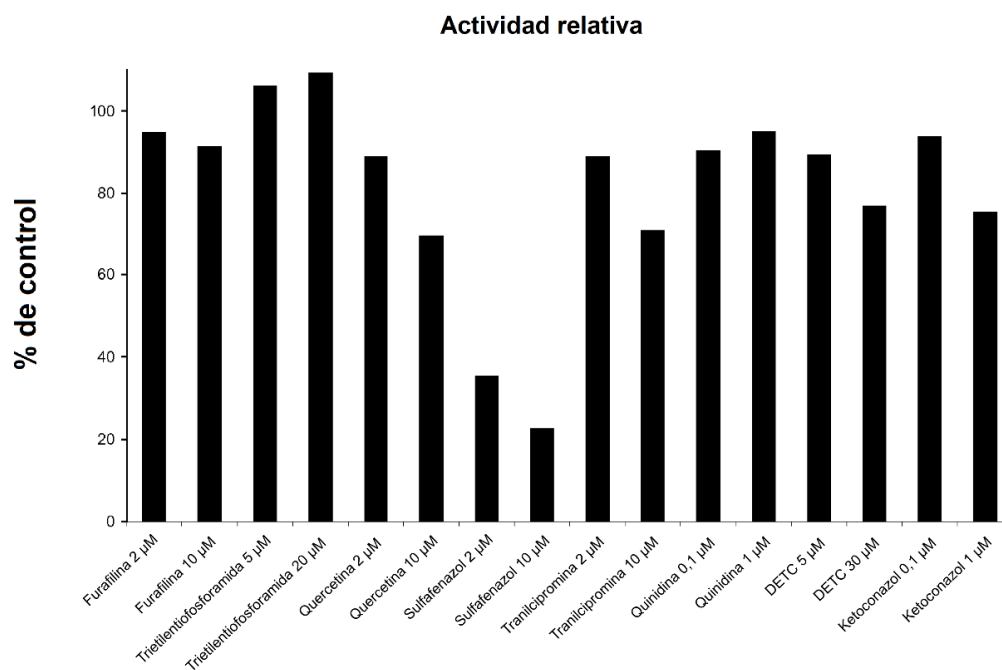
La cinética dependiente de la concentración de la biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (metabolitos totales) en rhCYP3A4 (50 pmol/ml) después de 30 minutos de incubación se representó en forma de gráfico de Michaelis-Menten (parte superior) y en forma de gráfico de Eadie-Hofstee (V frente a V/S, parte inferior) usando concentraciones de sustrato de 5-250  $\mu\text{M}$ .



| $V_{\text{máx}}$<br>[pmol/min/nmol] | $K_m^{\text{ap}}$<br>[ $\mu\text{M}$ ] | $V_{\text{máx}}/K_m$<br>$\mu\text{l/nmol/min}$ |
|-------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|
| $706 \pm 31$                        | $85,1 \pm 8,6$                         | 8,30                                           |

**Figura 1-7 Inhibición del metabolismo de BAF312 en MHH por inhibidores químicos**

La biotransformación de [ $^{14}\text{C}$ ]BAF312 (5  $\mu\text{mol/l}$ ) por microsomas hepáticos humanos (0,1 mg/ml) se investigó en presencia y en ausencia de inhibidores diferentes. Los sobrenadantes de las incubaciones después de 90 minutos se analizaron mediante HPLC con radiodetección.



**Figura 1-8 Comparación de tasas de metabolismo de [<sup>14</sup>C]BAF312 en MHH de donantes individuales con 3 genotipos de CYP2C9 diferentes (Datos de la Tabla 1-5)**

