



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 270 834**

(51) Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00931720 .7**

(86) Fecha de presentación : **17.05.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1189637**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **27.03.2002**

(54) Título: **Composiciones para mejorar la biodisponibilidad de fármacos administrados oralmente.**

(30) Prioridad: **17.05.1999 NL 1012066**
30.06.1999 NL 1012481

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **Cancer Research Ventures Limited**
5 Alfred Place
London NW1 4JL, GB

(72) Inventor/es:
Schellens, Johannes, Henricus, Matthias y
Schinkel, Alfred, Hermanus

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 para mejorar la biodisponibilidad de fármacos administrados oralmente.

5 **Compendio de la invención**

La invención está dirigida a un medicamento que contiene GF120918 para mejorar la biodisponibilidad de derivados de camptotecina administrados por vía oral. La invención también incluye la aplicación del biomejorador GF 120918 en las composiciones farmacéuticas para la administración oral de fármacos, proporcionando de esta forma composiciones farmacéuticas nuevas y mejoradas. En esta solicitud de patente, "biodisponibilidad" se puede intercambiar por el término "exposición sistémica" por ejemplo la biodisponibilidad de un fármaco se expresa como la exposición sistémica de una célula a los fármacos.

Antecedentes de la invención

15 La biodisponibilidad de los fármacos es un problema complejo. Durante mucho tiempo cuando se consideraba el problema de la biodisponibilidad de los fármacos los esfuerzos se focalizaron en los procesos que ocurren en el hígado. Toda la sangre del tracto gastrointestinal pasa al hígado antes de alcanzar cualquier otro lugar del organismo. Así se pensaba que, el efecto de primer paso del hígado tenía gran influencia en la biodisponibilidad. Ciertamente se pensaba que ejercía mayor influencia que cualquier mecanismo ejercido por el intestino. Esto se pensaba que era el caso debido por ejemplo a la menor presencia del citocromo P450 en el intestino comparado con el hígado. Se sabe de hecho que el citocromo P450 cataliza la biotransformación de la fase I, o sea el proceso que envuelve la eliminación de los fármacos del organismo. En la fase II, la etapa que sigue al proceso de eliminación, se añade un grupo hidrófilo para aumentar la solubilidad y así subsecuentemente aumenta la velocidad de eliminación a través de la bilis o de los riñones.

Tradicionalmente, los esfuerzos se han focalizado por tanto en aumentar la solubilidad y la permeabilidad de la membrana cuando se estudia el problema de la biodisponibilidad de los fármacos. Más particularmente, las aproximaciones asociadas con el metabolismo se han focalizado en el proceso de biotransformación del hígado. El problema con estas aproximaciones ha sido sin embargo los muchos efectos en el metabolismo del hígado en general y por tanto a menudo los muchos efectos sistémicos indeseables.

Recientemente sin embargo, se ha sugerido que la absorción a través del epitelio del intestino también afecta a la biodisponibilidad de los fármacos. La membrana enterocítica contiene numerosas proteínas de transporte que transportan nutrientes desde el lumen del intestino al interior de los enterocitos. El transporte activo o pasivo a través de la membrana es responsable del paso de muchas moléculas a través de la membrana al citoplasma. Los nutrientes, y también los fármacos, por consiguiente pasan a través de los enterocitos a la red capilar y continúan al sistema circulatorio y al hígado.

20 Sin embargo, el intestino puede también eliminar compuestos del citoplasma de los enterocitos y transportar estos compuestos de vuelta al lumen. Presumiblemente este es un mecanismo que ha evolucionado para proteger contra compuestos potencialmente dañinos que entran en el cuerpo vía la ruta oral. Siguiendo esta vía de razonamiento, el documento de patente de los Estados Unidos US 5.567.592 (equivalente al documento de patente internacional WO 95/20980) sugiere que dos mecanismos relacionados con el intestino podrían ser inhibidos a fin de aumentar el flujo neto del fármaco desde el intestino. Por un lado se sugiere un inhibidor del citocromo P450, en particular inhibidores del citocromo P 450 3A (CYP3A) y por otro lado se sugiere el uso de un inhibidor de la glicoproteína P (P-gp) o una combinación de estas dos categorías de inhibidores. Vale la pena resaltar que los inhibidores de P-gp y CYP3A están extensamente descritos en la técnica anterior. Además, los inhibidores de CYP3A son generalmente compuestos hidrófobos que pueden atravesar las membranas celulares sin necesidad de las proteínas de transporte.

50 La actividad de transporte reverso de la glicoproteína P en el intestino de un mamífero puede inhibirse con vista a un aumento de la biodisponibilidad del fármaco en virtud del hecho de que el transporte neto de fármacos a través de la membrana del enterocito se aumentará. La glicoproteína P está localizada entre otros lugares en el intestino delgado y el colon en la parte del lumen de las células epiteliales y transporta las toxinas de la dieta de vuelta al lumen y así ayuda a prevenir que las toxinas sean absorbidas en la circulación portal.

El documento de patente de los Estados Unidos US 5.567.592, sin embargo, no ilustra o da un ejemplo específico de un inhibidor de P-gp. Tampoco proporciona ninguna información sobre el éxito del método elegido. El documento muestra meramente un aumento en la biodisponibilidad de la ciclosporina causado por coadministración del ketoconazol. El ketoconazol es un inhibidor del citocromo P450 3A.

Un documento posterior (The Lancet, vol. 352. 25 de Julio 1998) describe como la coadministración de ciclosporina permite la terapia oral con paclitaxel en pacientes. Normalmente, paclitaxel introducido oralmente es poco biodisponible debido a la extraordinaria gran afinidad del mismo por el transportador de multifármaco glicoproteína-P que está presente abundantemente en el tracto gastrointestinal (Trends Genet. 1997; 13:217-22, Cell 1994; 77: 491-502). Los estudios en ratones knock out mdrla (-/-) que carecen de P-gp revelaron un aumento de la recaptación de paclitaxel (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997; 4:2031-35). Seguidamente, se describió así (British Journal of Cancer 1997; 76: 1181-1183) como el paclitaxel fue introducido oralmente en ratones tipo silvestre junto con el bloqueante de

P-gp SDZ PSC 833 o el bloqueante de P-gp ciclosporina (Clinical Cancer Research 1998; 4: 2293-2297) dando lugar a un aumento de la exposición sistémica a paclitaxel de diez veces. Se llevaron a cabo a continuación en pacientes las pruebas para la prueba del concepto (The Lancet, vol. 352, 25 de Julio, 1998) y se confirmaron los resultados. La coadministración de paclitaxel con ciclosporina aumentó la absorción del paclitaxel oral a concentraciones del plasma terapéuticas.

El documento de patente internacional WO 99/12570 describe la combinación de paclitaxel con 9,10-dihidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil]fenil]-4-acridinocarboxamida, GF 120918. GF120918 está descrito en el documento de patente internacional WO 99/12570 como un inhibidor de P-gp. La preparación específica de GF 120918 se describe en el documento de patente internacional WO 92/12132.

La P-gp es conocida por su asociación con el desarrollo de resistencia multifármaco de las células tumorales. Un número de otras proteínas de transporte se han asociado también con la resistencia multifármaco (MDR) tal como la MRP (proteína asociada a la resistencia multifármaco) y posiblemente MVP (mayor vault protein). Un sistema alternativo que conduce también a MDR es la interferencia de algunos fármacos con la habilidad de la célula para entrar en apoptosis por ejemplo células genéticamente deficientes en p53 o células que sobreexpresan bclxL. Ambas MRP y P-gp pertenecen al grupo de proteínas clasificadas como proteínas ABC. Las proteínas ABC funcionan por medio de su pertenencia a proteínas de unión con el ATP. El fenómeno de la resistencia multifármaco consiste en la existencia de células tumorales que exhiben resistencia a un gran número de agentes antineoplásicos no relacionados estructuralmente. Estos agentes incluyen antraciclinas, los alcaloides de la vinca, taxol y epipodofilotoxinas. The Journal of Clinical Oncology, vol 16, n° 7, 1998 páginas 2557 a 2567, tabula agentes quimioterapéuticos orales que son sustratos de P-gp. La hidrólisis de ATP en la cara citoplasmática de P-gp se requiere para el transporte de los compuestos hidrófobos desde una célula tumoral. La adición de verapamilo, diltiazem, quinina, trifluoperazina o ciclosporina parece revertir potencialmente la MDR asociada a P-gp.

Debería notarse que a pesar del extenso conocimiento de estos mecanismos de MDR en sistemas *in vitro* en muchos tumores, no está todavía claro qué mecanismos contribuyen más a la resistencia multifármaco en el uso clínico. Es bastante posible que otros mecanismos de MDR no identificados o mal comprendidos puedan ser al menos tan importantes como los mecanismos de MDR definidos anteriormente.

A este respecto señalamos a una nueva proteína que se ha descubierto. La proteína es llamada proteína de la resistencia del cáncer de mama o BCRP. Se conoce también como MXR o ABCP. Un número de publicaciones recientes han ilustrado que esta proteína es también una proteína relacionada con la resistencia a fármacos. Un número de tales descripciones se proporcionan en los Proceedings of the American Association for Cancer Research volumen 40, Marzo 1999, por ejemplo Rocchi *et al.* Abstract 2090, Zhan *et al.* Abstract 2091, Ross *et al.* Abstract 2092, Rabindran *et al.* Abstract 2093, Litman *et al.* Abstract 4413. Schlegel *et al.* Abstract 4415, Rohde *et al.* Abstract 4417 y Rabindran *et al.*, Cancer Research 1998; 58: 5850-5858.

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de BCRP y el gen se ha aislado y secuenciado (Doyle *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 1998; vol 95; 15665-15670 y el documento de patente internacional WO 99/40110). Se ha determinado que es una proteína de transporte ABC. La proteína P-gp es también una proteína ABC, pero difiere significativamente de BCRP. Esto se ilustra claramente por los datos de la secuencia y también por el hecho de que la presencia de verapamilo (un inhibidor de P-gp) no previno la resistencia a la doxorubicina en células que sobreexpresan BCRP. La resistencia a la doxorubicina fue subsecuentemente atribuida a la sobreexpresión de esta proteína. Así las células que exhiben resistencia a la doxorubicina pueden poseer mecanismos de transporte o de P-gp y/o de BCRP. También por otro lado las células que sobreexpresan P-gp exhiben resistencia al paclitaxel y la vincristina. Ninguna resistencia a estos compuestos sin embargo está presente cuando el mecanismo P-gp está inactivo y el mecanismo BCRP está activo. De esta manera hay claramente dos sistemas diferentes de resistencia de fármacos con diferentes proteínas que muestran diferentes especificidades a los fármacos.

Rabindran *et al.* (Proc. Am. Assoc. Cancer Res.;40: abstract 2093 y Cancer Res.1998; 58: 5850-5858) describen que la micotoxina fumitremorgin C (FTC) revierte *in vitro* MDR no mediada por P-gp, no mediada por MRP en células seleccionadas de mitoxantrona derivadas de una línea celular de carcinoma de colon humano. Se encontró que FTC no revirtió MDR en células que sobreexpresan P-gp o MRP. Se sugirió por tanto que esta reversión de MDR no mediada por P-gp, no mediada por MRP envuelve una proteína de transporte, posiblemente BCRP, que tiene especificidades de sustrato sustancialmente diferentes de aquellas de P-gp y MRP. Tal sugerencia puede meramente considerarse especulativa en vista de la complejidad de los temas como se ilustra en la página 5857 de este artículo, segundo párrafo en donde se establece que "el mecanismo por el que FTC revierte la resistencia del fármaco es desconocido". Este artículo además guarda silencio en relación a cualquier lazo entre BCRP y las células no tumorales. Además no se proporcionan datos *in vivo*.

Hazlehurst *et al.* (Cancer. Res. 1999; 59:1021-1027) describen que a bajos niveles de MDR FTC revierte *in vitro* MDR en células seleccionadas de mitoxantrona derivadas de la línea celular 8226 de mieloma humano P-gp negativo. Esta reversión se atribuyó a BCRP. Sin embargo, a mayores niveles de MDR varios otros mecanismos de resistencia a fármacos pueden estar envueltos que incluyen fenómenos no de transporte como se evidenció por la actividad y niveles reducidos de la topoisomerasa II. Permanece por tanto incierto si la reversión puede de hecho atribuirse específicamente a BCRP y ciertamente es incierto en el caso de niveles más altos de MDR que los que se probaron. Con relación a este tema vale la pena notar que el aumento del grado de resistencia a mitoxantrona en la línea celular de mieloma

8226/MR20 humano de 10 a 37 veces no redujo más allá la concentración intracelular del fármaco. Adicionalmente, no hay sugerencia o doctrina sobre BCRP en relación a las células no tumorales. Además no se proporcionan datos *in vivo*.

Consecuentemente, la técnica anterior solo se refiere a MDR en las células tumorales y guarda silencio acerca del transporte de fármacos en células normales. Adicionalmente, existe mucha especulación alrededor del mecanismo envuelto en MDR. Además, los estudios están limitados a sistemas *in vitro*. No se consideraron las formas de administración de los fármacos, en particular la administración oral de fármacos, en relación al transporte de fármacos en células normales.

El documento de patente internacional WO 99/40110 (fecha de prioridad 5 de Febrero de 1998, publicado el 12 de Agosto de 1999; el documento de patente internacional WO 99/40110 es una solicitud de patente no prepublicada y por tanto solo relevante por la novedad) describe BCRP que está sobreexpresada en líneas celulares de carcinoma de mama, inhibidores de BCRP tales como inmunoglobulinas (por ejemplo anticuerpos) y no inmunoglobulinas (por ejemplo compuestos orgánicos tales como FTC). El ejemplo 14 muestra el efecto beneficioso de FTC en la concentración intercelular de BBR 3390 en células MCF-7 (una línea celular de carcinoma de mama humano). No hay descripción sobre la administración oral de inhibidores de BCRP junto con compuestos farmacéuticos para aumentar la biodisponibilidad de los últimos. No hay ninguna conexión mencionada entre el tejido normal o sea el tejido sano, y BCRP. Adicionalmente, solamente se proporcionan los datos *in vitro* para el efecto de FTC sobre las concentraciones inter e intracelulares de BBR 3390 en células MCF-7.

No obstante la carencia de datos concernientes a BCRP y al mecanismo de transporte, se decidió investigar si podría ser una diana útil con vista a aumentar la biodisponibilidad oral de los fármacos. Se siguió una línea análoga de razonamiento a la empleada para P-gp, sin embargo, sin ningún conocimiento detallado del mecanismo para ser inhibido y las consecuencias potenciales del mismo para la célula o más importante el paciente. Además, no había conocimiento sobre si el efecto sería suficientemente alto para mostrar algún efecto sobre la distribución del fármaco. Tampoco había ningún conocimiento sobre si la inhibición de tal sistema de transporte resultaría en la activación de otro sistema. Tampoco había ninguna indicación sobre si la inhibición sería más dañina que beneficiosa. Debido a las grandes diferencias entre P-gp y BCRP y la carencia de conocimiento con relación al mecanismo de transporte, no había expectativas razonables de éxito de que el sistema BCRP pudiera funcionar análogamente al de P-gp y de esta forma que la inhibición del mismo pudiera aumentar la administración oral del fármaco sin potencialmente interrumpir seriamente los procesos celulares normales y así ser potencialmente perjudicial para el paciente.

Descripción de la invención

Utilizando el anticuerpo monoclonal BXP-34 recientemente desarrollado frente a BCRP (Scheffer *et al.*, "BCRP is localized at the plasma membrana in mitoxantrone and topotecan resistant cell lines"; Cancer Res., en prensa), se mostró que la proteína BCRP se expresa en el endotelio de virtualmente cada vena y capilar. Además, altos niveles de proteína BCRP se observaron en la placenta, principalmente en el sincitiotrofoblasto. Se encontró también que BCRP está presente en el hígado, intestino delgado y colon. Estos resultados fueron altamente indicativos de que BCRP está envuelta en la regulación de la recaptación de sustratos de BCRP del tracto gastrointestinal y puede tener una función en el feto. Se encontró además que BCRP está expresado en la barrera hematoencefálica y que el papel protector de BCRP se cree por tanto abarca también el cerebro.

Los estudios *in vitro* revelaron que las células que sobreexpresan BCRP son resistentes a un gran y variado número de compuestos. La camptotecina y sus derivados en particular el topotecan, SN38 (un metabolito activo de CPT11, también conocido como irinotecan), GG211 (GF147211, también conocido como NX211), DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina y mitoxantrona son ejemplos de los mismos.

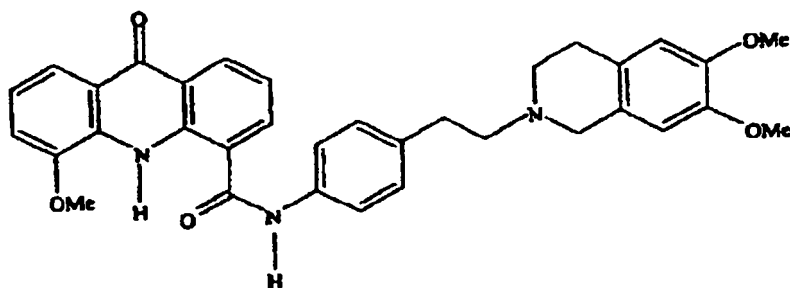
Nosotros probamos subsecuentemente un número de compuestos seleccionados de ellos que también exhiben baja biodisponibilidad por si podíamos aumentar su biodisponibilidad después de la dosificación oral. Para probar esto combinamos su dosificación oral en ratones *mdr1a/1b* P-gp negativos con inhibidores BCRP. La biodisponibilidad se define como la cantidad total de fármaco sistémicamente disponible en el tiempo. La prueba compara la cantidad de fármaco disponible sistémicamente cuando se administra en la presencia y ausencia de un inhibidor de BCRP. Naturalmente todas las variables deberían mantenerse idénticas tanto como sea posible por ejemplo la cantidad de fármaco dosificado y la forma en que se dosifica. La medida de la cantidad sistémica puede ocurrir en cualquier forma conocida para fluidos corporales por ejemplo sangre, suero, plasma o tejidos bañados por fluido sistémico por ejemplo la piel. La orina puede también usarse en la prueba de un fármaco no metabolizado.

La invención por tanto se refiere a un medicamento para aumentar la exposición sistémica de células seleccionadas de células tumorales y células normales a un derivado de camptotecina farmacéuticamente activo administrado por vía oral, en donde GF120918, un inhibidor de BCRP mediado y/o relacionado con el transporte de fármacos, se administra por vía oral concomitantemente con dicho derivado de camptotecina administrado por vía oral. Preferiblemente, el GF120918 se administra simultáneamente con el derivado de camptotecina.

Los compuestos para ser ensayados en cuanto a biodisponibilidad se seleccionaron de un rango de fármacos citostáticos bien conocidos. Ejemplos de los compuestos probados son topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina e irinotecan. Estos son así ejemplos de derivados de indolizinoquinolina (en

particular camptotecina). Es relativamente fácil para una persona con conocimiento de la técnica valorar si un compuesto está sujeto al transporte relacionado con y/o mediado por BCRP. La persona con conocimiento de la técnica puede valorar en un sistema de modelo si la recaptación de un compuesto específico que se está probando es baja cuando dicho sistema de modelo consiste en una célula o un organismo que sobreexpresa BCRP. Se conocen comúnmente numerosos tipos de tumor de este tipo por ejemplo tumores de mama (MCF-7/AdrVp), carcinoma de colon (S1, HT29), carcinoma gástrico (EPG85-257), fibrosarcoma (EPF86-079) y mieloma (8226) véase (Proceedings of the American Association for Cancer Research, vol. 40, Marzo 1999, por ejemplo Miyake *et al.* Abstract 2089 y Ross *et al* Abstract 2092) así como células de tumor derivadas de líneas celulares tales como T8 y MX3 derivadas de la línea celular del cáncer de ovario humano IGROV-1 tal como se ha descrito por Maliepaard *et al.*, Proceedings for the American Association for Cancer Research vol. 40, Marzo 1999, Abstract 4416, y Cancer Res. 1999; 59 en prensa). Uno puede adicionalmente probar el fármaco en un sistema conocido que muestra uno o más de otros tipos de transportes de fármacos para valorar si el compuesto está sujeto a solamente el transporte relacionado con BCRP o a múltiples formas de transporte. En el último caso será preferible o usar un inhibidor capaz de bloquear no solo el transporte relacionado con BCRP sino también el otro sistema relevante y/o dosificar un número de inhibidores específicos para cada sistema de transporte relevante. Alternativamente se puede también meramente valorar si el compuesto que se va a probar exhibe unión a la proteína BCRP que es indicativo de la participación de BCRP en el transporte del mismo.

Hay varios inhibidores de BCRP que se sabe que son obtenibles. Estos compuestos poseen especificidades varias al BCRP y también hacia otras proteínas tales como P-gp*. El compuesto 9,10-dihidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil]-fenil]-4-acridinocarboxamida (compuesto I: también conocido como GF120918 y GG918) se probó a este respecto. La estructura molecular de este compuesto se muestra a continuación.



9,10-dihidro-5-metoxi-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil]-fenil]-4-acridinocarboxamida

Se sabe que este compuesto inhibe también el transporte relacionado con P-gp en células tumorales que muestran sobreexpresión de P-gp *in vitro*.

El inhibidor de BCRP está destinado en particular a inhibir el flujo reverso de un fármaco desde la sangre o el lumen epitelial. De esta forma se inhibe el regreso de fármacos absorbido en el citoplasma de enterocitos al lumen del intestino. Debido al hecho de que el BCRP está presente no solo en el intestino sino también en otros muchos órganos, el transporte de BCRP en estos otros lugares puede estar también afectado. Sin embargo el efecto mayor será en el intestino debido a la dosis oral del inhibidor. Preferiblemente el biomejorador, o sea el inhibidor de BCRP, se unirá al BCRP rápidamente e inhibirá el BCRP mientras que el fármaco está pasando por el enterocito. El inhibidor puede ser reversible o irreversible. Si es reversible, el biomejorador pasará por el hígado y será eliminado. Además, la actividad protectora natural del sistema BCRP contra las toxinas de la dieta se recuperará algún tiempo después de la dosis oral. El biomejorador puede actuar como un inhibidor competitivo, no competitivo, mixto o irreversible. Puede ser transportable o no transportable. Puede unirse a o interaccionar con el BCRP en superficies citoplásmicas accesibles, cualquier dominio espacial de membrana, y cualquier lugar de unión del ATP. Por medio de la interacción con la BCRP es posible prevenir la unión del ATP.

La cantidad de la dosis dependerá del fármaco con el que se va a combinar, el tipo de enfermedad que se va a combatir, la aceptabilidad farmacológica de la dosis, el tamaño, género y edad del paciente etc. Todos ellos factores que se sabe corrientemente son de interés farmacológico y una cuestión rutinaria que la persona conocedora de la técnica determina caso por caso. Hay numerosas pruebas para determinar los mejores regímenes de dosificación. Adecuadamente, se necesita conseguir el aumento máximo en la biodisponibilidad. Así, se selecciona preferiblemente una combinación particular de fármaco e inhibidor. Una vez que se ha establecido que un fármaco particular puede experimentar mayor biodisponibilidad, es entonces posible reducir la dosis requerida en la administración oral para conseguir el efecto médico deseado. De esta forma puede reducirse la cantidad de fármaco que se administra. De esta forma es posible administrar dosis más bajas de fármacos conocidos. También es posible administrar oralmente fármacos que anteriormente no se administraban oralmente debido a efectos secundarios extremos o toxicidad a los

altos niveles requeridos para conseguir concentraciones séricas razonables o eficaces. Es también lo más probable que un aumento en la biodisponibilidad producirá una variabilidad más baja de la biodisponibilidad de compuestos administrados oralmente, de tal modo que permita el uso de medicamentos que de otra forma no son fiables. Ade-
 5 cuadamente, la biodisponibilidad se aumenta por lo menos un 10%. Preferiblemente se consigue una cantidad incluso mayor, esto es más del 20% o incluso más del 30%. Naturalmente el objetivo es un aumento tan alto como sea posible.

Debe entenderse que el transporte mediado por y/o relacionado con BCRP es el transporte demostrado de un fármaco en una célula BCRP negativa en la que se expresa cADN de BCRP por medio de la transfección.

10 El documento de patente de Estados Unidos US 5.567.592 describe bioensayos adecuados para los inhibidores de BCRP, en las referencias allí citadas y en las referencias citadas en esta solicitud de patente. Los ensayos que se usan serán fácilmente aparentes a la persona conocedora de la técnica. Ensayos de intestinos vueltos de dentro hacia fuera, ensayos de selección de un inhibidor usando ensayos de crecimiento de células, ensayos de membranas de borde de
 15 cepillo, ensayos de captación de fármaco usando ensayos de fluorescencia de ATP-asa.

La habilidad relativa de los compuestos para actuar como biomejoradores puede evaluarse midiendo el transporte de los fármacos *in vitro* y/o *in vivo*. Hay numerosos sistemas que pueden usarse como tales o que necesitan alguna adaptación para ser específicos para el BCRP cuando así se desea. Dichas adaptaciones pueden, sin embargo,
 20 ser contempladas por una persona conocedora de la técnica. La actividad del transporte relacionado con o mediado por BCRP puede medirse como la cantidad de transporte dependiente de ATP en un sistema que comprende BCRP y que opcionalmente está libre de uno o más de otros sistemas de transporte dependientes de ATP activos. Puede también medirse como la hidrólisis de ATP dependiente del fármaco. La actividad puede medirse usando electrodos o tintes, tanto sensibles químicamente como sensibles al cambio de voltaje. También pueden contemplarse nume-
 25 rosos ensayos *in vivo*, análogos a los que se llevan a cabo para las evaluaciones del sistema de MDR en cuanto a resistencia y sensibilidad. Se contempla el uso de un animal knock out de ensayo en el que se ha inactivado el gen BCRP.

Los ensayos con ratones evaluaron la biodisponibilidad del fármaco en ratones knock out dobles *mdr1a/1b* en presencia y ausencia de un inhibidor de BCRP. Los ensayos de biodisponibilidad pueden también llevarse a cabo o
 30 con ratones knock out MRP y/o P-gp permitiendo así la evaluación de si cualquier efecto encontrado debido a la presencia del bioinhibidor es debido únicamente al BCRP, no debido al P-gp y/o MRP. Así puede determinarse si el fármaco particular transportado se transporta usando uno o más sistemas de transporte. Puede proporcionarse al fármaco que se va a transportar un marcador detectable para evaluar donde está situado y poder cuantificarlo. Algunos
 35 fármacos pueden detectarse y cuantificarse en plasma sin usar un marcador detectable. La metodología empleada es análoga a la que se describe en el artículo de Lancet descrito anteriormente y está también descrita en Br. J. Cancer 1997, 76:1181-1183. Se considera así que la metodología se incorpora con la referencia y se considera que es factible para una persona conocedora de la técnica.

40 Hemos encontrado un aumento de seis veces la biodisponibilidad sistémica del fármaco ensayado cuando se le dosifica junto con un inhibidor de BCRP en ratones P-gp negativos mientras que se encontró un aumento de nueve veces en ratones de tipo silvestre (Jonker *et al.*, remitido para publicación en Nature Med.). Hemos encontrado además efectos similares con el análogo murino de BCRP, o sea *Bcrp1*, cuando se administró oralmente *Bcrp1* con el inhibidor de *Bcrp* GF-120918 (Allen *et al.*, Cancer Res. 1999; 59: 4237-4241; De Bruin *et al.*, Cancer Res. 1999; 59:4559-4563;
 45 Jonker *et al.*, remitido para publicación en Nature Med.) y *Bcrp1* a ratones P-gp negativos mostraron un aumento de seis veces mientras que los ratones tipo silvestre.

Se entenderá por la persona conocedora de la técnica que la invención en particular se refiere a la inhibición de BCRP. El nivel de MDR es dependiente del nivel al que BCRP se expresa. Niveles altos de expresión de BCRP
 50 originan niveles altos de MDR. En ausencia de una definición adecuada, un nivel alto de MDR se define aquí como el grado de resistencia a la mitoxantrona en la línea celular de mieloma humano 8226/MR20 de más de 10 (véase la línea celular de Hazlehurst *et al.*, Cancer Res. 1999; 59: 1021-1027).

Además, debe entenderse por la persona conocedora de la técnica que la invención se refiere a células tumorales
 55 y no tumorales, esto es que la invención no sólo proporciona un medicamento para aumentar la biodisponibilidad de un fármaco administrado oralmente en células tumorales, sino también en tejido no tumoral, o sea tejido normal o sano.

La invención cubre en una realización composiciones farmacéuticas para la administración oral, dicha compo-
 60 sición comprende un derivado farmacéuticamente activo de la camtotecina y GF120918. La composición farmacéutica según la invención puede comprender el derivado de la camtotecina en dosis más bajas de las que se administran normalmente cuando se administra el derivado de la camtotecina solo, o sea sin el GF120918. Para uso en el aumento de la biodisponibilidad los dos ingredientes no tienen necesariamente que ser administrados concomitantemente pe-
 65 ro deben estar presentes en el sujeto que se está tratando durante periodos de tiempo superpuestos. Preferentemente están en el intestino concomitantemente. Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente para las realiza- ciones de GF120918 y el derivado de la camtotecina, o sea el fármaco que hay que suministrar en una combinación en una composición farmacéutica, están cubiertas por la invención. El uso de dicha combinación en una preparación de un medicamento para la administración oral mejorada del derivado de la camtotecina por medio de la inhibición

ES 2 270 834 T3

del transporte mediado por o relacionado con BCRP está también cubierto. Es preferible presentar una combinación para asegurar la máxima presencia de GF120918 con el derivado de la camptotecina que se administra. Se prefiere que la composición esté formulada de manera que el GF120918 se libere en el intestino junto con el derivado de la camptotecina o un poco antes del uso se libere el derivado de la camptotecina. La composición farmacéutica puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable. La composición preferiblemente es estéril. Además, es preferiblemente organolépticamente aceptable.

Ejemplo 1

Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad usando el ensayo de sulforodamina (SRB).

Se pusieron las células en placas de 96 pocillos en bandejas, 1.500 células/pocillo. Se cultivaron las células durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂ sin ningún fármaco. Después se añadieron los fármacos en dilución seriada de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 0,05 nM, y se cultivaron las células durante otros 5 días a 37°C y 5% CO₂. A continuación se fijaron las células en la placa, se lavaron y se tiñeron con SRB. Después de 20 minutos el SRB no unido se elimina usando ácido acético 0,1 M. El SRB unido a las células se disuelve en tampón de Tris-ClH 10 mM. Se mide la absorbancia a 540 nm usando un lector de placa de 96 pocillos. Se determina el valor de IC₅₀ para cada fármaco. Los resultados son la media de al menos 3 experimentos. Los resultados se enumeran en la tabla siguiente.

Está claro por estos resultados que en condiciones normales la línea celular T8 tiene una sensibilidad menor para los fármacos de la topoisomerasa I, los valores IC₅₀ de T8 son mayores que los de IGROV1. El factor de resistencia (Rf), o sea, el IC₅₀ de T8 dividido por el valor IC₅₀ de IGROV1, varía desde 11 para BNP1350 a 231 para SN-38.

Si se determina la citotoxicidad en presencia del inhibidor de BCRP GF120918 2 µM, los valores IC₅₀ en la línea celular resistente T8 muestran una fuerte disminución. Las células se vuelven más sensibles a los fármacos por un factor de 1,4 a 24,4. Es importante notar que el GF120918 tiene poco o ningún efecto en la sensibilidad de la línea celular progenitora IGROV1, de aquí que el efecto para T8 pueda ser atribuible a la inhibición de BCRP por GF120918.

Los valores de Rf en presencia de GF120918 son de media un factor de 5 más bajos cuando se comparan con los valores en ausencia de GF120918. Con la adición de GF120918 se revierte en gran parte la resistencia de T8 a los fármacos de la topoisomerasa I.

TABLA

Citotoxicidad de fármacos de la topoisomerasa I en células progenitoras IGROV1 y células resistentes T8 +/- GF120918 2 µM

	IGROV1 IC₅₀ (nM)	IGROV1 +	Proporción
		GF120918 IC₅₀ (nM)	-/+ GF120918
topotecan	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
	T8	T8 + GF120918	

	IC ₅₀ (nM)	Rf	IC ₅₀ (nM)	Rf	Proporción +/- GF120918
topotecan	978,52	110	40,16	4,3	24,4
CPT11	33958,77	62	3037,67	4,7	11,02
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

Ejemplo 2

*Determinación del efecto de GF120918 en la biodisponibilidad oral de topotecan**Experimental*

Se usaron ratones *mdr1a/1b* (-/-) en este experimento para excluir los efectos de la inhibición de la glicoproteína P por GF120918. Primero, se administró GF120918 por vía oral a los ratones (50 mg/kg) o sustancia de control 15 minutos antes de la administración de topotecan. A continuación, se administró el topotecan por vía oral a dosis de 1 mg/kg. Finalmente, se recogieron muestras de sangre en los tiempos indicados. Todos los tiempos representan tres ratones.

Animales

Los animales se mantuvieron y manipularon según los protocolos institucionales que cumplieran con la legislación holandesa. Los animales que se usaron en todos los experimentos fueron ratones *mdr1a/1b* (-/-) o ratones tipo silvestre de antecedentes genéticos de 99% FVB, entre 9-14 semanas de edad. Todos los animales tuvieron acceso libre al pienso estándar (AM-II, Hope Farms; Woerden, Holanda) y agua ácida y un ciclo de 12 horas/12 horas luz/oscuridad y temperatura ambiente constante de 22°C.

Preparación del fármaco, administración y análisis

Se suspendió GF120918 en una formulación para administración oral de hidroxipropilmetilcelulosa (10 g/l) : Tween 80 (2% v/v) : H₂O 0,5 : 1 : 98,5 v/v/v), a 5 mg.ml⁻¹. Se trataron los animales con 50 mg.kg⁻¹ de GF120918 o una cantidad correspondiente de un vehículo por sonda en un volumen de 10 µl de solución de fármaco por gramo de peso corporal con una ligera anestesia de Metofano (Mallinckrodt Veterinary, Mundelein, IL, USA). Se administró el topotecan (recientemente preparado, en D-glucosa al 5%) por vía oral de manera que se administró 5 µl de la solución apropiada por gramo de peso corporal. La dosis fue 1,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Se sacrificaron los animales en los tiempos indicados por punción cardíaca o sangrado axilar después de anestesia con metofano y al mismo tiempo se recogió la sangre. El plasma heparinizado se mezcló con 3 volúmenes de metanol frío (-20°C). Se determinaron las concentraciones de topotecan en plasma por análisis de HPLC como se describe en Rosing *et al.*, 1995, J. Chromatography, 668: 107-115, y se representan en la figura 1.

Conclusión

La coadministración de una dosis oral de GF120918 ocasiona un profundo aumento en la exposición sistémica al topotecan oral. El aumento en el área bajo la curva (AUC) es aproximadamente de 6 veces (véase la figura).

Ejemplo 3

En este ejemplo se muestran los primeros resultados de un ensayo clínico. Tres pacientes recibieron topotecan por vía oral a una dosis de 1,0 mg.m⁻². Se administró el topotecan con o sin GF120918 (1000 mg). Con fines ilustrativos, se muestra la concentración en el plasma en relación con el tiempo en un paciente en la figura 2. En la figura 3 se muestra la media incluyendo la desviación estándar para los tres pacientes. Estos resultados confirman los resultados obtenidos *in vitro* según el Ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un producto que contiene GF120918 y un derivado farmacéuticamente activo de la camtotecina como una
5 preparación de combinación para administración por vía oral simultánea, separada o secuencialmente en el tratamiento de tumores.

2. Un producto según la reivindicación 1, que proporciona exposición sistémica aumentada de las células tumorales
10 a dicho derivado de la camtotecina en comparación con la administración de dicho derivado de la camtotecina sin GF120918.

3. Un producto según la reivindicación 1 o 2, en donde GF 120918 se administra simultáneamente con el derivado
de la camtotecina.

4. Un producto según la reivindicación 1 o 2, en donde GF 120918 y el derivado de la camtotecina se administran
15 separadamente.

5. Un producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el derivado de la camtotecina se seleccio-
20 na del grupo que consiste en el topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamtotecina, 9-nitrocamtotecina y CPT11 o su metabolito SN38.

6. Un producto según la reivindicación 5, en donde el derivado de la camtotecina es el topotecan.

7. El uso de GF120918 y un derivado farmacéuticamente activo de la camtotecina como ingredientes activos en la
25 preparación de una composición farmacéutica para administración oral, dicha composición farmacéutica proporciona una exposición sistémica aumentada de las células tumorales a dicho derivado de la camtotecina en comparación con la administración de dicho derivado de la camtotecina sin GF120918.

8. El uso según la reivindicación 7, en donde el derivado de la camtotecina se selecciona del grupo que consiste en
30 el topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamtotecina, 9-nitrocamtotecina, y CPT11 o su metabolito SN38.

9. El uso según la reivindicación 8, en donde el derivado de la camtotecina es el topotecan.

10. Una composición farmacéutica que comprende GF120918 y un derivado farmacéuticamente activo de la cam-
35 totecina opcionalmente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en donde el derivado de la camtotecina se selecciona
del grupo que consiste en el topotecan, GG211, DX8951f, BNP1350, 9-aminocamtotecina, 9-nitrocamtotecina, y
CPT11 o su metabolito SN38.

12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11, en donde el derivado de la camtotecina es el topo-
40 tecan.

13. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende el derivado
45 de la camtotecina a una dosis más baja que la que se administra normalmente cuando se administra el derivado de la camtotecina solo.

Fig 1

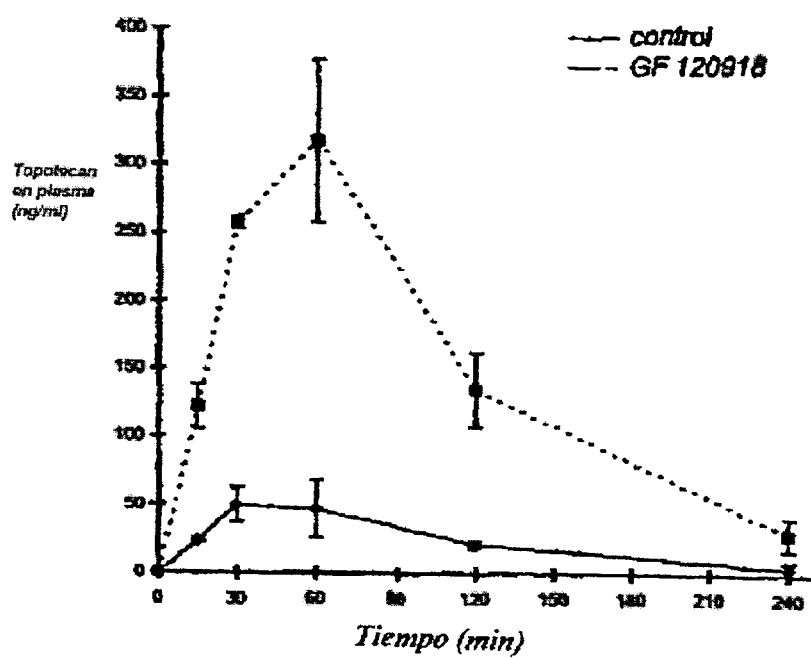


Fig 2

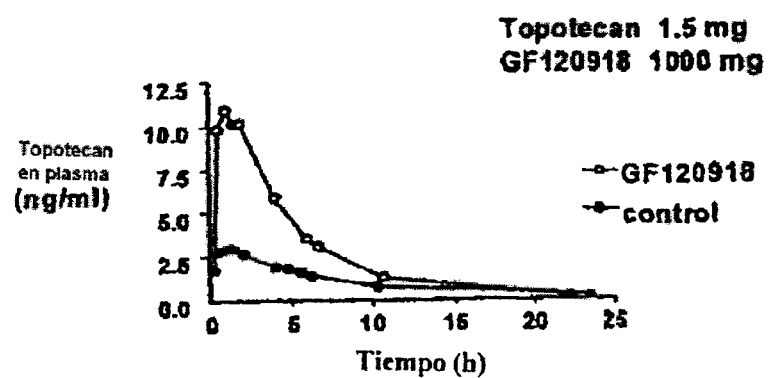


Fig 3

