



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1189637 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 45/06 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.05.17**

(30) Prioridade(s): **1999.05.17 NL 1012066**
1999.06.30 NL 1012481

(43) Data de publicação do pedido: **2002.03.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.24**
001/2007

(73) Titular(es):

CANCER RESEARCH VENTURES LIMITED
5 ALFRED PLACE LONDON NW1 4JL

GB

(72) Inventor(es):

JOHANNES, HENRICUS, MATTHIAS SCHELLENS
ALFRED, HERMANUS SCHINKEL

NL

NL

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA MELHORAR A BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS ORALMENTE**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÕES PARA MELHORAR A BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS ORALMENTE"

Um método para aumentar a exposição sistémica de células seleccionadas de células tumorais e células normais a um composto farmacologicamente activo administrado oralmente, em que um biomelhorador compreendendo um inibidor de transporte de fármaco mediado e/ou relacionado com BCRP é administrado oralmente concomitantemente com o referido composto farmacologicamente activo administrado oralmente, método em que o inibidor é administrado simultaneamente com o composto farmacêutico.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES PARA MELHORAR A BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS ORALMENTE"

Sumário da invenção

A invenção em questão é direccionada a um medicamento contendo GF120918 para melhorar a biodisponibilidade de derivados de Camptotecina administrados oralmente. A invenção abrange igualmente a aplicação do biomelhorador GF 120918 em composições farmacêuticas para distribuição oral de fármacos, proporcionando assim novas e melhoradas composições farmacêuticas. Neste pedido de patente, "biodisponibilidade" é utilizado indiscriminadamente com o termo "exposição sistémica", *i. e.*, a biodisponibilidade de um fármaco é expressa como a exposição sistémica de uma célula a fármacos.

Antecedentes da invenção

A biodisponibilidade de fármacos é um problema complexo. Durante muito tempo concentraram-se esforços nos processos que ocorriam no fígado ao se abordar o problema da biodisponibilidade de fármacos. Todo o sangue do aparelho gastrointestinal passa pelo fígado antes de ir a qualquer outro lugar no corpo. Deste modo, pensou-se que o efeito de primeira passagem no fígado era de grande influência na biodisponibilidade. Certamente pensou-se que era de maior

influência que qualquer mecanismo exercido pelo intestino. Pensou-se que era este o caso em virtude, por exemplo, da muito mais baixa presença de citocromo P450 no intestino relativamente ao fígado. Tinha-se a certeza que o citocromo P450 catalisava a biotransformação de fase I, *i. e.*, o processo envolvido na remoção de fármacos do corpo. Na fase II, a etapa subsequente do processo de remoção, é adicionado um grupo hidrófilo para aumentar a solubilidade e subseqüentemente acelerar, deste modo, a eliminação através da bÍlis ou rins.

Tradicionalmente, foram assim concentrados esforços no aumento da solubilidade e permeabilidade de membrana ao abordar o problema de biodisponibilidade de fármacos. Muito particularmente, abordagens associadas ao metabolismo foram concentradas no processo de biotransformação no fígado. O problema destas abordagens foram, no entanto, os amplos efeitos no metabolismo do fígado em geral e, portanto, amplos efeitos sistémicos não específicos e, deste modo, muitas vezes indesejáveis.

Todavia, recentemente, foi sugerido que a absorção através dos epitélios intestinais afecta igualmente a biodisponibilidade de fármacos. A membrana do enterócito contém numerosas proteínas transportadoras que conduzem nutrientes do lúmen do intestino para dentro dos enterócitos. O transporte activo ou passivo através da membrana é responsável pela passagem de muitas moléculas através da membrana para dentro do citoplasma. Os nutrientes, e também fármacos, passam subseqüentemente através dos enterócitos para dentro da rede de capilares e prosseguem para o sistema circulatório e o fígado.

Todavia, o intestino também pode remover compostos do

citoplasma de enterócitos e transportar estes compostos de volta ao lúmen. Este é, provavelmente, um mecanismo que evoluiu para proteger contra compostos potencialmente prejudiciais que entram no corpo pela via oral. Seguindo esta linha de raciocínio, o documento US 5567592 (equivalente ao documento WO 95/20980) sugere que dois mecanismos relacionados com o intestino poderiam ser inibidos para aumentar o fluxo global de fármaco do intestino. Por um lado, sugere-se um inibidor de citocromo P450, em particular, inibidores do citocromo P 450 3A (CYP3A) e, por outro lado, sugere-se a utilização de um inibidor de glicoproteína-P (P-gp) ou uma combinação das duas categorias de inibidores. Vale a pena notar que inibidores de P-gp e CYP3A estão extensivamente divulgados na técnica anterior. Além disso, inibidores de CYP3A são geralmente compostos hidrofóbicos que conseguem atravessar membranas celulares sem a necessidade de proteínas transportadoras.

A actividade de contra transporte da glicoproteína-P no intestino de um mamífero pode ser inibida com a intenção de aumentar a biodisponibilidade de fármaco em virtude do facto que o transporte global de fármacos através da camada de enterócito será melhorado. A glicoproteína-P localiza-se *inter alia* no intestino delgado e cólon no lado luminal de células epiteliais e transporta toxinas alimentares de volta ao lúmen e ajuda, deste modo, a impedir as toxinas de serem absorvidas para a circulação porta-hepática.

Todavia, o documento US 5567592 não ilustra ou apresenta um exemplo específico de um inibidor de P-gp. Nem proporciona qualquer informação sobre o êxito do método escolhido. O documento apresenta meramente um aumento na biodisponibilidade de ciclosporina causado por co-administração de cetoconazole. O

cetoconazole é um inibidor do citocromo P450 3A.

Um documento posterior (*The Lancet*, Vol. 352. 25 de Julho de 1998) descreve de que modo a co-administração de ciclosporina possibilita a terapia oral com paclitaxel em doentes. Normalmente, paclitaxel introduzido oralmente é pouco biodisponível em virtude da sua afinidade extremamente elevada para o transportador multifármaco glicoproteína-P que está presente em abundância no aparelho gastrointestinal (*Trends Genet.* 1997; 13:217-22, *Cell* 1994; 77: 491-502). Estudos em murganhos com inactivação génicas *mdrla* (-/-) sem P-gp revelaram uma absorção aumentada de paclitaxel (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 4:2031-35). Subsequentemente, foi deste modo descrito (*British Journal of Cancer* 1997; 76: 1181-1183) de que modo foi o paclitaxel introduzido oralmente em murganhos de tipo selvagem juntamente com o bloqueador de P-gp, SDZ PSC 833, ou o bloqueador de P-gp, ciclosporina, (*Clinical Cancer Research* 1998; 4: 2293-2297) resultando numa exposição sistémica ao paclitaxel aumentada dez vezes. Foram subsequentemente efectuados testes de comprovação do conceito em doentes (*The Lancet*, Vol. 352, 25 de Jul. de 1998) e confirmaram os resultados. A co-administração de paclitaxel com ciclosporina aumentou a absorção de paclitaxel oral para concentrações plasmáticas terapêuticas.

O documento WO 99/12570 divulga a combinação de paclitaxel com 9,10-di-hidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetra-hidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil]fenil]-4-acridinacarboxamida, GF120918. GF120918 é descrito no documento WO 99/12570 como um inibidor de P-gp. A preparação específica de GF120918 é descrita no documento WO 92/12132.

A P-gp é conhecida pela sua associação ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos de células tumorais. Uma quantidade de outras proteínas transportadoras foi igualmente associada à resistência a múltiplos fármacos (MDR) tal como a MRP (proteína associada a resistência a múltiplos fármacos) e possivelmente a MVP (proteína vault principal). Um sistema alternativo conduzindo igualmente a MDR é a interferência de alguns fármacos na capacidade da célula entrar em apoptose, por exemplo, células geneticamente deficientes em p53 ou células que sobreexpressam bclxL. Tanto MRP como P-gp pertencem ao grupo de proteínas classificadas como proteínas ABC. Proteínas ABC funcionam na qualidade de serem proteínas de ligação ao ATP. O fenómeno de resistência a múltiplos fármacos consiste na exibição de resistência de células tumorais a um grande número de agentes antineoplásicos não relacionados estruturalmente. Estes agentes incluem antraciclinas, alcalóides da vinca, taxol e epipodofilotoxinas. O *Journal of Clinical Oncology*, Vol 16, No 7, 1998, páginas 2557 a 2567, cataloga agentes quimioterapêuticos orais que são substratos de P-gp. A hidrólise de ATP na face citoplasmática de P-gp é requerida para transporte de compostos hidrofóbicos a partir de uma célula tumoral. A adição de verapamilo, diltiazem, quinina, trifluoperazina ou ciclosporina parece reverter potencialmente MDR associada a P-gp.

Deveria ser notado que apesar do extenso conhecimento destes mecanismos de MDR em sistemas *in vitro* em muitos tumores, é ainda pouco claro que mecanismos contribuem mais para a resistência a múltiplos fármacos no cenário clínico. É bem possível que outros mecanismos de MDR não identificados ou pouco compreendidos acabarão por ser, pelo menos, tão importantes como os mecanismos de MDR acima definidos.

Neste aspecto aponta-se para uma nova proteína que foi descoberta. A proteína é denominada Proteína de Resistência ao Cancro da Mama ou BCRP. É igualmente conhecida como MXR ou ABCP. Uma quantidade de publicações recentes ilustraram que esta proteína é igualmente uma proteína relacionada com a resistência a fármacos. Uma quantidade de tais divulgações é proporcionada na *Proceedings of the American Association for Cancer Research* volume 40. Março de 1999. e. g. Rocchi *et al.* Resumo 2090, Zhan *et al.* Resumo 2091, Ross *et al.* Resumo 2092, Rabindran *et al.* Resumo 2093, Litman *et al.* Resumo 4413. Schlegel *et al.* Resumo 4415, Rohde *et al.* Resumo 4417 e Rabindran *et al.*, *Cancer Research* 1998; 58: 5850-5858.

Foi determinada a sequência de aminoácidos de BCRP e o gene foi isolado e sequenciado (Doyle *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1998; Vol 95; 15665-15670 e documento WO 99/40110). Determinou-se ser uma proteína transportadora ABC. A proteína P-gp é igualmente uma proteína ABC, mas difere significativamente da BCRP. Isto é claramente ilustrado pelos dados de sequência e também pelo facto que a presença de verapamilo (um inibidor de P-gp) não impediu a resistência a fármacos para doxorubicina em células que sobreexpressam BCRP. A resistência a doxorubicina foi subsequentemente atribuída à sobreexpressão desta proteína. Deste modo, células que exibem resistência a doxorubicina podem possuir quer mecanismos de transporte P-gp e/ou BCRP. Também por outro lado, células que sobreexpressam P-gp exibem resistência a paclitaxel e vincristina. Nenhuma resistência a estes compostos está contudo presente quando o mecanismo P-gp está inactivo e o mecanismo BCRP está activo. Deste modo, existem claramente dois sistemas diferentes de resistência a fármacos com proteínas diferentes que apresentam especificidades diferentes a fármacos.

Rabindran *et al.* (*Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*; 40: resumo 2093 e *Cancer. res.* 1998; 58: 5850-5858) divulgam que a micotoxina fumitremorgina C (FTC) reverte a MDR não mediada por P-gp, não mediada por MRP *in vitro* em células seleccionadas por mitoxantrona derivadas de uma linha celular de carcinoma do cólon humano. Verificou-se que FTC não reverteu MDR em células que sobreexpressam P-gp ou MRP. Foi, por conseguinte, sugerido que esta reversão de MDR não P-gp, não mediada por MRP envolvia uma proteína transportadora, possivelmente BCRP, possuindo especificidades de substrato substancialmente diferentes daquelas de P-gp e MRP. Uma tal sugestão pode apenas ser considerada especulativa em consideração da complexidade dos problemas como é ilustrado na página 5857 deste artigo, segundo parágrafo, onde é afirmado que "o mecanismo pelo qual a FCT reverte a resistência a fármacos é desconhecido". Este artigo é ainda omissivo em relação a qualquer ligação entre BCRP e células não tumorais. Adicionalmente, não são proporcionados dados *in vivo*.

Hazlehurst *et al.* (*Cancer. Res.* 1999; 59: 1021-1027) divulgam que a níveis baixos de MDR a FTC reverte MDR *in vitro* em células seleccionadas por mitoxantrona derivadas da linha celular 8226 de mieloma humano negativa para P-gp. Esta reversão foi atribuída a BCRP. Todavia, a níveis mais elevados de MDR vários outros mecanismos de resistência a fármacos podem estar envolvidos incluindo fenómenos de não transporte como demonstrado por níveis e actividade reduzidos de topoisomerase II. Permanece, por conseguinte, incerto se a reversão pode de facto ser atribuída especificamente a BCRP e é certamente duvidoso no caso de níveis mais elevados de MDR serem então testados. Em relação a esta questão vale a pena notar que aumentando o grau de resistência a mitoxantrona na linha celular

de mieloma humano 8226/MR20 de 10 para 37 vezes não reduziu adicionalmente a concentração intracelular de fármaco. Adicionalmente, não existe sugestão ou explicação de BCRP em relação a células não tumorais. Além disso, não são proporcionados dados *in vivo*.

Consequentemente, a técnica anterior refere-se apenas a MDR em células tumorais e é omissa acerca do transporte de fármacos em células normais. Adicionalmente, existe muita especulação acerca dos mecanismos envolvidos em MDR. Além disso, os estudos são limitados a sistemas *in vitro*. Formas de administração de fármacos, em particular administração oral de fármacos, em relação a transporte de fármacos em células normais, não são tratadas.

O documento WO 99/40110 (data de prioridade de 5 de Fevereiro de 1998, publicado a 12 Agosto de 1999; o documento WO 99/40110 é um pedido de patente não pré-publicado e, por conseguinte, apenas pertinente como novidade) divulga BCRP que é sobreexpressa em linhas celulares de carcinoma da mama, inibidores de BCRP, tais como imunoglobulinas (e. g., anticorpos) e não imuno-globulinas (e. g., compostos orgânicos tais como FTC). O exemplo 14 demonstra o efeito benéfico de FCT na concentração intracelular de BBR 3390 em células MCF-7 (uma linha celular de carcinoma da mama humano). Não há nenhuma divulgação da administração oral de inibidores de BCRP juntamente com compostos farmacêuticos para melhorar a biodisponibilidade da última. Não há nenhuma ligação mencionada entre tecido normal, *i. e.*, tecido saudável, e BCRP. Adicionalmente, apenas são proporcionados dados *in vitro* para o efeito de FCT nas concentrações inter- e intracelulares de BBR 3390 em células MCF-7.

Apesar da falta de dados respeitante a BCRP e ao mecanismo de transporte, decidiu-se investigar se poderia ser um alvo útil a abordar com a intenção de aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos. Foi seguida uma linha de raciocínio análoga àquela empregue para P-gp, contudo, sem qualquer conhecimento detalhado do mecanismo a ser inibido e as suas potenciais consequências para a célula ou, mais importante, o doente. Além disso, não existia nenhum conhecimento sobre se o efeito seria suficientemente elevado para apresentar qualquer efeito sobre a distribuição do fármaco. Tão-pouco havia qualquer conhecimento se a inibição de um tal sistema de transporte resultaria na activação de um outro sistema. Nem havia qualquer indicação se a inibição seria mais prejudicial que benéfica. Em virtude das grandes diferenças entre P-gp e BCRP e falta de conhecimento respeitante ao mecanismo de transporte, não existia nenhuma expectativa razoável de êxito que o sistema BCRP pudesse funcionar analogamente àquela de P-gp e que, assim, a sua inibição pudesse aumentar a cedência oral de fármacos sem potencialmente interromper gravemente os normais processos celulares e sendo, deste modo, potencialmente nocivo para o doente.

Descrição da invenção.

Utilizando o recentemente desenvolvido anticorpo monoclonal BXP-34 contra BCRP (Scheffer *et al.*, "BCRP is localized at the plasma membrane in mitoxantrone and topotecan resistant cell lines"; *Cancer Res.*, no prelo), demonstrou-se que a proteína BCRP é expressa no endotélio de virtualmente cada veia e capilar. Além disso, níveis elevados de proteína BCRP foram observados na placenta, sobretudo no sinciciotrofoblasto.

Verificou-se que BCRP também estava presente no fígado, intestino delgado e cólon. Estes resultados foram extremamente indicativos de que BCRP está envolvida na regulação da absorção de substratos de BCRP do aparelho gastrointestinal e pode possuir uma função para o feto. Verificou-se ainda que BCRP era expressa na barreira hematoencefálica e, por conseguinte, pensa-se que o papel protector de BCRP abrange igualmente o cérebro.

Estudos *in vitro* revelaram que células que sobreexpressam BCRP são resistentes a uma grande e variada quantidade de compostos. São exemplos destes, camptotecina e seus derivados, em especial topotecano, SN38 (um metabolito activo de CPT11, também conhecido como irinotecano), GG211 (GF147211, também conhecido como NX211), DX8951f, BNP1350, 9-aminocamfotecina, 9-nitrocamfotecina e mitoxantrona.

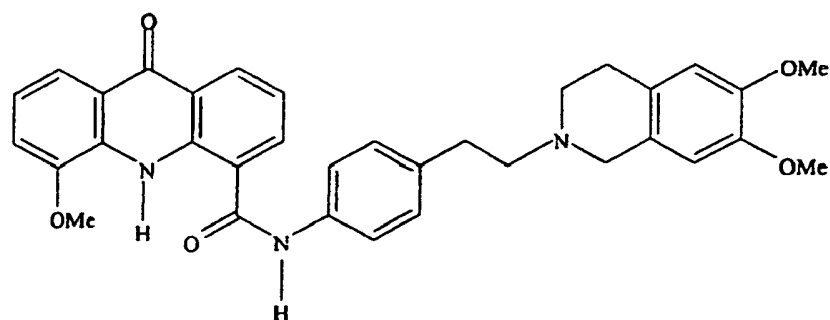
Testou-se subsequentemente uma quantidade de compostos seleccionados destes que também exibem baixa biodisponibilidade para verificar se poderia melhorar a sua biodisponibilidade após dosagem oral. Para avaliar isto combinou-se a sua dosagem oral em murganhos *mdr1a/1b* negativos para P-gp com inibidores de BCRP. Biodisponibilidade é definida como a quantidade total de fármaco disponível sistemicamente ao longo do tempo. O teste compara a quantidade de fármaco disponível sistemicamente quando administrado na presença e na ausência de um inibidor de BCRP. Obviamente, todas as variáveis devem ser mantidas idênticas tanto quanto possível, e. g., quantidade de fármaco doseado e a forma em que é doseado. A medição da quantidade sistémica pode ocorrer de qualquer modo conhecido para fluído corporal, e. g., sangue, soro, plasma ou tecido banhado por fluído sistémico, e. g., pele. A urina também pode ser utilizada para realização de testes a fármacos não metabolizados.

A invenção refere-se, por conseguinte, a um medicamento para aumentar a exposição sistémica de células seleccionadas a partir de células tumorais e células normais a um derivado de camptotecina farmacologicamente activo administrado oralmente, em que GF120918, um inibidor de transporte de fármacos mediado e/ou relacionado com BCRP, é administrado oralmente concomitantemente com o referido derivado de camptotecina administrado oralmente. De um modo preferido, o GF120918 é administrado simultaneamente com o derivado de camptotecina.

Os compostos a serem ensaiados para biodisponibilidade foram seleccionados a partir de uma gama de fármacos citostáticos bem conhecidos. Exemplos de compostos testados são topotecano, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina e irinotecano. Estes são, assim, exemplos de derivados de indolizino-quinolina (em especial camptotecina). É relativamente fácil para o especialista avaliar se um composto está sujeito a transporte mediado e/ou relacionado com BCRP. O especialista pode avaliar num sistema modelo se a absorção de um composto específico a ser testado é baixa quando o referido sistema modelo consiste numa célula ou organismo que sobreexpressa BCRP. Numerosos tipos de tumores como aqueles são geralmente conhecidos, e. g., tumores da mama (MCF-7/AdrVp), carcinoma do cólon (S1, HT29), carcinomas gástricos (EPG85-257), fibrossarcoma (EPF86-079) e mieloma (8226) origem (*Proceedings of the American Association for Cancer Research*, vol. 40, Março de 1999, e. g. Miyake *et al.* Resumo 2089 e Ross *et al.* Resumo 2092) bem como de linhas celulares derivadas de células tumorais tais como T8 e MX3 derivados da linha celular de cancro do ovário humano IGROV-1 tal como descrito por Maliepaard *et al.*, *Proceedings for the American Association for Cancer Research* vol. 40, Março de 1999, Resumo 4416, e *Cancer Res.* 1999; 59: a

ser publicado). Pode testar-se adicionalmente o fármaco num sistema conhecido por exibir um ou mais outros tipos de transportadores de fármacos para avaliar se o composto está sujeito a apenas transporte relacionado com BCRP ou múltiplas formas de transporte. No último caso será preferível utilizar um inibidor capaz de bloquear não apenas o transporte relacionado com BCRP mas também o outro sistema relevante e/ou dosear uma quantidade de inibidores específicos para cada sistema de transporte relevante. Alternativamente, também pode apenas avaliar-se se o composto a ser testado exibe ligação à proteína BCRP como indicativo para envolvimento de BCRP no seu transporte.

Existe uma quantidade de inibidores de BCRP que se sabe disponível. Estes compostos possuem especificidade variável para BCRP e também para outras proteínas tais como P-gp*. Testou-se o composto 9,10-di-hidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetra-hidro-6,7dimetoxi-2-isoquinolienil)etil]-fenil]-4-acridinacarboxamida (composto I; também conhecido como GF120918 e GG918). A estrutura molecular deste composto é apresentada em baixo.



9,10-di-hidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetra-hidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolionil)etil] fenil]-4-acridinacarboxamida

Este composto é conhecido por inibir também o transporte relacionado com P-gp em células tumorais que exibem sobreexpressão de P-gp *in vitro*.

O inibidor de BCRP destina-se a inibir, em particular, o fluxo de retorno de fármaco do sangue ou lúmen epitelial. Deste modo, o retorno de fármacos absorvidos para dentro do citoplasma de enterócitos de volta ao lúmen do intestino é inibido. Em virtude do facto que BCRP não está presente apenas no intestino mas também localizada em qualquer outra parte, o transporte de BCRP para estas outras localizações pode ser igualmente afectado. Todavia, o efeito será maior no intestino em virtude da dosagem oral do inibidor. De um modo preferido, o biomelhorador, *i. e.*, o inibidor de BCRP, ligar-se-á rapidamente a BCRP e inibirá enquanto o fármaco está a passar através do enterócito. O inibidor pode ser reversível ou irreversível. Se for reversível, o biomelhorador passará pelo fígado e será removido. Adicionalmente, a actividade protectora natural do sistema BCRP contra toxinas alimentares terá regressado algum tempo depois da dosagem oral ter ocorrido. O biomelhorador pode actuar como um inibidor competitivo, não competitivo, misto ou irreversível. Pode ser transportável ou não transportável. Pode ligar-se a ou interagir com a BCRP na superfície acessível citoplasmática, qualquer domínio de alcance membranar, e qualquer sítio de ligação de ATP. Pela interacção com BCRP é possível impedir a ligação de ATP.

A quantidade a ser doseada dependerá do fármaco a ser combinado com, o tipo de doença a ser combatida, a

aceitabilidade farmacológica da dosagem, o tamanho, género e idade do doente etc. Todos os factores geralmente conhecidos de interesse farmacológico e uma questão de rotina para o especialista determinar caso a caso. Estão disponíveis numerosos ensaios para determinar melhores regimes de dosagem. Adequadamente, necessita ser alcançado o máximo aumento em biodisponibilidade. Deste modo, é seleccionada de um modo preferido uma tal combinação de fármaco e inibidor. Uma vez que tenha sido comprovado que um determinado fármaco pode submeter-se a biodisponibilidade aumentada, torna-se então possível reduzir a dosagem requerida para ser administrada oralmente para alcançar o efeito medicinal desejado. Deste modo, a quantidade de fármaco a ser administrada pode ser reduzida. Torna-se, assim, possível administrar formas de dosagem mais baixas de fármacos conhecidos. Torna-se igualmente possível administrar oralmente fármacos que anteriormente não eram administrados oralmente em virtude de efeitos secundários extremos ou toxicidade aos elevados níveis requeridos para alcançar concentrações no soro razoáveis ou eficazes. É igualmente muito provável que um aumento em biodisponibilidade resultará numa variabilidade mais baixa da biodisponibilidade de compostos administrados oralmente permitindo, desse modo, a utilização de medicação de outro modo insegura. Adequadamente, a biodisponibilidade é aumentada em pelo menos 10%. De um modo preferido, é mesmo alcançada uma quantidade mais elevada, e. g., mais de 20% até mais de 30%. Naturalmente, o objectivo é um aumento tão elevado quanto possível.

Transporte mediado e/ou relacionado com BCRP deve ser interpretado como o transporte demonstrado de um fármaco numa célula negativa para BCRP em que ADNC de BCRP é expresso por meio de transfecção.

Bioensaios adequados para inactivar inibidores de BCRP são descritos no documento US 5567592, referências ali citadas e nas referências citadas na descrição da patente submetida. Os testes a serem utilizados serão imediatamente evidentes para o especialista. Ensaios de eversão intestinal, selecção de inibidor utilizando ensaios de crescimento celular, ensaios de vilosidades de membrana, ensaios de absorção de fármacos utilizando ensaios de fluorescência de ATP-ase.

A capacidade relativa de compostos para actuarem como biomelhoradores pode ser avaliada utilizando medições de transporte de fármacos *in vitro* e/ou *in vivo*. Estão disponíveis numerosos sistemas que podem ser utilizados como tal ou necessitam de alguma adaptação para serem específicos de BCRP quando assim desejado. Tais adaptações podem ser, todavia, consideradas pelo especialista na técnica. A actividade de transporte relacionada ou mediada por BCRP pode ser medida como quantidade de transporte dependente de ATP num sistema compreendendo BCRP e estar opcionalmente isento de um ou mais outros sistemas activos de transporte dependentes de ATP. Pode ser igualmente medido como hidrólise de ATP dependente de fármaco. A actividade pode ser medida utilizando eléctrodos ou corante, quimicamente sensível ou sensível a voltagem. Podem também ser considerados numerosos testes *in vivo*, análogos àqueles efectuados para a avaliação do sistema MDR relativamente a resistência e sensibilidade. A utilização de um animal de teste com inactivação génica, em que o gene BCRP foi inactivado é considerada.

Os testes com murganhos avaliaram a disponibilidade do fármaco em murganhos com dupla inactivação génica *mdrla/1b* na

presença e na ausência de um inibidor de BCRP. Os testes de biodisponibilidade podem também efectuar-se quer com murganhos com inactivação génica MRP e/ou P-gp permitindo assim a avaliação de se algum efeito observado causado pela presença do bioinibidor se deve apenas a BCRP, não se deve a P-gp e/ou MRP. Pode, deste modo, ser determinado se o fármaco específico transportado é transportado utilizando um ou mais sistemas de transporte. O fármaco a ser transportado pode ser proporcionado com um marcador detectável para avaliar onde está localizado e para poder quantificá-lo. Alguns fármacos podem ser detectados e quantificados no plasma sem utilização de um marcador detectável. A metodologia empregue é análoga àquela divulgada no artigo da *Lancet* acima discutido e é igualmente descrita em *Br. J. Cancer* 1997, 76: 1181-1183. Considera-se, assim, que a metodologia é incorporada por referência e é considerada permitida a um especialista na técnica.

Verificou-se um aumento de seis vezes na biodisponibilidade sistémica do fármaco testado quando doseado juntamente com um inibidor de BCRP em murganhos negativos para P-gp ao passo que em murganhos de tipo selvagem se verificou um aumento de nove vezes (Jonker *et al.*, submetido para publicação em *Nature Med.*). Verificou-se ainda efeitos similares com o análogo murídeo de BCRP, *i. e.*, Berpl, quando Bcrpl foi co-administrado oralmente com o inibidor de Bcpr1 GF120918 (Allen *et al.*, *Cancer Res.* 1999; 59: 4237-4241; De Bruin *et al.*, *Cancer Res.* 1999; 59: 4559-4563; Jonker *et al.*, submetido para publicação em *Nature Med.*) e Bcrpl para murganhos negativos para P-gp apresentaram um aumento de seis vezes ao passo que com murganhos de tipo selvagem.

Será compreendido pelo especialista na técnica que a

invenção se refere em especial à inibição de BCRP. O nível de MDR está dependente do nível a que BCRP é expressa. Níveis elevados de expressão de BCRP provocam níveis elevados de MDR. Na ausência de uma definição apropriada, um nível elevado de MDR é aqui definido como o grau de resistência a mitoxantrona na linha celular de mieloma humano 8226/MR20 de mais de 10 (cf. Hazlehurst *et al*, *Cancer Res.*. 1999; 59: 1021-1027 linha celular).

Além disso, será compreendido pelo especialista na técnica que a invenção se refere a células tumorais e células não tumorais, *i. e.*, que a invenção proporciona não apenas um medicamento para melhorar a biodisponibilidade de um fármaco administrado oralmente em células tumorais, mas em especial em tecido não tumoral, *e. g.*, tecido normal ou saudável.

A invenção abrange composições farmacêuticas numa forma de realização para administração oral, compreendendo a referida composição um derivado de camptotecina farmacêuticamente activo e GF120918. A composição farmacêutica de acordo com a invenção pode compreender o derivado de camptotecina em dosagens mais baixas que as normalmente administradas quando o derivado de camptotecina é administrado sozinho, *i. e.*, sem o GF120918. Para a utilização em biodisponibilidade crescente os dois componentes não necessitam de ser necessariamente administrados concomitantemente mas devem estar presentes no indivíduo a ser tratado em períodos de tempo sobrepostos. De um modo preferido, estão presentes concomitantemente no intestino. Qualquer das combinações acima divulgadas para as formas de realização do GF120918 e do derivado de camptotecina, *i. e.*, o fármaco a ser cedido numa combinação numa composição farmacêutica, está abrangida pela invenção. Está igualmente abrangida a utilização

de uma tal combinação na preparação de um medicamento para cedência oral melhorada do derivado de camptotecina por meio de inibição de sistema de transporte mediado ou relacionado com BCRP. É preferível apresentar uma combinação para assegurar presença máxima do GF120918 com o derivado de camptotecina a ser cedido. Prefere-se que a composição seja formulada de tal modo que o GF120918 é libertado no intestino juntamente com o derivado de camptotecina ou um pouco antes do derivado de camptotecina ser libertado. A composição farmacêutica pode compreender ainda um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição é de um modo preferido estéril. Além disso, é de um modo preferido organolepticamente aceitável.

Exemplo 1

Ensaio de citotoxicidade

A Citotoxicidade foi determinada utilizando o ensaio da sulforhodamina (SRB).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, 1500 células/placa. As células foram cultivadas durante 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂ na ausência de fármacos. Em seguida, numa diluição em série de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 0,05 nM foram adicionados fármacos, e as células foram cultivadas durante outros 5 dias a 37 °C e 5% de CO₂. Depois as células são fixadas numa placa, lavadas, e coradas com SRB. Depois de 20 minutos SRB não ligado é lavado utilizando ácido acético a 0,1 M. SRB que está ligado às células é dissolvido em tampão de Tris-HCl a 10 mM. Utilizando um leitor de placas de 96 poços é medida a absorvência a 540 nm. Para cada fármaco foi

determinado o valor de IC₅₀. Os resultados são a média de pelo menos 3 experiências. Os resultados estão representados na seguinte tabela.

A partir destes resultados fica claro que, sob condições normais, a linha celular T8 possui uma sensibilidade mais baixa para fármacos de topoisomerase I, os valores de IC₅₀ para T8 são mais elevados que para IGROV1. O factor de resistência (Rf), *i. e.*, o IC₅₀ para T8 dividido pelo valor de IC₅₀ para IGROV1, varia desde 11 para BNP1350 a 231 para SN-38.

Se a toxicidade for determinada na presença de 2 µM do inibidor de BCRP GF120918, os valores de IC₅₀ para a linha celular resistente a T8 exibem um forte decréscimo. As células tornam-se mais sensíveis para os fármacos por um factor de 1,4 a 24,4. É importante notar que GF120918 possui nenhum ou pouco efeito na sensibilidade da linha celular parental IGROVI, por isso o efeito para T8 pode ser imputado a inibição de BCRP por GF120918.

Os valores de Rf na presença de GF120918 são em média um factor 5 mais baixos comparados aos valores na ausência de GF120918. Pela adição de GF120918 a resistência de T8 para fármacos de topoisomerase I é revertida na sua maior parte.

Tabela: Citotoxicidade de fármacos de topoisomerase I em células resistentes a IGROV 1 parental e T8 +/- 2 µM GF120918

	<u>IGROV1</u>		<u>IGROV1 +</u>		razão -/+ GF120918
	IC ₅₀ (nM)		<u>GF120918</u> IC ₅₀ (nM)		
topotecano	8,93		9,23		0,97
CPT11	543,77		651,02		0,84
SN-38	1,82		1,10		1,66
GG211	0,64		0,87		0,74
DX8951f	0,10		0,17		0,60
BNP1350	0,44		0,84		0,53
<u>T8</u>					
<u>T8+ GF120918</u>					

	IC ₅₀ (nM)	Rf	IC ₅₀ (nM)	Rf	razão -/+ GF120918
topotecano	978,52	110	40,16	4,3	24,4
CPT11	33958,77	62	3037,67	4,7	11,2
SN-38	419,21	231	6,54	6,0	64,1
GG211	22,44	35	4,57	5,3	4,9
DX8951f	2,88	29	0,39	2,3	7,4
BNP1350	4,94	11	3,45	4,1	1,4

Exemplo 2

Determinação do efeito de GF120918 sobre a biodisponibilidade oral de Topotecano.

Preparação

Para excluir efeitos de inibição de glicoproteína-P por GF120918, foram utilizados murganhos *mdr1a/1b* (-/-) nesta

experiência. Em primeiro lugar, foi dado aos murganhos GF120918 (50 mg/kg) ou substância de controlo, 15 min. antes de administração de Topotecano. Subsequentemente, foi administrado Topotecano oralmente a uma dose de 1 mg/kg. Finalmente, foi recolhido sangue nos intervalos de tempo indicados. Todos os intervalos de tempo representam três murganhos.

Animais

Os animais foram alojados e manipulados de acordo com directrizes institucionais respeitando legislação dos Países Baixos. Os animais que foram utilizados em todas as experiências eram murganhos mdr 1a/1b (-/-) ou de tipo selvagem de um fundo genético 99% FVB, entre 9-14 semanas de idade. Todos os animais possuíam acesso livre a comida padrão (AM-II, Hope Farms; Woerden, Países Baixos) e água acidificada a um ciclo luz/escuridão de 12h/12h e temperatura ambiente constante de 22 °C.

Preparação de fármaco, administração e análise

GF120918 foi suspenso numa formulação de hdroxipropilmetilcelulose (10 g/L): Tween 80 (2% v/v): H₂O (0,5 : 1 : 98,5 v/v/v) para administração oral, a 5 mg.ml⁻¹. Os animais foram tratados com 50 mg.kg⁻¹ de GF120918 ou uma quantidade correspondente de veículo por sonda esofágica num volume de solução de fármaco de 10 µL por grama de peso corporal sob uma leve anestesia de Metofane (Mallinckrodt Veterinary, Mundelein, IL, EUA). Topotecano (preparado de fresco, em 5% de D-glucose) foi administrado oralmente tal que 5 µL da solução

apropriada foram administrados por grama de peso corporal. A dosagem foi $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal. Os animais foram sacrificados nos intervalos de tempo indicados por punção cardíaca ou sangramento axilar após anestesia com metofane e ao mesmo tempo foi recolhido sangue. Plasma heparinizado foi misturado com 3 volumes de metanol frio (-20°C). Níveis de Topotecano no plasma foram determinados por análise de HPLC como descrito por Rosing *et al.*, 1995, *J. Chromatography*, 668: 107-115, e estão representados na figura 1.

Conclusão

Co-administração de uma única dose oral de GF120918 resulta numa exposição sistémica profundamente aumentada a topotecano oral. O aumento na área debaixo da curva (AUC) é aproximadamente de 6 vezes (ver figura).

Exemplo 3

Neste exemplo são apresentados os primeiros resultados de um ensaio clínico. Três doentes receberam topotecano oralmente a doses de $1,0 \text{ mg.m}^{-2}$. Topotecano foi administrado com ou sem GF120918 (1000 mg). Para fins de ilustração, a concentração plasmática vs. tempo é apresentada para um doente na figura 2. Na figura 3 a média incluindo o desvio-padrão é apresentada para os três doentes. Estes resultados confirmam os resultados obtidos *in vitro* de acordo com o Exemplo 1.

Lisboa, 23 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Produto contendo GF120918 e um derivado de camptotecina farmacologicamente activo como uma preparação combinada para administração oral simultânea, separada ou sequencial no tratamento de tumores.
2. Produto de acordo com a reivindicação 1, que proporciona uma exposição sistemática aumentada de células tumorais ao referido derivado de camptotecina em comparação à administração do referido derivado de camptotecina sem GF120918.
3. Produto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que GF 120918 é para ser administrado simultaneamente com o derivado de camptotecina.
4. Produto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que GF 120918 e o derivado de camptotecina são para ser administrados separadamente.
5. Produto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o derivado de camptotecina é seleccionado do grupo consistindo de topotecano, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocarnptotecina, e CPT11 ou o seu metabolito SN38.
6. Produto de acordo com a reivindicação 5, em que o derivado de camptotecina é topotecano.
7. Utilização de GF 120918 e de um derivado de camptotecina

farmaceuticamente activo como ingredientes activos na preparação de uma composição farmacêutica para distribuição oral, proporcionando a referida composição farmacêutica uma exposição sistemática aumentada de células tumorais ao referido derivado de camptotecina em comparação à administração do referido derivado de camptotecina sem GF120918.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o derivado de camptotecina é seleccionado do grupo consistindo de topotecano, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, e CPT11 ou o seu metabolito SN38.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o derivado de camptotecina é topotecano.
10. Composição farmacêutica compreendendo GF 120918 e um derivado de camptotecina farmaceuticamente activo facultativamente juntamente com um veículo farmaceuticamente aceitável.
11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que o derivado de camptotecina é seleccionado do grupo consistindo de topotecano, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina, e CPT11 ou o seu metabolito SN38.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que o derivado de camptotecina é topotecano.

13. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 12, que compreende o derivado de camptotecina a uma dose mais baixa que aquela normalmente administrada quando o derivado de camptotecina é administrado sozinho.

Lisboa, 23 de Novembro de 2006

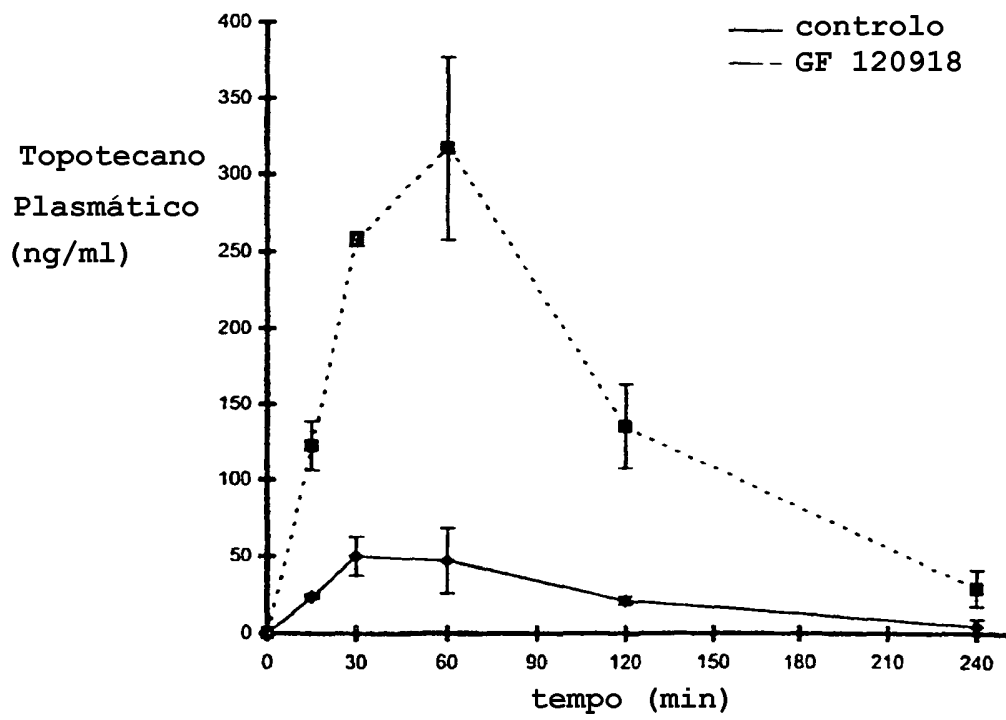
Fig 1

Fig 2

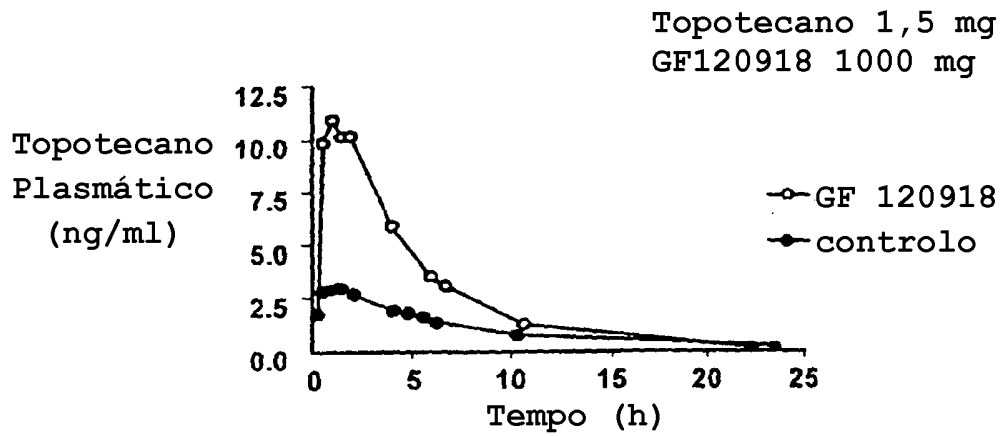


Fig 3

