



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 922**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/404** (2006.01) **A61P 13/10** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01) **A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/10** (2006.01) **A61K 9/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09075067 .0**

96 Fecha de presentación : **01.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **2060259**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54

Título: **Composiciones médicas para el tratamiento intravesical de cáncer de vejiga.**

30

Prioridad: **01.11.2001 US 344446 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.06.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.06.2010**

73

Titular/es: **Spectrum Pharmaceuticals, Inc.**  
**157 Technology Drive**  
**Irvine, California 92618, US**

72

Inventor/es: **Nuijen, Bastiaan;**  
**Pfadenhauer, Ernie y**  
**Beijen, Jos F.**

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 341 922 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

Composiciones médicas para el tratamiento intravesical de cáncer de vejiga.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U. S. N° 60/344,446 presentada en Noviembre 1, 2001.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de vejiga representa aproximadamente el 2% de todos los cánceres malignos y es el quinto y décimo cáncer más común en hombres y mujeres, respectivamente. La American Cancer Society estimó que 54.500 nuevos casos y 11.700 muertes se habrían producido en 1997. Los cánceres de vejiga superficiales (pTa, pT1 y CIS) representan el 70-80% de los cánceres en primera presentación. La gestión del cáncer de vejiga superficial puede lograrse por resección quirúrgica endoscópica a menudo seguida de un proceso de quimioterapia intravesical adyuvante o inmunoterapia con el propósito de erradicar las restantes células tumorales y prevenir la recurrencia del tumor (Herr HW (1987) Intravesical therapy a critical review. Urol Clin N Am 14:399-404). Ambos, anti-neoplásicos (Mitomicina C [MMC], epirubicina y tio TEPA) e inmunoterapia (BCG) administrados intravesicalmente son efectivos para reducir las tasas de recurrencia del tumor aunque no está claro si la progresión de la enfermedad de los tumores invasivos del músculo es evitada (Newling D (1990) Terapia intravesical en la administración de células de carcinoma de vejiga superficiales de transición: la experiencia del grupo EORTC GU, Br J Cancer 61:497-499; Oosterlink *et al.* (1993). Un ensayo aleatorizado prospectivo de European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group comparando la resección transuretral seguido de una instilación única de epirubicina o agua en una sola etapa Ta, T1 carcinoma papilar de la vejiga. J Urol 149:749-752). Esta observación en conjunto con el hecho de que la mortalidad del cáncer de vejiga es todavía alta subraya la necesidad de desarrollar agentes terapéuticos más efectivos (Oosterlink *et al.* 1993).

Un agente terapéutico tal es MMC que pertenece a una clase de compuestos conocidos como medicamentos bio-reductivos (Workman 1994). MMC representa uno de los agentes antineoplásicos usados para tratar los cánceres de vejiga superficial (Maffezzini *et al.*, 1996, Tolley *et al.*, 1996). MMC es activado a especie citotóxica por reductasas celulares aunque el papel de las enzimas reductasa específica que intervienen en la activación bio-reductiva sigue siendo poco definido y controvertido (Cummings *et al.*, 1998a). Esto es particularmente verdadero para la enzima NQO1 (NAD(P)H:Quinona oxidoreductasa, EC 1.6.99.2) que es una flavoproteína citosólica que cataliza la reducción de dos electrones de varios compuestos basados en quinona utilizando o NADH o NADPH como donantes de electrón (Schalger and Powis, 1988, Siegel *et al.*, 1990). Los compuestos estructuralmente relacionados E09(5-(1-aziridinil)-3(hidroxiometil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]1-metil-1H-indol-4,7-diona) es sin embargo un sustrato mucho mejor para NQO1 que MMC (Walton *et al.*, 1991) y existe una buena correlación entre la actividad NQO1 y quimiosensibilidad *in Vitro* bajo condiciones aeróbicas (Robertson *et al.*, 1994, Fitzsimmons *et al.*, 1996, Smitkamp-Wilms *et al.*, 1994). Bajo condiciones hipóxicas sin embargo, las propiedades de E09 son bastantes diferentes con una pequeña o nula potenciación de la toxicidad de E09 observada en las células ricas en NQO1 (Plumb and Workman, 1994). Sin embargo, en líneas celulares deficientes en NQO1, se ha informado de grandes proporciones de citotoxicidad hipóxica (Workman, 1994). Por lo tanto, E09 tiene el potencial para aprovechar la fracción aeróbica de tumores ricos en NQO1 o la fracción hipóxica de tumores deficientes en NQO1 (Workman, 1994).

E09 ha sido clínicamente evaluado pero a pesar de los informes de tres remisiones parciales en la fase 1 de ensayos clínicos, ninguna actividad fue vista contra cánceres de NSCLC, gástricos, pecho, pancreático y colon en subsecuente ensayos de fase 2 (Schellens *et al.*, 1994, Dirix *et al.*, 1996). Estos descubrimientos son particularmente decepcionantes en vista de los estudios preclínicos (Hendriks *et al.*, 1993) junto con informes que muchos tipos de tumores han elevado los niveles de NQO1 (Malkinson *et al.*, 1992, Smitkamp-Wilms *et al.*, 1995, Siegel *et al.*, 1998). Varias posibles explicaciones han sido propuestas para explicar la falta de eficacia clínica de E09 (Connors, 1996, Phillips *et al.*, 1998). Estudios recientes han demostrado que faltale fracaso de E09 en los clínicos puede no deberse a interacciones farmacodinámicas pobres sino que puede ser el resultado del pobre suministro de medicamento hacia el tumor (Phillips *et al.*, 1998). La rápida eliminación del plasma de E09 ( $t_{1/2} = 10$  min en humanos) en conjunción con una pobre penetración a través de capas multicelulares sugieren que E09 no penetrará más que unas pocas micras desde un vaso sanguíneo dentro de su vida útil farmacocinética (Schellens *et al.*, 1994, Phillips *et al.*, 1998). La administración intratumoral de E09 a tumores ricos y deficientes en NQO1 produjo un retraso de crecimiento significativo (aunque no fue determinada una distinción entre el daño a la fracción aeróbica o hipóxica) sugiriendo que si E09 puede ser suministrada a tumores, los efectos terapéuticos pueden lograrse (Cummings *et al.*, 1998b). Mientras estas indeseables características son un serio revés para el tratamiento de enfermedades sistémicas, paradójicamente pueden ser ventajosas para tratar cánceres que se presentan en un tercer compartimento tal como cáncer superficial de vejiga. En este escenario, el suministro de medicamento no es problemático mediante una vía intravesical y la penetración de E09 en el tejido avascular puede ser incrementada por el mantenimiento de concentraciones de medicamento terapéuticamente relevantes en la vejiga (utilizando una hora de instilación por ejemplo). Aun cuando este método de instilación de E09 en la vejiga puede ser útil, todavía habrá una necesidad de vehículos de suministro de medicamento que sean capaces de suministrar una cantidad eficaz de E09 en la vejiga.

## ES 2 341 922 T3

J D de Vries *et al* (Int J Pharmaceutics, 100 (1993) 191-188) investigaron la estabilidad química de E09 utilizando un ensayo HPLC de fase inversa indicador de estabilidad con detección UV y espectrometría UV. La cinética de degradación de E09 fue estudiada como una función de pH, composición buffer, fuerza iónica y temperatura.

5

J D Jonkman- de Vries *et al* (Cancer Chemother Pharmacol (1994) 34:416-422) informaron sobre un estudio para diseñar una forma de dosificación estable parenteral de E09. El estudio investigó la liofilización de soluciones acuosas de E09.

10

J D Jonkman-de Vries *et al* (Drug Development and Industrial Pharmacy, 23(2), 137-144 (1997)) informaron de un proceso de fabricación para lotes de una forma de dosificación liofilizada parenteral de E09 en el establecimiento de una farmacia de hospital.

15

Choudry *et al* (Br J Cancer (2001) 85(8), 1137-1146) revelan composiciones para el tratamiento de cáncer de vejiga, estas composiciones incluyen E09. Este documento estudia la relación entre la actividad NQO1 en el tejido del tumor y la selectividad de E09. Además, Choudry *et al* enseña que el suministro de E09 en un vehículo ácido resulta en una mayor actividad en la vejiga con cualquier medicamento absorbido en el torrente sanguíneo llegando a ser relativamente inactiva debido al aumento del pH. Sin embargo, este documento no discute métodos para la estabilización de una composición E09 reconstituida.

20

### Breve resumen de la invención

25

De acuerdo a la presente invención, se proporciona una formulación anti-cáncer como se define en la reivindicación 1.

30

En un aspecto amplio, la presente invención está dirigida a composiciones para el tratamiento de cáncer. Más específicamente, las composiciones de la presente invención comprenden productos farmacéuticos formulados para instilación intravesical para tratar cáncer de vejiga. Los productos farmacéuticos comprenden 5-(1-aziridinil)-3-(hidroximetil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-1-metil-1H-indol-4,7-diona (E09) y un vehículo de formulación. Los vehículos de formulación aquí revelados mejoran las características físicas de la solución tales como solubilidad, liofilización, y facilidad de reconstitución de la solución liofilizada.

35

La composición de la presente invención comprende 5-(1-aziridinil)-3-(hidroximetil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-1-metil-1H-indol-4,7-diona (E09) y un vehículo de formulación que es una mezcla de tert-butanol y agua. Esta composición de realización de la presente invención puede ser liofilizada por técnicas conocidas o desarrolladas en la técnica.

40

De acuerdo a realizaciones más específicas de la presente invención, la composición de la presente invención comprende E09 y un agente de recubrimiento. El agente de recubrimiento permite una mejor adhesión de la composición a la pared de la vejiga. Consecuentemente, la composición y, en particular, E09 contacta y es capaz de penetrar en el tejido avascular que contiene por un tiempo suficiente para tratar el cáncer de vejiga. En una realización de la presente invención, el agente de recubrimiento es propileno glicol. En otras realizaciones ejemplares de la presente invención, el agente de recubrimiento puede ser seleccionado de un grupo consistente de hidroxicelulosa, carboximetilcelulosa, hidrocloreuro citosán, lectinas, o policarbofil. Las composiciones de la presente invención pueden ser suministradas a la pared de la vejiga por un liposoma. Las composiciones de la presente invención pueden también ser suministradas a la pared de la vejiga por una microsfera. Alternativamente, las composiciones de la presente invención pueden ser suministradas a un paciente intravenosamente.

50

### Breve descripción de los dibujos

55

Figura 1. Validación de anticuerpo NQO1 anti-rata policlonal para el uso en análisis inmunohistoquímico de NQO1 humano. Grupo A: análisis Western blot de extractos celulares (12.5 p, g de proteína cargada por calle) para NQO1. Vías 1-5 representa extractos de DLD-1 (794±121 nmol/min/mg), HT-29 (688±52 nmol/min/mg), H460 (1652±142 nmol/min/mg), MT1 (287±53 nmol/min/mg), y RT112 (30±3 nmol/min/mg) respectivamente donde los valores en paréntesis representan la actividad NQO1. La calle 6 representa marcadores de peso molecular (marcadores de peso molecular de proteína ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK). Grupo B: análisis por Western blot utilizando NQO1 humano purificado recombinante. Las calles 1-5 representan cantidades de proteínas de 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03212 y 0.0156 pmol respectivamente. Grupo C: análisis Western blot de extractos de células (25/, cg proteínas cargadas por calle) derivada de células H460 (vías 1-2) y células BE (vías 3-4).

60

Figura 2. Localización inmunohistoquímica de NQO1 en tumores de vejiga humanos, vejiga normal, uretra y uréter. Los tumores (grupos A, B, y C) fueron clasificados como G2 pTa (grupo A, [x200]) y G3 pT2 (grupos B [x100]) y G3 pT4 (grupo C [x200]) que tuvieron de niveles altos a intermedios de actividad de NQO1 como se determinó por métodos bioquímicos. Grupo D (x100) representa una sección histológica macroscópicamente a través de un aspecto normal de la sección de la vejiga de un paciente que se sometió a una cistectomía para un tumor G3

pT4; ningún tumor fue identificado en estas secciones pero algún cambio inflamatorio fue evidente. Grupos E y F (x200) representan la uretra y uréter sin evidencia de un carcinoma *in situ* o invasivo en estas secciones. Todas las secciones han sido teñidas con anticuerpo NQO1. Teñidos negativos (sin anticuerpo primario) eran claros (datos no mostrados).

Figura 3. La relación entre la actividad NQO1 y la respuesta de un grupo de líneas de células a E09 (grupo A) o MMC (grupo B) bajo un pHe fisiológico normal de 7.4 (○) o valores ácidos de pHe de 6.0 (□). El análisis regresional de datos (determinado por gráficos de Sigma Plot) para E09 a pH 7.4 fueron  $r=0.886$ , pendiente  $=-0.52$  y a pH 6.0, el análisis de regresión de datos para E09 fue  $r=0.804$  y pendiente  $-0.51$ . Para MMC, el análisis de regresión a pH 7.4 fue  $r=0.849$ , pendiente  $=-0.19$  y a pH 6.0,  $r=0.609$ , pendiente  $-0.23$ .

Figura 4. Respuesta de HT-29 esferoides multicelulares después de una hora de exposición a E09 bajo condiciones de pH extracelulares ácidos (pHe= 6.0, 0) y fisiológicas (pHe = 7.4, 0). Los valores presentados son las medias de 3 experimentos diferentes  $\pm$  desviación estándar.

### Descripción detallada de la invención

Las realizaciones de la presente invención están dirigidas a composiciones para tratar el cáncer de vejiga vía instilación intravesical. La composición de la presente invención comprende una solución buffer conteniendo 5-(1-aziridinil)-3-(hidroximetil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-1-metil-1H-indol-4,7-diona (E09) y un vehículo de formulación comprendiendo tert-butanol/agua. Los vehículos de formulación son mezclas de solventes que aumentan la solubilidad y estabilidad de E09. De acuerdo a diferentes realizaciones de la presente invención, E09 se disuelve en los vehículos de formulación sin ninguna manipulación física como la molienda. Ya que las composiciones de la presente invención son capaces de disolver mayores cantidades de E09, se logra una flexibilidad adicional respecto a unidades de dosificación. En otras realizaciones, el rango de dosis de instilación va de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 16 mg en un volumen total de 40 ml.

Además de aumentar la solubilidad de E09, los vehículos de formulación son buenos vehículos de liofilización. Por ejemplo, los vehículos de formulación minimizan el tiempo de liofilizado de las composiciones reveladas aquí. Con ello, es posible liofilizar las composiciones reveladas aquí en menos que aproximadamente 4,5 días. Además, las composiciones son estables después de someterse a la liofilización (ver tabla 4). Se cree que los vehículos de formulación revelados aquí minimizan la cristalización de E09 durante el proceso de liofilización. Consecuentemente, mediante reducción de la cantidad de cristalización de E09, un volumen menor de líquido es requerido para reconstituir las composiciones de la presente invención. Como resultado, puede lograrse un mayor tamaño de lote debido a los reducidos volúmenes de reconstitución para la composición liofilizada.

La composición de la presente invención comprende E09 y un vehículo de formulación que comprende tert-butanol y agua. En un revelación a título de ejemplo, el vehículo de formulación comprende 40% tert-butanol en agua. Un especialista en la técnica apreciará que la cantidad de tert-butanol puede ser variada. La solución tert-butanol disuelve mejor E09 en comparación con el agua. Utilizando un vehículo de formulación de tert-butanol, la solubilidad de E09 es al menos 9.5 mg/ml mientras que la solubilidad de E09 es aproximadamente 0.2 mg/ml en agua. Consecuentemente, se requiere un menor volumen de tert-butanol para disolver una cantidad dada de E09. Adicionalmente, una mayor cantidad de E09 puede ser disuelta en una solución dada. Esto es, las composiciones descritas aquí tendrán una mayor concentración de E09 en comparación con una solución donde E09 está disuelto en agua.

De acuerdo a otra realización más específica de la presente invención, la composición comprende, E09, un vehículo de formulación, y un agente de carga. En una disposición ejemplar, la lactosa puede ser utilizada como agente de carga. Los especialistas en la técnica apreciarán que se contemplan y pueden utilizarse otros agentes de carga conocidos o desarrollados en la técnica. La composición de la presente invención es tamponada. En una realización, la composición es tamponada a un pH de 9 a 9.5. La composición puede ser tamponada con cualquier agente buffer conocido o desarrollado. Las composiciones de la presente invención pueden estar compuestas por suministro intravesical o liofilizadas. Como será entendido por los especialistas en la técnica, las composiciones de la presente invención pueden ser liofilizadas por estos métodos conocidos o desarrollados en la técnica. Las composiciones liofilizadas pueden ser reconstituidas por un vehículo reconstituyente. De acuerdo a una posible formulación, el vehículo de reconstitución comprende 2% bicarbonato sódico, 0.02% edetato disódico y propileno glicol: agua (60:40 V/V). Este vehículo de reconstitución disuelve la composición liofilizada y produce una solución estable para la administración durante 24 horas. Además, el vehículo de reconstitución proporciona una ampolla con un volumen extraíble de 5 mL de E09 reconstituido comprendiendo glicol/agua/bicarbonato sódico/edetato sódico 60/40/2/0.02% v/v/w/w.

En otros aspectos más específicos de la presente invención, las composiciones de la presente invención también comprenden agentes de recubrimiento. Los agentes de recubrimiento de la presente invención proporcionan una mejor adhesión de la composición a la pared de la vejiga. Consecuentemente, la composición y, en particular, E09 contacta y será capaz de penetrar en el tejido avascular que comprende por un tiempo suficiente para tratar el cáncer de vejiga. En otra realización de la presente invención, el agente de recubrimiento es propileno glicol. En otras composicio-

## ES 2 341 922 T3

nes comparativas, el agente de recubrimiento puede ser seleccionado del grupo consistente en hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, citosan hidrocloreuro, lectinas o policarbofil.

Las composiciones de la presente invención pueden ser suministradas a la pared de la vejiga por un liposoma. De acuerdo a una posibilidad, los liposomas utilizados son unilaminares o multilaminares y contienen al menos un fosfolípido catiónico tal como estearilamina, 1,2-diacil-3-trimetilamonio-propano (TAP) o 1,2-triacil-3-dimetilamoniopropano (DAP). Alternativamente, la superficie de los liposomas puede estar recubierta con polietileno glicol para alargar la media vida de circulación de los liposomas. En otra posibilidad, los liposomas cargados neutralmente tal como fosfatidilcolina y colesterol pueden ser utilizados para atrapamiento liposomal de composiciones de la presente invención. Alternativamente, las composiciones pueden ser suministradas a la pared de la vejiga por una microsfera como es conocido en la técnica.

En otra posibilidad, las composiciones pueden ser suministradas a un paciente intravenosamente. La composición liofilizada de la presente invención puede ser reconstituida utilizando vehículos de formulación descritos aquí. La composición reconstituida puede ser diluida hasta una concentración deseada y suministrada a un paciente intravenosamente.

Los siguientes experimentos se hicieron para determinar la actividad de NQO1 en una serie de tumores de vejiga humanos y tejido de vejiga normal por ambas técnicas enzimáticas e inmunohistoquímica. Además, los siguientes experimentos evalúan estrategias para reducir el posible toxicidad del sistema debida a la terapia intravesical basada en el hecho de que la actividad aeróbica de E09 contra líneas celulares es potenciada bajo condiciones ácidas suaves (Phillips *et al.*, 1992). La administración de E09 en un vehículo ácido resulta en una mayor actividad en la vejiga y cualquier medicamento absorbido en el torrente sanguíneo llegará a estar relativamente inactivo debido al aumento del pH extracelular. Los siguientes experimentos también determinan el papel de NQO1 en la activación de E09 bajo condiciones ácidas.

Recogida de especímenes de vejiga con tumor y normal. La aprobación ética para la recogida de tejido fue obtenida de Local Research Ethical Committee (Bradford NHS Trust) y las muestras tomadas de pacientes que dieron su consentimiento informado. Un total de 17 biopsias pareadas cold pinch se tomaron de tumores de vejiga y de mucosa de vejiga de apariencia macroscópicamente normal en cistoscopia, e inmediatamente antes de la resección transuretral formal del tumor. Tres especímenes fueron tomados de pacientes que se sometieron a cistectomía y muestras tumorales y normales diseccionadas por patólogos en una hora a partir de la eliminación por cirugía. Los especímenes se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se transportaron para análisis de enzima NQO1. Biopsias posteriores se llevaron a cabo en la mucosa de vejiga normal inmediatamente adyacente al sitio de biopsia previo y se enviaron al final del procedimiento, junto con el tumor resecado, en formaldehído para análisis histológico rutinario. De esta manera, pudo relacionarse directamente la enzimología del tumor de vejiga y de urotelio de vejiga normal con la histología apropiada del tejido en cada paciente. Se llevó a cabo inmunohistoquímica de los bloques de cera subsiguientemente archivados preparados para histología.

Determinación Bioquímica de la actividad NQO1. Cultivos de células en crecimiento exponencial fueron tripsinizados, lavados dos veces con solución salina equilibrada Hanks (HBSS) y sonicados en hielo (3 x 30 seg ráfagas de 40% de ciclo de trabajo y ajuste de salida 4 en un sonicador Semat 250 células). La actividad NQO1 y la concentración de proteína fue determinada como se describe abajo. Los tejidos fueron homogeneizados (10% w/v homogeneizado) en sacarosa (0.25 M) utilizando 1 ml de tejido homogeneizador (Fisher Scientific). Fracciones citosólicas fueron preparadas por centrifugación del homogenado a 18.000 g durante 4 min seguido de una centrifugación posterior del sobrenadante a 11.000 g durante 1 h a 4°C en ultracentrifugadora Beckman Optima TL. La actividad de NQO1 en el sobrenadante fue determinada espectrofotométricamente (espectrofotómetro Beckman DU650) mediante la medida de reducción sensible de dicumarol de diclorofenolindofenol (DCPIP, Sigma Aldrich, UK) a 600 nm (Traver *et al.*, 1992). Este ensayo ha sido validado extensamente para uso en la medida de actividad de NQO1 en los homogenados de tejido y célula y ha sido estudiado para ser preferente a otros ensayos para la actividad de NQO1 (Hodnick and Sartorelli, 1997). Cada reacción contenía NADH (200 IZM), DCPIP (40/iM, Sigma Aldrich, UK), Dicumarol (20 uM, cuando requería, Sigma Aldrich, UK), fracción citosólica de tejido (50 p, 1 por ensayo) en un volumen final de 1 ml Tris HCl buffer (50 mM, pH 7.4) conteniendo albúmina de suero bovino (0.7 mg ml<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, UK). Las tasas de reducción de DCPIP fueron calculadas de la parte lineal inicial de la curva de reacción (30s) y los resultados fueron expresados en términos de nmol DCPIP reducidos/min/mg proteína utilizando un coeficiente molar de extinción de 21 mNT cm<sup>-1</sup> para DCPIP. La concentración de proteína fue determinada utilizando el ensayo Bradford (Bradford, 1976).

Inmunohistoquímica. Anticuerpos policlonales (formados en conejos) a NQO1 purificado de rata fueron un regalo del Profesor Richard Knox (Enact Pharma Plc). Validación del anticuerpo para el uso en estudios inmunohistoquímicos fue desarrollada por análisis Western blot utilizando NQO1 recombinante humano purificado y extractos de células derivadas de un grupo de líneas de células de origen humano. Estas líneas de células incluían H460 (NSCLC humano), RT112 (carcinoma de vejiga humana), HT-29 (carcinoma colon humano), BE (carcinoma colon humano), MT1 (pecho humano) y DLD-1 (carcinoma colon humano). La línea de célula BE ha sido genotipada para la variante polimórfica C606T de NQO1 y es un mutante homocigótico (y por lo tanto desprovisto de la actividad de enzima NQO1) respecto a este polimorfismo (Traver *et al.*, 1992). Las células fueron lavadas en suero helado tamponado con fosfato y lisado por sonicación (30 segundos en hielo) en Tris HCl (50 mM, pH 7.5) conteniendo 2 mM EGTA, 2 mM PMSF y 25 Ftg ml<sup>-1</sup> de leupeptina. La concentración de proteína fue estimada por el ensayo Bradford (Bradford, 1976) y un total de 12.5,

ug de proteína (en muestra Lamelli tampón de carga) aplicada en gel de 12% SDS-PAGE. Después de la transferencia electroforética a la nitrocelulosa del papel, las membranas fueron bloqueadas en TBS/Tween 20 (0.1%) conteniendo 5% leche en polvo sin grasa durante 1 hr a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas en TBS/Tween 20 (0.1%) antes de la adición del anticuerpo NQO1 de conejo anti rata (dilución 1:100) e incubadas a temperatura ambiente durante 1 h. Las membranas fueron extensivamente lavadas en TBS/Tween 20 (0.1%) seguido de la adición de anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa de rábano de IgG anti conejo (1:5000 dilución en TBS/Tween 20). Fueron visualizadas proteínas por quimiluminiscencia basada en ECL como lo describió el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Buck, UK).

Para los estudios inmunohistoquímicos, todos los tejidos (mucosa de tumor y de vejiga normal) fueron fijados en 10% formaldehído, procesado rutinariamente e incrustados en cera parafina. Dos secciones de cada bloque de tejido se situaron en una platina, una sección sirvió como test y la otra como un control negativo (ningún anticuerpo primario). Un total de 5 secciones de cada muestra fueron teñidas para NQO1 (además de los controles negativos) y fueron analizadas el tumor y muestras normales de un total de 17 pacientes. Secciones (5  $\mu$ m) fueron desparafinados, rehidratados e incubadas con anticuerpo primario (1:400 dilución) durante 4 horas. Fueron lavadas e incubadas secciones con IgG biotinilado de ratón anticonejo durante 30 min antes del teñido de inmunoperoxidasa utilizando reactivos VECTASTAIN ABC y DAB (Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK). Fueron contrastadas secciones con hematoxilina de acuerdo a procedimientos estándar.

Cultivo celular y estudios quimiosensibles. E09 fue un regalo de NDDO Oncology, Amsterdam and MMC fue obtenido de Department of Pharmacy, St Lukes Hospital, Bradford. La línea celular H460 (NSCLC humano) fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC). HT-29 (carcinoma colon humano), RT112/83 (carcinoma epitelial vejiga humana), EJ138 (carcinoma vejiga humana) y líneas de célula T24/83 (carcinoma de células transicionales de vejiga humana) fueron obtenidas de European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC). Las células A2780 (carcinoma ovario humano) y BE (carcinoma colon humano) fueron regalos de Dr T Ward (Paterson Institute, Manchester, UK). Todas las líneas de célula fueron mantenidas como cultivos monocapa en RPMI 1640 medio cultivo suplementado con suero fetal de ternero (10%), piruvato sódico (2 mM), L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (50 IU/ml/50 jug/ml) y tamponada con HEPES (25 mK). Todos los materiales de célula de cultivo fueron adquiridos de Gibco BRL (Paisley, UK). Las células fueron expuestas a MMC o E09 en un rango de dosis para una hora y la quimiosensibilidad fue calculada al quinto día posterior del periodo de recuperación utilizando el ensayo MMT, detalles que han sido descritos en otra parte (Phillips *et al*, 1992). El pH del medio utilizado durante la exposición al medicamento fue ajustado utilizando pequeñas alícuotas de HCl concentrado (40, una concenc HCl [10.5M] de 20 ml en el medio dando un pH de 6.0). Las curvas de calibración se llevaron a cabo en una amplia gama de valores de pH en el medio de cultivo (pH 3.5 a 11) y la estabilidad de condiciones de pH supervisada durante una hora de incubación a 37°C. A todos los valores de pH, no se observan cambios significativos en el pH del medio durante el periodo de exposición al medicamento de una hora (datos no presentados).

Se prepararon esferoides HT-29 multicelulares mediante el cultivo de 5 x 10<sup>5</sup> células en frascos T25 que habían sido recubiertos con agar (1% w/v) e incubados durante 24 h a 37°C. Esferoides inmaduros fueron transferidas a un frasco centrifugador (Techne) conteniendo 250 ml de RPMI 1640 crecimiento medio y los esferoides fueron tomados en suspensión por agitación a 50 rpm. Cuando los esferoides alcanzaron el diámetro de aproximadamente 500 Am, se cultivaron para estudios quimiosensibles. Esferoides multicelulares fueron expuestos a una gama de concentraciones de E09 a pHe 6.0 y 7.4 durante una hora a 37°C. Posterior a la incubación del medicamento, los esferoides fueron lavados dos veces en HBSS antes de la disgregación en células simples utilizando EDTA tripsina. Los esferoides desagregados fueron luego lavados y colocados en placas de 96 pocillos (1 x 10<sup>3</sup> células por pocillo) e incubados a 37°C durante cuatro días. La quimiosensibilidad fue calculada utilizando el ensayo NM descrito en otra parte (Phillips *et al*, 1992).

El papel de NQO1 en la activación de E09 a valores de pHe de 7.4 y 6.0 fue evaluado utilizando el inhibidor de NQO1 Ácido Acético Flavona (FAA), detalles que son descritos en otra parte (Phillips, 1999). FAA es un inhibidor competitivo de NQO1 respecto a NADH y a una concentración final de 2 mM, la inhibición de NQO1 es >95% mientras que la actividad de reductasa P450 citocroma y reductasa b5 citocroma no es alterada (<5% inhibición). Brevemente, las células H460 (NQO1 ricas) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10<sup>3</sup> células por pocillo. Después de la incubación durante la noche a 37°C, el medio fue reemplazado con medio fresco (pH 7.4) conteniendo una concentración no tóxica de FAA (2 mM) e incubado durante una hora a 37°C. El medio fue sustituido por medio fresco conteniendo E09 (rango de concentraciones de medicamento) y FAA (2 mM) a pHe 7.4 o 6.0. Posterior a una hora de incubación a 37°C, las células fueron lavadas dos veces con HBSS e incubadas a 37°C en un medio de crecimiento durante cinco días. La quimiosensibilidad fue determinada por el ensayo NM como se describe arriba y los resultados se expresaron en términos de valores de IC<sub>50</sub>, proporciones de selectividad (IC<sub>50</sub> a pHe 7.4/IC<sub>50</sub> a pHe 6.0) y coeficientes de protección (combinaciones IC<sub>50</sub> FAA/E09/IC<sub>50</sub> para E09 solo).

Especificidad de sustrato. La influencia de pHe ácido en la especificidad del el sustrato para NQO1 humano purificado fue determinada como se describió previamente (Phillips 1996, Walton *et al*, 1991). La reducción mediada por NQO1 de quinona a la especie hidroquinona es difícil de detectar por ensayos convencionales por lo que se necesario el uso de una etapa de generación de señal informadora. En este ensayo, la hidroquinona actúa como un aceptor de electrones intermedio que reduce la citocroma c que puede ser fácilmente detectada espec-

trofotométricamente. El NQO1 humano recombinante fue derivado de *E. coli* transformado con la expresión de plásmido pKK233-1 conteniendo la entera longitud de la secuencia de ADNc para la NQO1 humano aislado de (Beall *et al.*, 1994). Después de la inducción IPTG, NQO1 fue purificado por cromatografía de afinidad azul cibacon, detalles que están descritos en otra parte (Phillips, 1996). La proteína purificada tenía un peso molecular de aproximadamente 31 kDa y una actividad específica de 139/Amol DCPIP reducido/min/mg proteína (Phillips, 1996). La reducción de E09 por NQO1 humano recombinante fue determinada a pH 6.0 y 7.4 midiendo la proporción de reducción de citocroma c que fue medida a 550 nm en el espectrofotómetro Beckman DU 650 de acuerdo con los métodos publicados previamente (Phillips, 1996). Los resultados se expresaron en términos de  $\mu\text{mol}$  citocroma c reducida/min/mg proteína usando el coeficiente de extinción molar  $21.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para citocroma c.

Medida de pH intracelular. El pH intracelular fue determinado usando el indicador de pH fluorescente BCECF (2,7-bis-(2-carboxi-etil)-5-(y-6) carboxifluoresceína (Molecular Probes, Eugene, USA) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los matraces confluentes de células fueron lavados con HBSS para eliminar trazas de suero conteniendo el medio RPMI y luego incubados con la forma esterificada BCECF (BCECF-AM) a concentración de 2  $\mu\text{M}$  en HBSS durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . El detergente Pluronic no desnaturizante fue añadido al ensayo para ayudar a la dispersión. Las células fueron lavadas para eliminar todas las trazas de BCECF-AM y luego tripsinizadas antes de ser suspendidas en medio RPMI sin suero/sin fenol rojo (Gibco BRL, Paisley, UK) a una concentración de  $10^6$  células por ml a pH 6 durante 1 hora. La fluorescencia medida fue determinada en un espectrofotómetro fluorescente Perkin-Elmer en cubetas 4 ml desechables grado UV (Fisher Scientific) con longitud de onda de excitación 500 nm y 450 nm (ranura de paso de banda 10 nm de excitación) y longitud de onda de emisión fijada a 530 nm (ranura de paso banda de 2.5 nm de emisión). Se determinó que éstos eran los ajustes óptimos del sistema y máquina bajo estudio. En una calibración *in situ* desarrollada para cada determinación de pHi con un rango de pHs de 4 a 9 utilizando nigericina ionófora a concentración de 22.8  $\mu\text{M}$  para equilibrar pHe con pHi. El cálculo de proporción de fluorescencia a 500 nm/450 nm fue calculado después de restar la fluorescencia de fondo de los espacios en blanco en cada pH (RPMI sin suero/sin fenol rojo sin células).

Actividad de NQO1 en especímenes de tumor y vejiga normal. La actividad bioquímica de NQO1 en muestras pareadas de tumor (grado/etapa desde G2pTa a G2/G3T4) y mucosa de vejiga normal (con tres especímenes cistectómicos) tomadas de series de 20 pacientes es presentada en la tabla 1. En especímenes con tumor, un amplio rango de actividad NQO1 existió desde 571.4 nmolUmin/mg hasta indetectable ( $<0.1$  nmol/min/mg). En especímenes con mucosa de vejiga histológicamente normal, la actividad NQO1 osciló desde 190.9 a  $<0.1$  nmoUmin/mg. En la mayoría de pacientes, la actividad NQO1 en el tumor fue mayor que en la mucosa normal de la vejiga. El grado y etapa de tumor no se correlacionó con la actividad de NQO1 (tabla 1).

Validación de anticuerpo NQO1 y localización inmunohistoquímica de NQO1. El análisis Western blot demuestra que el anticuerpo NQO1 anti rata policlonal reacciona con NQO1 humano (figura 1) con una banda simple a aproximadamente 31 kDa observada para ambos extractos de células y NQO1 humana purificada. La valoración de NQO1 muestra una disminución en la intensidad de banda (figura 1) y en los extractos de célula, la intensidad de banda fue cualitativamente consistente con la actividad de la enzima NQO1 (figura 1A). Además, el anticuerpo no detecta NQO1 en la línea celular BE que está desprovista de actividad NQO1 como resultado de polimorfismo C609T (figura 1C). Ninguna banda no específica fue observada en Western blots. El tñido inmunoperoxidasa de proteína NQO1 en el tejido del tumor, uréter y uretra son presentados en la figura 2. Los tumores superficiales e invasivos (ptA- panel A, G3pT2- panel B y G3pT4-panel C) de altos a niveles intermedios de NQO1 cuando se determinaron por ensayos bioquímicos (números de paciente 1, 4 y 5 en tabla 1) claramente se tñieron positivamente para NQO1. El tñido se limitó al citoplasma de células del tumor con poca o ninguna tñición de células del estroma (paneles B y C).

En otros tumores con niveles bajos o intermedios de actividad NQO1, la tñición fue heterogénea con bolsas de células que contienen altos niveles de proteína NQO1 (datos no mostrados). Las secciones de pared de vejiga normal fueron obtenidas de un paciente que se sometió a cistectomía (tumor de vejiga G3pT4), uréter y uretra fueron obtenidas de otro paciente que se sometió a cistectomía (tumor de vejiga G3pT3a). En la pared de la vejiga, no se observó el tñido NQO1 en el urotelio (panel D) aunque un leve tñido estuvo presente en las capas de músculos lisos. La uretra (panel E) fue negativa aunque las células en la superficie luminal del uréter fueron positivamente tñidas (panel F). Las capas basales del revestimiento del uréter fueron sin embargo negativamente tñidas (panel F). Ninguna evidencia de malignidad invasiva o carcinoma *in situ* fue observada en el uréter y uretra o en la sección de la pared de la vejiga presentada (panel D). En otras 16 biopsias de vejiga normal y especímenes de cistectomía, fue observado el tñido no positivo del urotelio (dato no mostrado).

Influencia de pH en la especificidad y quimiosensibilidad del sustrato. La capacidad de E09 para servir como un sustrato para NQO1 no fue influenciada por el pH con actividades específicas de  $21.10 \pm 23$  y  $21.30 \pm 1.5$  pmol citocroma reducida/min/mg proteína a pH 7.4 y 6.0 respectivamente. La respuesta del panel de líneas celulares con un rango de actividad de NQO1 ( $<1.0$  a  $1,898 \pm 276$  nmol/min/mg) a E09 y MMC a valores de pH de 7.4 y 6.0 está presentada en la tabla 2 y figura 2. A pHe =7.4, una buena correlación existió entre la actividad NQO1 y quimiosensibilidad a E09 (figura 3). En el caso de MMC (tabla 2, figura 3), fue aparente una relación entre actividad de NQO1 y quimiosensibilidad (a pHe 7.4) aunque esta relación no es prominente como se muestra por E09 con un estrecho rango de valores de  $\text{IC}_{50}$  (rango 0.9 a 7.0  $\mu\text{M}$ ) observados en líneas de célula que cubren un rango amplio de actividad NQO1 (intervalo de  $<1.0$  a  $1,898 \pm 276$  nmol/min/mg). Ambos MMC y E09 son preferentemente más

tóxicos para células a valores de pHe de 6.0 aunque la mayor potenciación de actividad E09 se ve con valores SR (SR= razón de selectividad definida como  $IC_{50} \text{ pHe } 7.4 / IC_{50} \text{ pHe } 6.0$ ) comprendiendo desde 3.92 a 17.21 para E09 comparado con 1.02 a 4.50 para MMC (tabla 2). La actividad de E09 fue potenciada tanto en líneas celulares ricas y deficientes cuando pHe fue reducido a 6.0 y la relación entre NQO1 y quimiosensibilidad permaneció buena cuando células estuvieron expuestas a E09 bajo condiciones ácidas (figura 3). Ninguna muerte de célula fue observada en los cultivos de control cuando el pHe bajó hasta 6.0 (en ausencia de medicamento) como se determinó por el ensayo MTT. La respuesta de las células H460 a E09 a valores de pHe de 7.4 y 6.0 en presencia y ausencia de FAA (2 mM) está presentada en la tabla 3. A ambos valores de pHe, la respuesta de células H460 a E09 fue reducida en presencia de FAA. La razón de protección definida cuando  $IC_{50}$  para E09 más FAA dividido por el valor de  $IC_{50}$  para E09 solo fueron similares para células bajo valores de pHe fisiológicos y ácidos (14.63 y 13.65 respectivamente, tabla 3). Las Las proporciones de selectividad definidas como el  $IC_{50}$  a pHe 7.4 dividido por  $IC_{50}$  a pHe 6.0 en presencia y ausencia de FAA fueron similares con valores SR de 6.31 y 6.01 para E09 sólo y E09 más FAA respectivamente (tabla 3). La respuesta de esferoides multicelulares HT-29 a E09 está presentada en la figura 4. Los esferoides fueron significativamente menos sensibles a E09 que las mismas células expuestas a E09 en monocapas a ambos valores de pHe con valores de proporciones de IC50 con esferoides a monocapas de 202 y 341 a valores de pHe de 7.4 y 6.0 respectivamente.

Influencia de condiciones pHe ácidas en pHi. Los valores de PM posteriores a una hora de incubación a pHe fueron  $6.44 \pm 0.04$ ,  $6.51 \pm 0.02$  y  $6.42 \pm 0.05$  en células A549, RT112/83 y A2780 respectivamente. La adición de nigericina ionofora (después de una hora de incubación a pHe 6.0) resultó en el equilibrio de pHe y pHi.

En términos de desarrollo de medicamento bio-reductivo, dos de los factores críticos que determinarán la selectividad son la enzimología de los tumores y la presencia de hipoxia (Workman, 1994). Como se indicó en la introducción, la presencia o ausencia de NQO1 es primordial en el diseño de las estrategias básicas de E09 apropiadas encaminadas a dirigirse bien a las fracciones aeróbicas (NQO1 ricas en células) o hipóxicas (tumores deficientes en NQO1) de tumores. Workman (1994) ha esbozado un mecanismo propuesto para las diferentes propiedades de E09 bajo condiciones aeróbicas y condiciones hipóxicas en base a la hipótesis de que sea la semiquinona (producto de la reducción de un electrón) más que la hidroquinona la que es responsable de la toxicidad. En las células deficientes en NQO1, la semiquinona producida como resultado de reductasas de un electrón sería relativamente no tóxica ya que volvería rápidamente a hacer un ciclo redox hasta el compuesto original. Las especies de radicales libres generados como resultado de ciclo redox serían detoxificadas por superóxido dismutasa o catalasa pero bajo condiciones hipóxicas, la semiquinona sería relativamente estable. Si estas fueran las especies tóxicas principales, entonces la actividad de E09 contra las células con bajo NQO1 sería potenciada. En células ricas en NQO1 sin embargo, el producto principal formado sería la hidroquinona. La toxicidad aeróbica podría generarse como resultado del regreso de la oxidación de la hidroquinona a especies de semiquinona o la quinona primaria (Butler *et al*, 1996) resultando una generación de radical libre. Bajo condiciones hipóxicas sin embargo, la hidroquinona será más estable y si ésta es relativamente no tóxica, entonces la actividad de E09 contra las células NQO1 bajo hipoxia no sería potenciada. Mientras que el mecanismo de acción de E09 bajo condiciones aeróbicas e hipóxicas es complejo, los datos biológicos sugieren que E09 debería centrarse en la fracción aeróbica de NQO1 o la fracción hipóxica de tumores deficientes en NQO1 (Workman, 1994).

El análisis de actividad de NQO1 en tumor y tejidos normales de vejiga ha identificado claramente pacientes cuyos tumores son ricos en NQO1 o deficientes en NQO1 (tabla 1). En el subconjunto de tumores ricos en NQO1, la actividad enzimática es elevada en relación con el urotelio de vejiga normal. Estudios inmunohistoquímicos confirman estas medidas bioquímicas con el teñido confinado a las células del tumor frente a las células estromales normales (fig 2, paneles A, B y C). Dentro de tejidos normales de vejiga, la tinción NQO1 estaba ausente del revestimiento urotelial de la vejiga (figura 2, panel D) y la uretra (fig 2, panel E). La débil tinción de las capas superficiales del uréter (fig 2, panel F) fue observada aunque las capas basales subyacentes del uréter fueron negativamente teñidas. Similarmente, la débil tinción de las capas musculares lisas de la vejiga, uréter y uretra fue también observada (datos no mostrados).

Estos estudios sugieren que una proporción de pacientes con tumores de vejiga (en varios grados y etapas de enfermedad) exhiben un diferencial significativo en términos de actividad de NQO1 que podrían ser explotados potencialmente por E09 en base a terapias dirigidas contra la fracción aeróbica de células tumorales. Respecto a la capacidad de E09 para destruir selectivamente células hipóxicas deficientes en NQO1, también existe un subconjunto de pacientes cuyos tumores están desprovistos de actividad de (tabla 1). No se conoce si o no los tumores de vejiga contienen regiones de baja tensión de oxígeno y son requeridos estudios posteriores utilizando marcadores de hipoxia tal como pimonidazola (Kennedy *et al*, 1997) para tratar este tema y para establecer la relación entre la actividad NQO1 e hipoxia en tumores.

Mientras que los estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos demuestran que existe un subconjunto de pacientes que tienen la enzimología de tumor apropiada para activar E09 (bajo condiciones aeróbicas), la quimioterapia intravesical puede resultar en una toxicidad sistémica debido a la entrada del medicamento en el aporte sanguíneo. Este estudio también ha evaluado una estrategia potencial para minimizar cualquier riesgo de toxicidad sistémica basada en la hipótesis de que la administración de E09 en un vehículo ácido puede mejorar la potencia de E09 (Phillips *et al*, 1992) en la vejiga y que cualquier medicamento que alcance el torrente sanguíneo llegaría a ser relativamente inactivo debido a un aumento en el pHe. La selectividad para células aeróbicas aún sería determinada por la actividad de NQO1 y por lo tanto es fundamental determinar el papel que NQO1 juega en la activación de E09 bajo condicio-

nes ácidas de pHe. En un panel de líneas celulares con un amplio espectro de actividad NQO1, reducir el pHe a 6.0 mejora la potencia de E09 bajo condiciones aeróbicas en todos los casos (con valores desde 3.92 hasta 17.21, tabla 2). En el caso de MMC, la potencia es también mejorada a valores bajos de pHe aunque la magnitud del aumento de toxicidad dependiente de pH es reducido (valores SR que van desde 1.02 a 4.50, tabla 2) comparado con E09. Respecto a MMC, una explicación para la actividad aumentada bajo condiciones ácidas ha sido atribuida al hecho de que MMC llega a ser un sustrato para NQO1 bajo condiciones ácidas (Pan *et al*, 1993, Siegel *et al*, 1993). Esto no es el caso con E09 ya que las tasas de reducción de E09 de NQO1 humano purificado no están influenciadas por el pH (21.10±2.30 y 21.30±1.50 limol citocroma c reducida/min/mg proteína a pH 7.4 y 6.0 respectivamente). Estudios recientes han demostrado que la actividad de E09 es potenciada bajo condiciones ácidas (pHe=6.5) pero solo cuando el pH intracelular es reducido (Phi =6.5) por co-incubación con nigericina (Kuin *et al*, 1999). Los resultados de este estudio están de acuerdo con este descubrimiento ya que pHi llega a ser ácido (valores de pHi que van desde 6.42±0.05 a 6.51±0.02 dependiendo de la línea celular) cuando las células son cultivadas bajo condiciones de pHe 6.0.

En el panel de líneas celulares utilizadas en este estudio, una buena correlación existe entre la actividad NQO1 y la quimiosensibilidad a ambos valores de pHe de 7.4 y 6.0 (figura 3). Una fuerte relación entre la actividad NQO1 y respuesta bajo condiciones aeróbicas (a pHe 7.4) ha sido establecida previamente mediante varios grupos (Robertson *et al*, 1994, Fitzsimmons *et al*, 1996, Smitkamp-Wilms *et al*, 1994) y hay una clara evidencia que NQO1 juega un papel principal en el mecanismo de acción de E09 bajo condiciones aeróbicas (Workman, 1994). La buena correlación entre actividad NQO1 y la respuesta a pHe 6.0, en conjunción con el hecho que E09 es todavía un buen sustrato para NQO1 a pH 6.0, sugiere que NQO1 juega un papel significativo en el mecanismo de acción de E09 a valores de pHe ácidos bajo condiciones aeróbicas. Es interesante sin embargo que la actividad de E09 contra las células BE (que están desprovistas de actividad NQO1 como resultado de polimorfismo C609T, Traver *et al*, 1992) es también mejorada bajo condiciones ácidas de pHe (tabla 2). Esto sugiere que hay un mecanismo independiente de NQO1 para la actividad mejorada de E09 bajo condiciones ácidas. Esto se confirma por el uso del inhibidor FAA de NQO1 donde las “proporciones de protección” (definidas como la proporción de valores IC<sub>50</sub> para E09 más FAA dividida por los valores IC<sub>50</sub> para E09) son similares a ambos pHe 7.4 y 6.0 (13.95 y 14.63 respectivamente, tabla 3). Si NQO1 jugaba un papel principal en la activación de E09 a pHe 6.0, entonces la proporción de protección a pHe 6.0 sería significativamente mayor que la proporción de protección a pHe 7.4. El mecanismo detrás de la activación independiente de NQO1 de E09 no está claro aunque es bien conocido el hecho de que la reactividad de las estructuras de anillo de aziridina es mejorada por protonación resultando en un anillo abierto al ión aziridinio que es una especie potente alquilante (Mossoba *et al*, 1985, Gutierrez, 1989). Alternativamente, E09 es un sustrato para otras reductasas de un electrón (Maliepaard *et al*, 1995, Saunders *et al*, 2000) y estudios posteriores diseñados para evaluar si el metabolismo de E09 por estas enzimas es dependiente de pH necesita determinarse. La potencia de E09 puede ser mejorada reduciendo el pH por debajo de 6.0 (Phillips *et al*, 1992) pero es improbable que estas condiciones proporcionen beneficios clínicos significativos ya que el E09 llega a ser progresivamente más inestable cuando el pH es reducido a 5.5 (t<sub>1/2</sub> = 37 min). Desde un punto de vista farmacológico, la administración de E09 en un vehículo a pH 6.0 podría aparecer deseable. No sólo daría esto lugar a una mejora significativa de la actividad de E09 sino que también la estabilidad de E09 sería suficiente (t<sub>1/2</sub> = 2.5 h) para mantener los parámetros de exposición del medicamento en un nivel terapéutico.

Respecto a la actividad de E09 contra los modelos de cultivo tridimensionales *in vitro*, este estudio ha demostrado que reduciendo el pHe a 6.0 mejora la potencia de E09 contra los esferoides multicélulas aunque la magnitud de este efecto sea reducida comparada con los cultivos monocapas (figura 4). No se conoce si o no la reducción en el pHe resulta en una mayor muerte celular en todo el esferoide o si está confinada a la superficie del esferoide expuesta al medio. En comparación con MMC, estudios previos utilizando histocultivos expuestos a MMC demostraron que no hay diferencia en la toxicidad existente entre condiciones de pHe fisiológicas o ácidas (Yen *et al*, 1996). El aumento dependiente de pH en toxicidad de E09 contra esferoides sugiere que la manipulación de pHe no sólo sería de utilidad en el tratamiento de tumores de vejiga multicapa sólida sino que puede ofrecer una ventaja sobre MMC. Debería sin embargo establecerse que las esferoides multicélulas son significativamente menos sensibles a E09 que las monocapas, presumiblemente por las pobres propiedades de penetración de E09 a través del tejido avascular (Phillips *et al*, 1998). E09 puede sin embargo destruir >90% de las células en esferoides (figura 4) sugiriendo que una mayor dosis al menos, la penetración de E09 es suficiente para erradicar células que residen a cierta distancia de la superficie del esferoide.

En conclusión, los resultados de este estudio ha demostrado que en una población de pacientes con tumores de vejiga en varias etapas y grados de enfermedad, existe una gran heterogeneidad respecto a la expresión de NQO1. La mayoría de los pacientes tienen tumores con altos niveles de NQO1 mientras un pequeño subgrupo de pacientes parece estar desprovisto de la actividad de NQO1. La naturaleza heterogénea de la actividad de NQO1 descrita aquí es coherente con otros muchos estudios en varios tipos de tumores (Malkinson *et al*, 1992, Smitkamp-Wilms *et al*, 1995, Siegel *et al*, 1998). Estos descubrimientos refuerzan la visión de que la “perfilación enzimática” de pacientes individuales podría ser valiosa antes de la intervención terapéutica con medicamentos bioreductivos (Workman, 1994). Este es a nuestro entender el primer estudio para caracterizar la actividad y la localización celular de NQO1 en tumores de vejiga y proporciona una fuerte evidencia para apoyar la evaluación de E09 contra tumores de vejiga superficiales y localmente invasivos. Este estudio ha demostrado claramente que bajo condiciones aeróbicas, E09 es más potente bajo condiciones ácidas (pH 6.0) que a pH fisiológico (pH 7.4). El mecanismo para esta potencia aumentada de E09 parece ser independiente de NQO1 y mientras esto no mejorará (o reducirá) la selectividad, podría ser beneficioso en términos de reducción de dosis eficaz terapéutica de E09. La reducción de dosis en conjunción con el hecho

de que una reducción en la potencia de E09 debido al incremento de pHe en el torrente sanguíneo sugiere que la toxicidad sistémica que surge de la administración intravesical de E09 será baja. Además, este estudio muestra que bajo condiciones fisiológicas, la actividad de E09 es mucho menor en tejidos con expresión “normal” de NQO1 comparada con tejidos de “alta” expresión de NQO1 (e.d, los tumores). Los resultados de este estudio proporcionan una fuerte evidencia en apoyo de la propuesta de que la administración intravesical de E09 podría tener actividad contra los tumores de vejiga.

## Referencias

- 10 **Butler J, Spanswick V J and Cummings J (1996)** The autooxidation of reduced forms of E09. *Free Rad Res* 25:141-148.
- 15 **Bradford M M (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- 20 **Choudry G A, Hamilton Stewart P A, Double J A, Krul M R L, Naylor B, Flannigan G M, Shah T K, Brun J E and Phillips R M (2001)**; A novel strategy for NQO1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase, EC 1.6.99.2) mediated therapy of bladder cancer based on the pharmacological properties of E09. *Br J Cancer* 85(8) 1137-1146.
- Connors T A (1996)** Bioreductive agents, hypoxic cells and therapy. *Eur J Cancer* 32A: 1833-1834.
- 25 **Cummings J, Spanswick V J, Tomaz M and Smyth J F (1998a)** Enzymology of MMC metabolic activation in tumor tissue. Implications for enzyme directed bioreductive drug development. *Biochem Pharmacol* 56: 405-414.
- Cummings J, Spanswick V J, Gardiner J, Ritchie A and Smyth, I F (1998b)** Pharmacological and biochemical determinants of the antitumour activity of the indoloquinone E09. *Biochem Pharmacol* 55: 253-260.
- 30 **Dirix L Y, Tonnesen F, Cassidy J, Epelbaum R, Huinink W W T, Pavlidis N, Sorio R, Gamucci T, Wolff I, Tevelde A, Lan J, and Verweij J (1996)** E09 phase II study in advanced breast, gastric, pancreatic and colorectal carcinoma by the early clinical studies group. *Eur J Cancer* 32A: 2019-2022.
- 35 **Fitzsimmons S A, Workman P, Grever M, Paull K, Camalier R and Lewis A D (1996)** Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute tumor cell line panel: Correlation with sensitivity to MMC and E09. *J Natl Cancer Inst* 88: 259-269
- 40 **Gutierrez P L (1989)** Mechanism of bioreductive alkylation. The example of diazaquinone (AZQ). *Free Radical Bio Med* 6: 405-445.
- Hendriks H R, Piazio P E, Berger D P, Kooistra K L, Bibby M C, Boven E, Dreef-Van Der Meulen H C, Henrar-REC, Fiebig H H, Double J A, Homstra H W, Pinedo H M, Workman P and Swartsmann G (1993)** E09: A novel bioreductive alkylating indoloquinone with preferential solid tumor activity and lack of bone marrow toxicity in preclinical models. *Eur J Cancer* 29A: 897-906.
- 45 **Herr H W (1987)** Intravesical therapy - a critical review. *Urology Clinics of N America* 14: 399-404.
- Hodnick W F and Sartorelli A C (1997)** Measurement of dicumarol sensitive NADPH: (menadione cytochrome c) oxidoreductase activity results in an artifactual assay of DT-diaphorase in cell sonicates. *Anal Biochem* 252: 165-168.
- 50 **Kennedy A S, Raleigh J A, Perez G M, Calkins D P, Thrall D E, Novotny D B, Varia M A (1997)** Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37: 897-905.
- 55 **Kuin A, Alders M, Lamfers M, Van Zuidam D J, Essers M, Beijnen J H and Smets L A (1999)** Potentiation of anticancer activity at low intratumoural pH induced by the mitochondrial inhibitor m-iodobenzylguanidine (MIBG) and its analogue benzylguanidine (BG). *Br J Cancer* 79: 793-801.
- 60 **Maffezzini M, Simonata A, Zanon M, Raber M and Carmigiani G (1996)** Up-front chemotherapy for low stage low grade recurrent bladder cancer. *J Urol* 155: 91-93.
- 65 **Malkinson A M, Siegel D, Forrest G L, Gazdar A F, Oie H K, Chan D C, Bunn P A, Mabry M, Dykes D J, Harrison S D and Ross D (1992)** Elevated NQO1 activity and messenger RNA content in human non small cell lung carcinoma - Relationship to the response of lung tumor xenografts to MMC. *Cancer Res* 52: 4752-4757.

## ES 2 341 922 T3

- Maliepaard M, Wolf A, Groot S E, De Mol N J and Janssen L H M (1995)** Indoloquinone EO9: DNA interstrand cross linking upon reduction by DT-diaphorase or xanthine oxidase. *Br J Cancer* 71: 836-839.
- Mossoba M M, AlizadehMand Gutierrez P L (1985)** Mechanism for the reductive activation of diazaquinone. *J Pharm Sci* 74: 1249-1254.
- Newling D (1990)** Intravesical therapy in the management of superficial transitional cell carcinoma of the bladder: the experience of the EORTC GU group. *Br J Cancer* 61: 497-499.
- Oosterlink W, Kurth K H, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R, and members of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group (1993)** A prospective European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomised trial comparing transurethral resection followed by a single instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T 1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 149: 749-752.
- Pan S S, Yu F and Hipsher C (1993)** Enzymatic and pH modulation of MMC induced DNA damage in MMC resistant HCT 116 human colon cancer cells. *Mol Pharmacol* 43: 870-877.
- Phillips R M, Hulbert P B, Bibby M C, Sleight N R, and Double J A (1992)** *In vitro* activity of the novel indoloquinone EO-9 and the influence of pH on cytotoxicity. *Br J Cancer* 65: 359-364.
- Phillips R M (1996)** Bioreductive activation of a series of analogues of 5-aziridinyl-3-hydroxymethyl-I-methyl-2-[1H indolo-4,7-dione]prop-(3-en-a-ol (E09) by human NQO1. *Biochem Pharmacol* 52: 1711-1718.
- Phillips R M, Loadman P M and Cronin B P (1998)** Evaluation of a novel *in vitro* assay for assessing drug penetration into avascular regions of tumors. *Br J Cancer* 77: 2112-2119.
- Phillips R M (1999)** Inhibition of DT-diaphorase (NAD(P)H:quinone oxidoreductase, EC 1.6.99.2) by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DNIXAA) and flavone-8-acetic acid (FAA): Implications for bioreductive drug development. *Biochem Pharmacol* 58: 303-310.
- Plumb J A and Workman P (1994)** Unusually marked hypoxic sensitisation to indoloquinone E09 and MMC in a human colon tumor cell line that lacks NQO1 activity. *Int J Cancer* 56: 134-139.
- Robertson N, Haigh A, Adams G E and Stratford U (1994)** Factors affecting sensitivity to E09 in rodent and human tumor cells *in vitro*: NQO1 activity and hypoxia. *Eur J Cancer* 30A: 1013-1019.
- Saunders M P, Jaffar M, Patterson A V, Nolan J, Naylor M A, Phillips R M, Harris A L and Stratford H (2000)** The relative importance of NADPH:cytochrome c (P450) reductase for determining the sensitivity of human tumor cells to the indoloquinone E09 and related analogues lacking functionality at the C-2 and C-3 positions. *Biochem Pharmacol* 59: 993-996.
- Schellens J H M, Planting A S T, Van Acker B A C, Loos W J, De Boer-Dennert M, Van Der Burg M E L, Koier I, Krediet R T, StoterGand Verweij J (1994)** Phase I and pharmacologic study of the novel indoloquinone bioreductive alkylating cytotoxic drug E09. *J Natl Cancer Inst* 86: 906-912.
- Schlager J J and Powis G (1988)** MMC is not metabolised by but is an inhibitor of human kidney NAD(P)H:(quinine acceptor) oxidoreductase. *Cancer Chemother Pharmacol* 22: 126-130.
- Siegel D, Gibson N W, Preusch P C and Ross D (1990)** Metabolism of MMC by NQO1: Role in MMC induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 50: 7483-7489.
- Siegel D, Beall H D, Kasai M, Gibson N W and Ross D (1993)** PH dependent inactivation of NQO1 by MMC and porfiromycin. *Mol Pharmacol* 44: 1128-1134.
- Siegel D, Franklin W A and Ross D (1998)** Immunohistochemical detection of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase in human lung and lung tumors. *Clin Cancer Res* 4: 2065-2070.
- Smitskamp-Wilms E, Peters G J, Pinedo H M, Van Arkotte J and Giaccone G (1994)** Chemosensitivity to the indoloquinone E09 is correlated with NQO1 activity and gene expression. *Biochem Pharmacol* 47: 1325-1332.
- Smitskamp-Wilms E, Giaccone G, Pinedo H M, Van Der Laan B F A M and Peters G J (1995)** NQO1 activity in normal and neoplastic human tissues: An indicator of sensitivity to bioreductive agents?. *Br J Cancer* 72: 917-921.
- Tolley D A, Parmar M K B, Grigor K M, Lallemand G and the Medical Research Council superficial bladder cancer working party (1996)** The effect of intravesical MMC on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: A further report with 7 years of followup. *J Urol* 155: 1233-1238.

**Traver R D, Horikoshi T, Dannenberg K D, Stadlbauer T H W, Dannenberg P V, Ross D and Gibson N W** (1992) NAD (P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: Characterisation of a mutation which modulates NQO1 activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 52: 797-802.

5 **Walton M I, Smith P J and Workman P** (1991) The role of NAD(P)H:quinone reductase (EC 1.6.99.2, NQO1) in the reductive bioactivation of the novel indoloquinone antitumour agent E09. *Cancer Commun* 3: 199-206.

10 **Workman P** (1994) Enzyme directed bioreductive drug development revisited: A commentary on recent progress and future prospects with emphasis on quinone anticancer drugs and quinone metabolising enzymes, particularly NQO1. *Oncol Res* 6: 461-475.

**Yen W C, Schmittgen T and Au J L** (1996) Different pH dependency of mitomycin C activity in monolayer and three dimensional cultures. *Pharmaceut Res* 13: 1887-1891.

15

TABLA 1

20

Informe histología de tumor y actividad NQO1 en muestras pareadas de tumor de vejiga y mucosa normal de vejiga				
Paciente nº	Histología de tumor	Actividad NQO1 Tumor (nmol/min/mg)	Actividad NQO1 Normal (nmol/min/mg)	Proporción de niveles NQO1 en tumor de tejido normal
1 f,s,l,p	G2 pTa	571.4	< 0.1	571.
2 m,s,r	G3 pT2	273.3	<0.1	273.
3 f,s,i	G1pTa	107.80	<0.1	107.
4 m,e,i	G3 pT2/3	73.36	<0.1	73.3
5 m,s,i	G3pT4 (C)	81.30	4.10	19.8
6 <sup>h</sup>	G2PT1	309.50	25.20	12.1
7 m,n,r,o	G3 pT2	10.00	<0.1	10.0
8 f n,i	G3pT2	9.80	<0.1	9.80
9 m,n,i	G2 pT2	4.40	<0.1	4.40

55

60

65

ES 2 341 922 T3

10 m,s,c	G3 pT2	34.01	8.50	4.00
11 <sup>m,s</sup>	G 1 pTa	69.76	22.20	3.14
12 <sup>.,n</sup>	G1pTa	42.16	15.30	2.73
13 m,n,i	G3 pT2	179.6	72.12	2.49
14 m,e,i	G2/G3 T4 (C)	89.70	63.30	1.41
15 m,n,r	G3 pT2	0.40	<0.1	0.40
16 m,e,c,o	G3 PT3 (C)	21.60	61.70	0.35
17 f n,i	G2 PTI	58.40	190.90	0.30
18 m,e,o	G2 PTI	<0.1	<0.1	0
19 f n,i	G2 PT I.	<0.1	<0.1	0
20 m,e,c,r	G2 pT0	<0.1	<0.1	0

<sup>M</sup>Hombre, <sup>f</sup>Mujer, <sup>S</sup>fumador, <sup>I</sup>No fumador, <sup>e</sup>Exfumador, <sup>\*</sup>quimioterapia intravesical antes de la recogida de espécimen, <sup>r</sup>Radioterapia anterior a la recogida del espécimen, <sup>'</sup>Primera presentación, <sup>P</sup> Malignidad previa distinta de la vejiga, <sup>n</sup>Historial médico no disponible, <sup>o</sup> Exposición posible a carcinógeno ocupacional (e.d, trabajador de industria del tinte).  
(C) denota especímenes con cistectomía. En todos los casos, los niveles de proteína posteriores a la preparación de la fracción citosólica fueron mayores de 0.1 mg/ml.

TABLA 2

Relación entre actividad NQO1 y quimiosensibilidad a E09 y MMC bajo condiciones fisiológicas y pH ácido						
Línea celular	Medicamento		NQO1 (nmol/min/mg)	IC <sub>50</sub> pHe 7.4 (nM)	IC <sub>50</sub> pHe 6.0 (nM)	SR*
H460	E09		1652 ±142	60± 10	9.5± 2	6.31
HT-29	E09		688 ±52	120 ±53	29 ±10	4.13
T24/83	E09	-	285± 28	290 ±65	60 ±18	4.83
A2780	E09		159± 33	200 ±50	51 ±14	3.92
EJ138	E09		83 ±14	310± 95	39 ±7	7.94
RT112	E09		30± 3	1050 ±75	61 ±13	17.21
BE	E09		<0.1	5300 ±169	1300 ±75	4.07
H460	MMC		1652 ±142	900 ±200	220 ±130	4.50

ES 2 341 922 T3

HT-29	MMC		688 ±52	1050 ±2100	500 ±240	2.10
T24/83	MMC		285 ±58	2150 ±93	2100 ±800	1.02
A2780	MMC		159 ±33	2400 ±340	1400 ±250	1.14
EJ138	MMC		83 ±14	1600± 200	2000 500	1.67
RT112	MMC		30 ±3	3350 ±250	2000 ±500	1.67
BE	MMC		<0.1	7000 ±192	4400 ±215	1.59
<p>Todos los resultados presentados son la media de 3 experimentos independientes (valores de SD omitidos en interés de la presentación)                  *SR (proporción de selectividad) =IC50 a pH 7.4 / IC50 a pH 6.0</p>						

TABLA 3

Respuesta de células H460 a E09 en presencia o ausencia de FAA (2 mm) a valores de PHe de 7.4 y 6.0

Medicamento	pHe	IC50	SR*	PR**
E09	7.4	60.0 ±8.1		-
E09	6.0	9.5± 2.6	6.31	-
E09/FAA	7.4	837 ±45	-	13.95
E09/FAA	6.0	139 ±27	6.02	14.63

\*SR = Proporción de Selectividad definida como la razón de valores de IC50 a pHe = 7.4 dividido por IC50 a pHe =6.0  
 \*\*PR = Proporción de protección definida como la razón de valores IC50 para E09 más FAA dividida por valores de IC50 para E09 sola.  
 Todos los valores representan la media más/menos desviación estándar para tres experimentos independientes.

TABLA 4

E09 (Neoquina) 8mg/vial producto liofilizado						
Depósito	Ítem de Prueba	Tiempo (meses)				
		0	1	2	3	6
5°C	Contenido*	102.7 ±1.2	na	na	103.8 ±0.8	100.6 ±0.6
	Pureza**	99.9 ±0.0008	na	na	99.5 ±0.03	99.6 ±0.03
	Humedad residual***	6.0%	na	na	7.0%	6.3%
	pH después de la reconstitución****	9.5	na	na	na	9.4
25°C/60 %RH	Contenido	102.7 ±1.2	103.4 ±0.7	102.1 ±0.2	102.6 ±1.3	97.4 ±1.0
	Pureza	99.9 ±0.0008	99.9 ±0.05	99.9 ±0.01	99.2 ±0.07	98.7± 0.2
	Humedad residual	6.0%	na	na	5.9%	5.9%
	pH después de la reconstitución****	9.5	na	na	na	9.4
40°C/75 %RH	Contenido	102.7 ±1.2	102.3 ±1.1	100.4 ±1.3	101.3 ±0.2	86.4 ±2.0
	Pureza	99.9 ±0.008	99.8 ±0.01	99.7 ±0.04	98.4 ±0.07	97.5 ±0.2
	Humedad residual	6.0%	na	na	6.2%	6.3%
	pH después de la reconstitución****	9.5	na	na	na	9.5

\* contenido como % de contenido de etiqueta n=3  
 \*\* pureza como pureza cromatográfica n=3

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación anti-cáncer comprendiendo una solución tamponada comprendiendo:  
5-(1-azaridinil)-3-(hidroximetil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-1-metil-1H-indol-4,7-diona (E09) y un vehículo de formulación que comprende tert-butanol/agua.
- 10 2. Una formulación anti-cáncer según la reivindicación 1 donde la solución tamponada tiene un pH entre 9 y 9.5.
3. Una formulación anti-cáncer según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende un agente de carga.
- 15 4. Una formulación anti-cáncer según la reivindicación 3 donde el agente de carga es lactosa.
5. Una formulación anti-cáncer según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una composición de recubrimiento.
- 20 6. Una formulación anti-cáncer según la reivindicación 5 donde la composición de recubrimiento es seleccionada de propilén glicol, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidrocloreuro quitosan, lectina y policarbofil.
7. Una formulación anti-cáncer de acuerdo a la reivindicación 1 donde el vehículo de formulación comprende 40% tert-butanol/agua.
- 25 8. Un método de preparación de una formulación comprendiendo 5-(1-azaridinil)-3(hidroximetil)-2-[(E)-3-hidroxi-prop-1-enil]-1-metil-1H-indol-4,7-diona (E09), cuyo método comprende preparar de una formulación como se definió en la reivindicación 1, y liofilizar la formulación para dar un liofilizado.
- 30 9. Un método según la reivindicación 8, que además comprende el paso de reconstituir el liofilizado en un vehículo de reconstitución.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

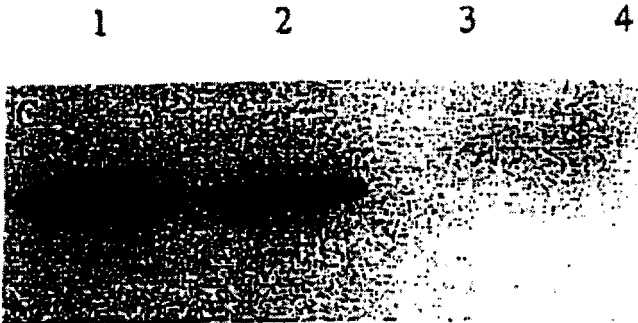
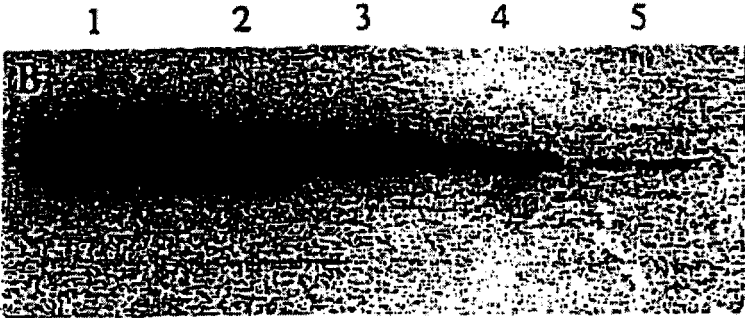
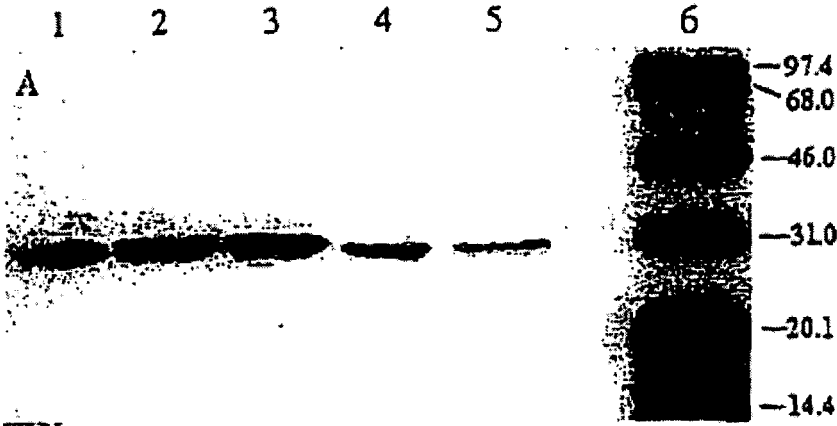


FIG 1

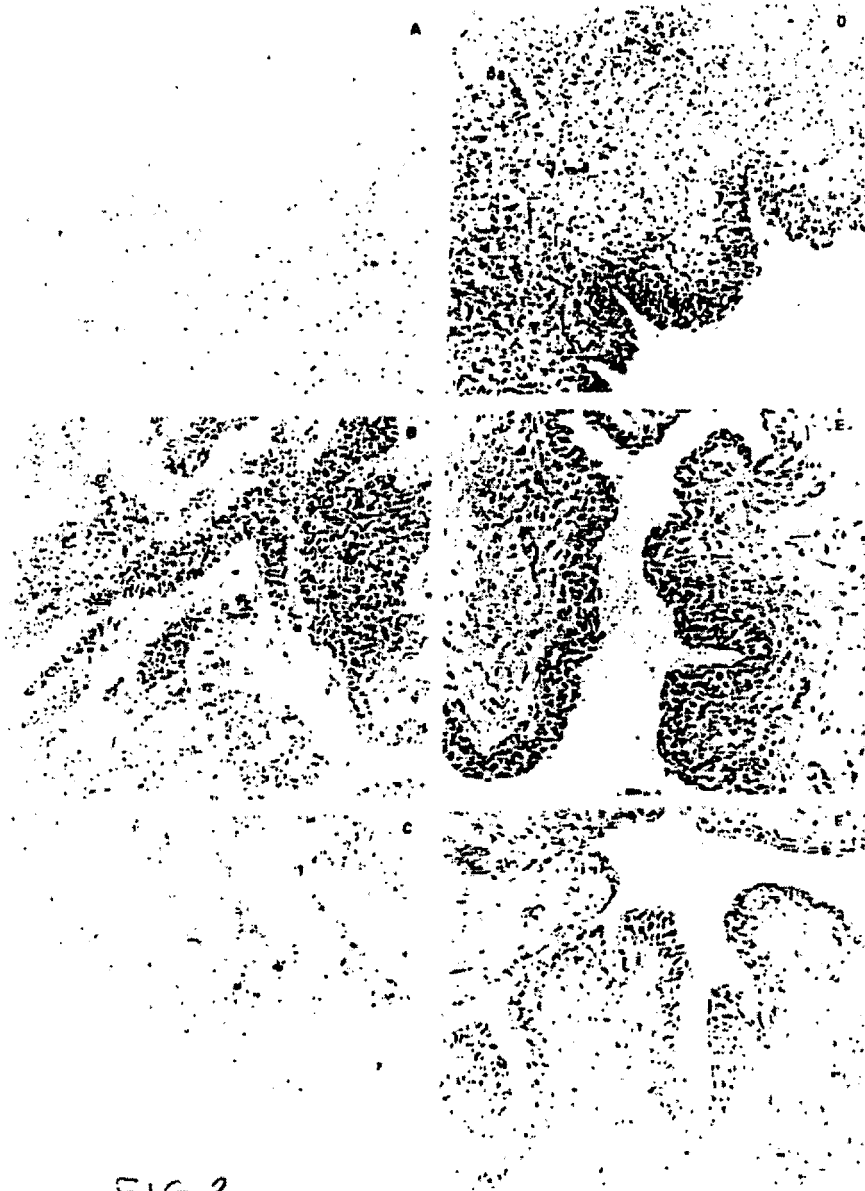


FIG. 2

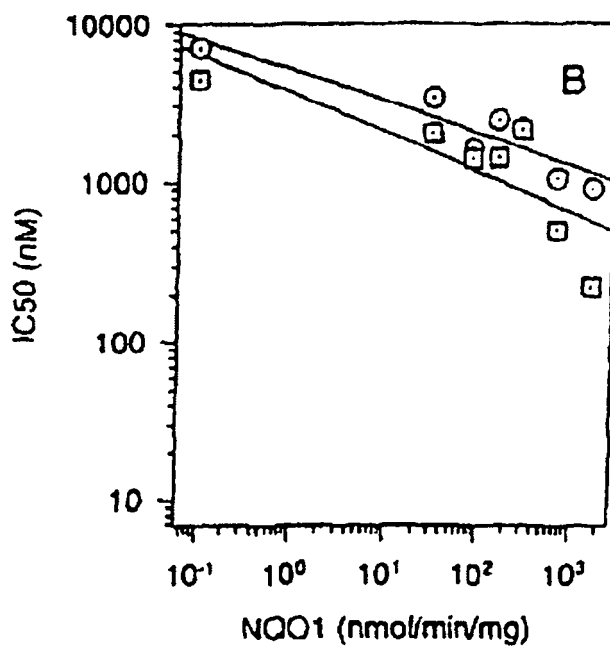
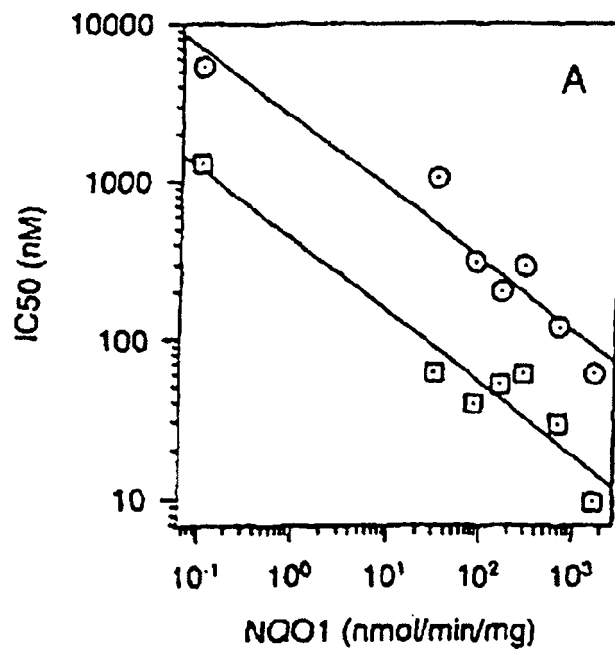


FIG. 3

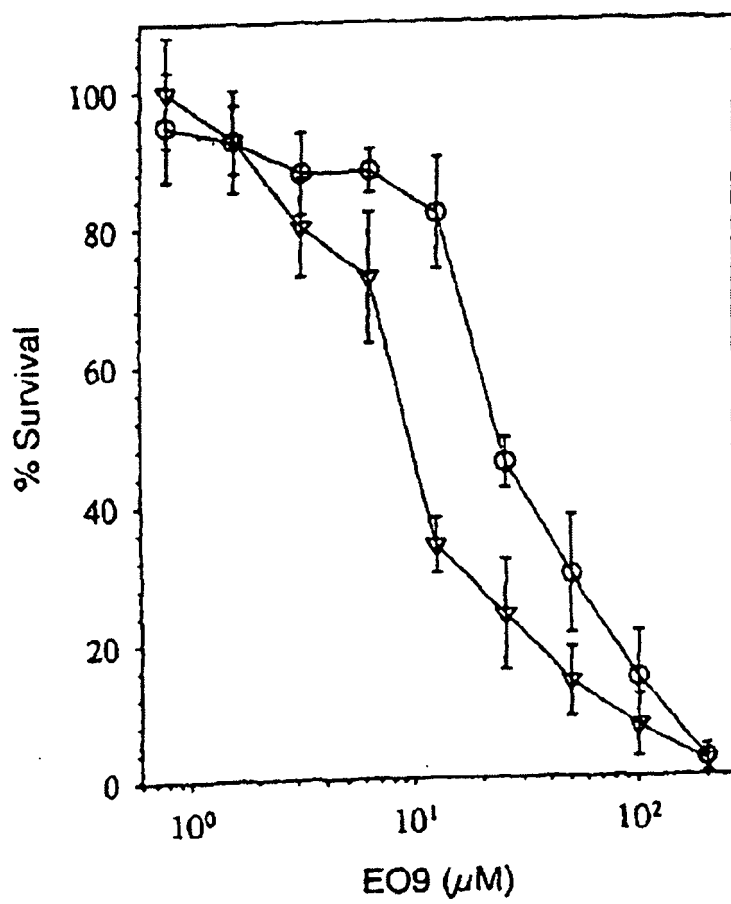


FIG. 4