



No. 10-041197- -00008-0000

Fecha: 2013-02-04 15:32:54
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTADep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 13**Clarke, Modet & C^o**

COLOMBIA

1

P-2520

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **10.041.197** —
Solicitud de patente a nombre de **TAKEDA PHARMACEUTICAL
COMPANY LIMITED**

Yo, DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de **TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**, domiciliada en Osaka, Japón, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 17378 notificado por fijación en lista el 2 de octubre de 2012, cuyo término fue prorrogado mediante escrito radicado el 27 de diciembre de 2012, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de 1 a 5 reivindicaciones y reemplaza en su totalidad el capítulo reivindicatorio presentado anteriormente.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

2. **Claridad de la Solicitud**

El examinador objeta el título de la solicitud, argumentando que presenta un error de transcripción. Con el fin de subsanar esta objeción el solicitante propone el siguiente título: “”

El solicitante presenta un nuevo capítulo reivindicatorio con el cual considera subsanadas las objeciones presentadas por el examinador. Las objeciones presentadas por el Examinador se contestan de la manera siguiente:

- Se objetó en las reivindicaciones 1, 10 y 10 el uso de la frase un sustituyente convertible *in vivo* a hidrógeno porque el número de compuestos quedaba indeterminado.

En respuesta el solicitante informa de manera respetuosa que la expresión

P-2520

1

objetada se ha eliminado en las reivindicaciones presentadas en esta fecha. Por lo anterior el solicitante pide respetuosamente se retiren las objeciones levantadas.

- Se objetó que en las reivindicaciones 1, 5, 6, 8, 10, 16, y 25 no eran claras por contener los términos “hetero(C₁₋₁₀)arilo”, “hetero(C₃₋₁₂)bicicloalquilo”, “hetero(C₈₋₁₂)bicicloarilo”, “(C₁₋₅)alquilo; entre otros; sin mencionar el número y tipo de heteroátomos que pueden conformar tales compuestos de heteroarilo o heterociclo. Se sugería restringir el número de compuestos reclamados en la presente solicitud a una generalización razonable del tipo de compuestos que estuvieran plenamente soportados en la descripción.

En respuesta el solicitante informa se han eliminado del nuevo capítulo reivindicatorio presentado en esta fecha las expresiones “hetero(C₁₋₁₀)arilo”, “hetero(C₃₋₁₂)bicicloalquilo”, “hetero(C₈₋₁₂)bicicloarilo” y “(C₁₋₅)alquilo”. En vista de lo anteriormente expuesto el solicitante pide respetuosamente retirar los rechazos levantados a las reivindicaciones.

- Se objetó que en las reivindicaciones 1, 5, 6, 8, 10, 16 y 25 no eran claras por el uso de los términos "arilo(C₄₋₁₂)", "hetero (C₁₋₁₀) arilo", "hetero (C₄₋₁₂) bicicloarilo", entre otros ya que no existen grupos de 4 miembros de heteroarilo o un heteroarilo de un miembro. Se sugería utilizar la definición de estos grupos así como limitar la solicitud a una generalización razonable del tipo de compuestos que estuvieran plenamente soportados en la descripción.

En respuesta el solicitante informa respetuosamente que las definiciones de "arilo(C₄₋₁₂)", "hetero (C₁₋₁₀) arilo", "hetero (C₄₋₁₂) bicicloarilo", han sido eliminadas de las reivindicaciones presentadas en esta fecha, por lo cual el solicitante pide respetuosamente se retiren las objeciones levantadas.

- Se objetaba que el capítulo reivindicatorio no era conciso ni estaba soportado en la descripción ya que no había suficientes ejemplos que demostraran que los compuestos hubieran sido obtenidos ni la actividad biológica de los mismos. Se había encontrado soporte para los sustituyentes W es N; Y es CH₂; R₉ y R₁₀ son H; n es 1, L está ausente; R₁ es H, R₂ es metilo, R₃ es H; R₄ es F, R₅ es seleccionado a partir del grupo H, F, metilo, etilo, CH=CH₂ y –CCH; R₆ es ciclopentilo o ciclohexilo opcionalmente sustituido y CR₃₂R₃₃ es CH₂ o C=O. Se sugería utilizar la definición de estos grupos así como limitar la solicitud a una generalización razonable del tipo de compuestos que estuvieran plenamente soportados en la descripción.

En respuesta el solicitante informa de manera respetuosa que se han limitado los compuestos reclamados en la enmienda presentada en esta fecha de acuerdo con lo soportado en la descripción y a lo señalado por el Examinador.

Las enmiendas anteriores se explican a continuación en la siguiente tabla.

Reiv.	Estado	R/variable	Párrafo	Reiv. Original	Dependencia/ Relación
1	enmendada	Fórmula	[0142] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		
		X es O	[0183] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En otra variación de cada una de las modalidades y variaciones anteriores.
		R ₁ es hidrógeno	[0186] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En otra variación adicional de cada una de las modalidades y variaciones anteriores.
		R ₂ es metilo	[0187] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En todavía una variación adicional de cada una de las modalidades y variaciones anteriores.
		R ₃ es hidrógeno	[0188] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En otra variación de cada una de las modalidades y variaciones anteriores.
		R ₆ es seleccionado del grupo que consiste de isopropilo y ciclopentilo	[0191] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia y los ejemplos</u>		En todavía una variación adicional de cada una de las modalidades y variaciones anteriores.
		R ₁₅ es hidrógeno	[0197] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		Cada una de las modalidades anteriores Each above embodiment
		R ₁₆ es hidrógeno	[0198] de la PCT, <u>buscar la correspondencia</u>		Cada una de las modalidades anteriores

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Reiv.	Estado	R/variable	Párrafo	Reiv. Original	Dependencia/ Relación
			<u>en la descripción en español presentada en Colombia</u>		
		R _{17a} es metoxi			
		R ₁₇ es fluoro			
		R ₁₉ es hidrógeno	[0208] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		
		R ₂₀ es			
		R ₁₇ es metoxi al menos un R ₁₇ es un halógeno	[0199] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		Cada una de las modalidades anteriores
		al menos un R ₁₇ es fluoro	[0199] y [0195] y [0206] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En todavía otra variación de cada una de las modalidades y variaciones anteriores
		R _{17a} es metoxi	[0203] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		En todavía una variación adicional de cada una de las modalidades y variaciones anteriores
		R ₁₉ es hidrógeno	[0208] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		
		R ₂₀ es (C ₁₋₁₀)alquilo, (C ₃₋₁₂)cicloalquilo, y hetero(C ₃₋₁₂)cicloalquilo, cada uno sustituido o no sustituido	[0209] y [0210] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia</u>		
		hetero(C ₃₋₁₂)cicloalquilo seleccionado del grupo que consiste de azetidino y piperidilo	[0071] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en</u>		

Reiv.	Estado	R/variable	Párrafo	Reiv. Original	Dependencia/ Relación
			<u>Colombia</u>		
2		R ₆ es ciclopentilo	[0191] de la PCT, <u>buscar la correspondencia en la descripción en español presentada en Colombia y los ejemplos</u>		
3		Especies restringidas de conformidad con la reiv. 1			
4		4-(9-Ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-5-metoxi-N-(1-metilpiperidin-4-il)benzamida	Último compuesto nombrado en esta página [0573] [0621] a [0625] [0671] a [0673] de la PCT, <u>buscar la correspondencia de los párrafos indicados de acuerdo a lo presentado en español en Colombia</u>	Reiv. 34	Compuesto 116 Compuesto 142 Compuesto 168
5		Composiciones Farmacéuticas		37	1-35

En vista de lo anterior el solicitante pide respetuosamente se levanten los rechazos a las reivindicaciones.

3. Falta de Nivel Inventivo

El Examinador levantó objeciones de actividad inventiva a la luz del siguiente documento citado:

No.	Documento	Reivindicaciones afectadas
D1	WO 2007/095188	1 – 29 y 35

En cuanto a la cuestión de actividad inventiva, hay tres diferencias estructurales entre los compuestos del documento D1 y las reivindicaciones como se presentan en esta fecha. Las reivindicaciones presentadas en esta fecha requieren contar con un 7,7-difluoro, el cual representa dos diferencias que no son enseñadas o sugeridas en D1. Las reivindicaciones presentes también requieren

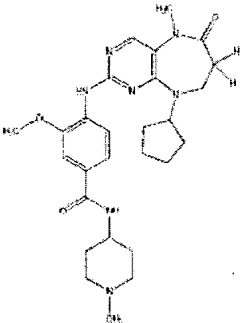
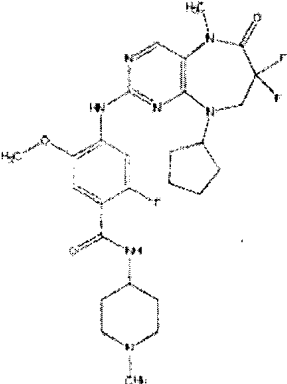
Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

6

un 2-fluoro en el anillo fenilo. Tal sustituyente es genéricamente enseñado en el documento D1, pero ninguno de los compuestos de los ejemplos tiene tal característica. El solicitante ha encontrado que esta característica imparte una ventaja significativa para los compuestos presentes, los cuales disminuyeron la susceptibilidad a la resistencia de multifármacos. No hay nada en el documento D1 que enseñe estos efectos.

A continuación se muestran datos comparativos que aclaran mejor la situación:

Ejemplo No.	Estructura	Características	Razón de eflujo de MDR1	Razón de eflujo de MOCK	MDR1/MOCK
D1 Compuesto I-2		7,7-H ₂	55.4	1.3	42.6
Solicitud presente Compuesto 116		7,7-F2 2-fluoro-5-metoxifenil	0.7	0.8	0.9

La resistencia a múltiples fármacos es mediada por una proteína que “bombea” el fármaco hacia fuera de las células cancerígenas y es un problema significativo en la terapia de cáncer. Para soportar su afirmación, el solicitante desea presentar el documento “Nature Biotechnology 18 IT18-IT20 (2000)”, **por favor presentar dicho documento, el cual se adjunta ante la Superintendencia.** Los datos muestran que los compuestos de la invención son sustratos mucho más débiles para MDR1, lo que significa que se espera que tengan mejor absorción a través del intestino y menos susceptibles para ser removidos de las células resistentes. Estos resultados no fueron obtenidos mediante pruebas a la par, pero son datos de archivo del solicitante.

Los datos más importantes son una proporción de las proporciones de eflujo en dos líneas celulares. La prueba se llevó a cabo como se indica a continuación: Las dos líneas celulares se utilizaron y se compararon, una línea celular tiene una bomba proteínica de P-glicoproteína 1, denominada MDR1, y la otra línea celular, denominada MOCK, es idéntica excepto que no tiene la bomba proteínica de P-glicoproteína 1. Se coloca una placa de monocapa de células y se mide la permeabilidad en ambas direcciones a través de cada línea celular. La proporción de la permeabilidad en cada dirección a través de la monocapa es la proporción de eflujo para esa línea celular. La proporción de eflujo mayor a 3 en la línea celular MDR1 indica que el compuesto es un sustrato para la bomba proteínica de P-glicoproteína 1. Una proporción de eflujo de unidad cercana a uno para la línea celular MOCK confirma que ningún otro transportador está en juego. La proporción de las proporciones de eflujo en las dos líneas celulares permite una comparación de la carga de la bomba proteínica de P-glicoproteína 1 a la permeabilidad del compuesto en la línea celular sin la bomba.

Los datos anteriores muestran que el compuesto I-2 del documento D1 es un sustrato de MDR1, pero que el compuesto 116 de la presente solicitud es un sustrato 80 veces más débil que el compuesto I-2 del documento D1. Se espera que tal diferencia en la susceptibilidad de MDR1 resulte en una biodisponibilidad oral mayor y menos resistencia al tratamiento. Mientras que no hay un comparador directo en el documento D1 porque no hay compuestos divulgados en el mismo que tengan un F en las posiciones 2 de fenilo, el Compuesto 116 de la presente solicitud se muestra esencialmente que no es un sustrato para MRD1. Esta falta de susceptibilidad se espera que resulte en una biodisponibilidad oral mayor y menos resistencia al tratamiento.

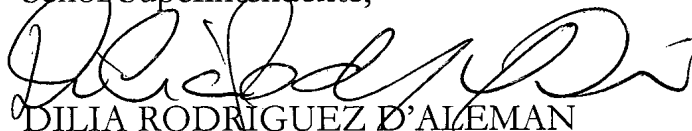
Estos resultados también son inesperados y muestran que los compuestos de la presente solicitud involucran una actividad inventiva sobre los compuestos del documento D1.

En resumen, me permito decir que gracias a las modificaciones expuestas en el punto 1 de este memorial y los argumentos anteriormente mencionados, la presente solicitud cumple cabalmente con el requisito de claridad y nivel inventivo respecto a los compuestos expuestos en el capítulo reivindicatorio adjunto. Por lo tanto, solicito comedidamente a ese despacho se sirva reconocer estos requisitos y conceder el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio.

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional. De igual forma, si el examinador considera que subsisten razones para

objetar la presente invención ruego expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que mi mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”*, respectivamente (el subrayado es nuestro).

Señor Superintendente,



DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CC. 41.654.882 de Bogotá

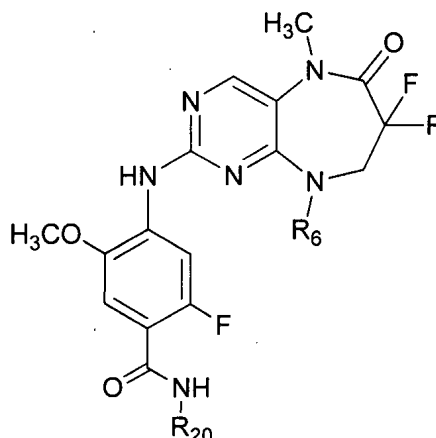
TP 20824

Cód. 008

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto caracterizado porque es de la formula:



y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde:

R_6 es seleccionado del grupo que consiste de isopropilo y ciclopentilo;
 R_{20} es heterocicloalquilo (C_{3-12}) seleccionado del grupo que consiste de azetidino y piperidilo, cada uno sustituido o no sustituido.

2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque R_6 es ciclopentilo.

3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es seleccionado del grupo que consiste de:

4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-N-(1-(2-(dimetilamino)acetil)piperidin-4-il)-2-fluoro-5-metoxibenzamida;
 4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-N-(1-(2-hidroxietil)piperidin-4-il)-5-metoxibenzamida;
 4-(7,7-difluoro-9-isopropil-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-5-metoxi-N-(1-metilpiperidin-4-il)benzamida;
 (R)-4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-5-metoxi-N-(piperidin-3-il)benzamida;
 N-(azetidin-3-il)-4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-5-metoxibenzamida;
 4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-N-(1-etilazetidin-3-il)-2-fluoro-5-metoxibenzamida;
 4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-N-(1-isopropilazetidin-3-il)-5-metoxibenzamida; y
 4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-N-(1-ciclopentilazetidin-3-il)-2-

fluoro-5-metoxibenzamida; o una sal farmacéuticamente aceptable de cada uno de los compuestos arriba mencionados.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es 4-(9-ciclopentil-7,7-difluoro-5-metil-6-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirimido[4,5-b][1,4]diazepin-2-ilamino)-2-fluoro-5-metoxi-N-(1-metilpiperidin-4-il)benzamida; o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

DISEASES

Cancer multidrug resistance

Progress in understanding the molecular basis of drug resistance in cancer promises more effective treatments.

Multidrug resistance, the principal mechanism by which many cancers develop resistance to chemotherapy drugs, is a major factor in the failure of many forms of chemotherapy. It affects patients with a variety of blood cancers and solid tumors, including breast, ovarian, lung, and lower gastrointestinal tract cancers. Tumors usually consist of mixed populations of malignant cells, some of which are drug-sensitive while others are drug-resistant. Chemotherapy kills drug-sensitive cells, but leaves behind a higher proportion of drug-resistant cells. As the tumor begins to grow again, chemotherapy may fail because the remaining tumor cells are now resistant.

Resistance to therapy has been correlated to the presence of at least two molecular "pumps" in tumor-cell membranes that actively expel chemotherapy drugs from the interior. This allows tumor cells to avoid the toxic effects of the drug or molecular processes within the nucleus or the cytoplasm. The two pumps commonly found to confer chemoresistance in cancer are P-glycoprotein and the so-called multidrug resistance-associated protein (MRP). Because of their function and importance, they are the targets of several anticancer efforts.

Historical perspective

That cells have mechanisms to transport a variety of molecules out of the cytoplasm has been known for decades. For example, organic cation transporters were some of the earliest such mechanisms identified, and the kidney's secretory capability in this regard

was first demonstrated in 1947¹. The first specific correlations between cell membrane transporters or pumps and a drug-resistant phenotype were made in Chinese hamster ovary cell lines in the mid-1970s, when it was shown that a glycoprotein of 170 kD, called P-glycoprotein, correlated with the degree of drug resistance in several cell lines². A variety of cells were found that were resistant to colchicine, vinblastine, doxorubicin, vinca alkaloids in general, etoposide, paclitaxel, and other small molecules used in cancer chemotherapy.

P-glycoprotein was purified in 1979³, and strong evidence in support of its role in pleiotropic drug resistance came in 1982, when it was shown that DNA from resistant cell lines that was transferred to nonresistant cells was able to confer resistance to the latter that correlated with the expression of the protein⁴. The gene for P-glycoprotein, called MDR-1, was cloned in 1985⁵, and the protein's putative function as an energy-dependent pump that expels small molecules from inside cells was postulated on the basis of sequence homologies with bacterial hemolysin transport protein and on other studies⁶.

Work on a lung cancer cell line that was resistant to doxorubicin and other chemotherapeutic agents showed that this cell line did not overexpress P-glycoprotein, but did express another protein, namely MRP, cloned in 1992⁷. MRP was also found to be a pump, specifically a member of the ATP-binding cassette transmembrane transporter superfamily, and since that

time both the MRP and P-glycoprotein have been significant targets for anticancer compounds.

Current state

It was not long before companies responded to the potential that these two multidrug resistance-conferring proteins offered for anticancer drug discovery. Table 1 lists a selection of companies with programs in this area. Isis, for example, is using its antisense technology to develop drugs to block the synthesis of MRP, and its oligonucleotide combinatorial technology to develop drugs that interfere directly with MRP function. Another significant effort is that of Vertex, which is developing two compounds, Incel (biricodar dicitrate, VX-710) and VX-853, to block P-glycoprotein (MDR-1) and MRP. Incel, an intravenous compound, and VX-853, an oral compound, are intended to be administered in combination with cancer chemotherapy agents, since the notion is that they act by preventing cancer cells from physically removing other anticancer drugs from their interior. The Incel multidrug resistance inhibitor is currently being tested in combination with chemotherapy in five phase II clinical trials targeting breast cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcoma, small cell lung cancer, and prostate cancer. Another program is that of Cell Therapeutics, which is developing CT-2584. This is a small molecule drug for the treatment of patients with chemorefractory cancers, including prostate cancer and sarcomas.

Table 1. Selected companies with multidrug resistance programs

Company	Program	Status
Aronex (The Woodlands, TX)	Annamycin against chemorefractory cancers	Phase II, 9/2000
Avigen (Alameda, CA)	MDR gene therapy	Patent
Biochem Pharma (Quebec, Canada) / Vertex (Cambridge, MA)	MDR in cancer	Phase II
Cell Therapeutics (Seattle, WA)	Small molecule inhibitor of MRP for prostate cancer and sarcomas	Phase II
CytRx (Norcross, GA)	MDR in acute leukemia	Patent
Genelabs (Redwood City, CA)	MDR in small cell lung and colorectal cancer	Preclinical
Genetic Therapy (Gaithersburg, MD)	MDR-1 gene for breast cancer	Phase I/II
Genetix Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Bone marrow chemoprotection	Phase I/II
Immunex (Seattle, WA)	Restoration of tumor sensitivity to anticancer drugs	Market
Ingenex (Menlo Park, CA)	MDR gene therapy	Phase I/II
Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, CA)	Antisense oligonucleotides for MDR	Phase II/III
Ixsys (San Diego, CA)	MDR monoclonal antibodies	Phase II
SuperGen (San Ramon, CA)	MDR in cancer	Preclinical
Titan Pharmaceuticals (S. San Francisco, CA)	Induction of MDR chemoprotection in stem cells	Phase I
Xenova (Slough, UK)	MDR in cancer	Preclinical
Source: Biovista (www.biovista.com)		

11

It is important to realize that there are two sides to multidrug resistance. On one hand, cancer cells need to lose their chemoprotective features mediated by MRP and MDR-1. On the other, chemotherapy-sensitive non-cancerous cells, such as bone marrow stem cells, need to be protected from the effects of chemotherapeutic agents. Bone marrow destruction is the single most important dose-limiting toxicity factor in the treatment of cancer patients. One reason is that recovery of bone marrow requires the removal of the patient from the chemotherapy regime, thus allowing cancer cells to grow again.

An example of an approach that targets bone marrow is that of Titan Pharmaceuticals. The company is developing a gene-based product it calls MDRx1, which can confer multidrug resistance to blood progenitor or stem cells, thus protecting them against chemotoxicity. MDRx1 involves the insertion of the MDR1 gene *ex vivo* into stem cells that have been removed from cancer patients. The modified stem cells are then reinfused back into the patients. It is hoped that there they can repopulate the blood system with chemoresistant blood cells. One advantage is that this would potentially allow patients to be given higher doses of anticancer agents than could be given normally.

Industry challenges

As mentioned before, there is a very strong correlation between the expression of the MDR-1 gene in many cell lines or in tumors derived from patients and the multidrug resistance exhibited by these cells. However, multidrug resistance also occurs in cells that do not show this correlation with MDR-18. This, in fact, represents a key challenge to the development of therapies based on the MDR-1 and MRP targets: There are probably other multidrug resistance-inducing molecules in cancer cells that have yet to be characterized, including ones that belong to the MDR-1 and MRP protein superfamilies.

A related challenge is that MRP-1 and MDR have normal chemoprotective functions in cells throughout the body. They are part of the body's defense mechanisms against toxic small molecules, and together with other membrane transporters and pumps, are key participants in the normal function of the liver, kidney, gastrointestinal gland, adrenal gland, and blood-brain barrier. Therefore, any approaches that target

these molecules must do so in a way that is tissue and/or cancer specific, so as not to affect the normal function of these molecules in healthy cells.

Finally, given the multiplicity of correlations that exist between P-glycoprotein and MRP expression with the expression of other proteins in cancer cells, another challenge is to find good cell-based models that enable the rapid analysis of these relationships in a meaningful manner. Yeast is an excellent model system, and a network of genes has been identified that confers a drug resistance phenotype similar to that of mammalian cells⁹. This system is being used extensively to study expression and functional aspects of resistance-conferring membrane pumps and agents that are effective against them.

Clinical status

Given the importance of MDR in tumor resistance to chemotherapy, it is not surprising that several companies are conducting clinical trials aimed at MDR-1 and/or MRP as targets. Phase II trials investigating the activity of Vertex's Incel in combination with other agents for the treatment of advanced refractory ovarian cancer and small cell lung cancer are currently underway. The compound is being tested in a range of drug-resistant cancers, including breast, ovarian, prostate, and small cell lung cancer. BioChem Pharma is funding the STS trial and will develop and market the product in Canada. MDR-1 and MRP overexpression have been associated with STS that is refractory to chemotherapy.

Preliminary phase I/II data were encouraging, showing that Incel could restore or enhance the activity of the anticancer agent doxorubicin in STS patients who had documented aggressive disease, and who had intrinsic or acquired resistance to doxorubicin. Doxorubicin is the standard chemotherapy for this disease, affecting about 7,000 new patients annually in Canada and the US. Approximately 70% of patients do not respond to initial chemotherapy, relapse is frequent, and the five-year survival rate for patients who are refractory to chemotherapy is a low 10–30%. According to Vertex's data, Incel blocks both MDR-1 and MRP, and thereby restores the sensitivity of tumor cells to treatment by apparently raising the concentration of anticancer agents inside the target cells.

Another ongoing trial is that of Aronex (The Woodlands, TX), using the anthracycline known as annamycin. Annamycin is under development for the treatment of drug-resistant breast cancer, and like Incel, it has the potential to be used in treating a broad range of cancers. One of the potential advantages of this compound is its better safety profile when compared with other anthracyclines used for similar purposes.

Other key issues include, for example, the fact that agents that can reduce MDR *in vitro*, such as toremifene, do not work in patients, probably because toremifene is bound to serum proteins in blood. However, a recent study shows how short courses of high dose toremifene in combination with vinblastine was generally well tolerated by patients and that it was possible to achieve concentrations of toremifene *in vivo* that can reverse MDR *in vitro*, which opens up possibilities to counteract MDR in the clinic using such combination therapies¹⁰. Finally, a recent report shows how significant MDR can occur in metastases but not in the primary tumor. This is a critical issue impacting the development of agents that are effective on primary as well as metastatic tumors¹¹.

The future

Although P-glycoprotein and MDR protein are capable of removing a wide variety of anticancer compounds from inside tumor cells, recent work shows that they cannot remove them all. For example, a novel derivative of olivacine, labeled S16020-2, has shown significant antitumor activity both *in vitro* and *in vivo* against cells that display resistance mediated by the MDR-1 phenotype. This may be due to the rapid rate of uptake of this compound, which effectively bypasses P-glycoprotein, leading to its higher intracellular accumulation and effectiveness¹². Other leads with similar activity profiles against multidrug resistant cancers are also likely to resist, and high-throughput screening efforts are being applied to find them (see Lead validation, p. xx–xx).

An important development to watch for in the future of MDR-1 and MRP-mediated multidrug resistance has to do with establishing links between these proteins and other cancer mechanisms, such as mutant p53 expression. Recent work suggests that in some cells, such a non-small cell lung cancer cells, there is a correlation between MRP and mutant p53 expression, which can be used for prognosis¹³. There are many other such correlations, and their potential importance becomes apparent in the context of a pharmacogenomic analysis of cancer multidrug resistance, where patient variability to anticancer agents could be localized conceivably to some of these gene families (see Pharmacogenomics, pp. 40–42).

DISEASES

In addition, recent structural studies are beginning to reveal the actual components of MRP that are necessary for its function¹⁴. This work will pave the way towards targeting agents specifically to the functional regions of these molecules, thus inactivating them. Such work is already underway. For example, MDR-1 is being extensively analyzed by the US National Cancer Institute's COM-PARE program for the identification of agents in the NCI database that would be predicted to be good substrates and/or inhibitors for the molecule¹⁵.

The future of MDR is also going to see increasing benefit from novel genetic approaches such as transcriptional decoys. For example, a recent report shows how targeting the promoter of the human MDR1 gene with antisense was effective in causing leukemia cells highly resistant to vinblastine to become susceptible to the anticancer agent¹⁶. Complementing such approaches, synthetic combinatorial chemistry or biolo-

gy is developing anticancer compounds or peptides that target the regulatory sequences of MDR1 and block its expression¹⁷.

Finally, novel molecules that can inhibit MDR are likely to come from a variety of sources, and the future will continue to see the increasing screening of compounds from a huge variety of settings for this purpose. For example, a recent study describes how the antifungal antibiotic aureobasidin A can be an effective inhibitor of the MDR1 P-glycoprotein¹⁸, and

this is likely to become a significant addition to the arsenal of MDR1 inhibitors.

Conclusions

In the fight against cancer, a number of targets are being pursued with equal zeal. The resistance-mediating transporters discussed here represent a significant set of clinically relevant drug targets that have therapeutic as well as diagnostic potential. Cancer defends itself actively by using these mechanisms,

and therefore their impairment is likely to have a significant therapeutic benefit. The science in this area is progressing very rapidly, and corporate involvement is likely to follow suit.

Reprinted from *Nature Biotechnology* 17, 94–95 (1999).

1. Rennick, B.R. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **91**, 210–217 (1947).
2. Juliano, R.L. & Ling, V. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–162 (1976).
3. Riordan, J.R. & Ling, V. *J. Biol. Chem.* **254**, 12701–12705 (1979).
4. Debenham, P.G. et al. *Mol. Cell Biol.* **2**, 881–889 (1982).
5. Riordan, J.R. et al. *Nature* **316**, 817–819 (1985).
6. Chen, C.J. et al. *Cell* **47**, 381–389 (1986).
7. Cole, S.P. et al. *Science* **258**, 1650–1654 (1992).
8. Bellamy, W.T. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 161–183 (1996).
9. Kolaczowski, M. et al. *Microb. Drug. Resist.* **4**, 143–148 (1998).
10. Braybrooke, J.P. et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, 27–34 (2000).
11. Nakamura, M. et al. *Anticancer Res.* **20**, 1921–1925 (2000).
12. Pierre, A. et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42**, 454–460 (1998).
13. Oshika, Y. et al. *Mod. Pathol.* **11**, 1059–1063 (1998).
14. Bakos, E. et al. *J. Biol. Chem.* **273**, 32167–32175 (1998).
15. Weinstein, J.N. et al. *Science* **275**, 343 (1998).
16. Marthinet, E. et al. *Gene Ther.* **7**, 1224–1233 (2000).
17. Bartsevich, V.V. & Juliano R.L. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1–10 (2000).
18. Tiberghien, F. et al. *J. Med. Chem.* **43**, 2547–2556 (2000).

13