

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 957**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2003 E 08103007 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1952810**

54 Título: **Tratamiento de cáncer de seno con 4-hidroxitamoxifen**

30 Prioridad:

01.04.2003 US 458963 P

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

24.04.2014

73 Titular/es:

**BESINS HEALTHCARE LUXEMBOURG SARL
(100.0%)
67 boulevard Grande-Duchesse Charlotte
1331 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**SALIN-DROUIN, DOMINIQUE;
WEPIERRE, JACQUES y
ROUANET, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 456 957 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de cáncer de seno con 4-hidroxitamoxifen

Antecedentes de la Invención

La presente invención se relaciona con el tratamiento de cáncer de seno con 4 hidroxi tamoxifen (4-OHT).

- 5 El cáncer de seno constituye un problema sanitario significativo para las mujeres en los Estados Unidos y a través del mundo. A pesar de los avances en la detección y tratamiento de la enfermedad, el cáncer de seno sigue siendo la segunda causa líder de muertes relacionadas con el cáncer en mujeres, afectando a más de 180.000 mujeres en los Estados Unidos solamente cada año. Para las mujeres en Norteamérica, las probabilidades en el tiempo de vida de desarrollar cáncer de seno son de una en ocho.
- 10 No existe actualmente un método universalmente exitoso para prevenir o tratar el cáncer de seno. El manejo de la enfermedad se basa en una combinación de diagnóstico temprano (a través de procedimientos de examen de seno de rutina) y tratamientos agresivos, los cuales pueden incluir una o más de una variedad de tratamiento tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia con hormonas. Estas terapias son peligrosas, tóxicas, costosas y frecuentemente no efectivas, especialmente en el tratamiento de enfermedades metastásicas.
- 15 La medicación hormonal más comúnmente prescrita para el cáncer de seno es el tamoxifen. Trabaja bloqueando los efectos del estrógeno, el cual promueve el crecimiento de las células de cáncer de seno. Como tratamiento para cáncer de seno, el tamoxifen hace más lento o detiene el crecimiento de las células cancerosas que ya están presentes en el cuerpo, y ayuda a prevenir recurrencias y el desarrollo de nuevos cánceres. Tomando tamoxifen durante 5 años se reduce el riesgo de recurrencia a aproximadamente la mitad en pacientes con cánceres positivos del receptor de estrógeno. El tamoxifen también disminuye la incidencia del cáncer de seno que involucra el seno opuesto (contralateral) en mujeres tanto premenopáusicas como postmenopáusicas. Además, se ha encontrado recientemente que el tamoxifen reduce la incidencia de cáncer de seno en mujeres con alto riesgo de desarrollar esta enfermedad.
- 20 A pesar de sus beneficios, el tamoxifen tiene desventajas significativas. Su acción impacta potencialmente sobre cada célula que porta el receptor de estrógeno en el cuerpo, y, tanto como agonista y antagonista, el tamoxifen provoca un amplio rango de efectos sistémicos. Estos efectos incrementan el riesgo de cáncer del endometrio, hiperplasia y pólipos del endometrio, trombosis de venas profundas y embolia pulmonar, cambios en niveles enzimáticos en el hígado y toxicidades oculares, incluyendo cataratas. Adicionalmente, los pacientes tratados con tamoxifen oral reportan haber tenido acaloramientos, descarga vaginal, depresión, amenorrea y náusea (Ibis, 2002; Fentiman 1986, 1988, 1989).
- 25 Debido a las desventajas del tamoxifen, algunos investigadores del cáncer han propuesto utilizar 4-hidroxi tamoxifen, un metabolito del tamoxifen, para el cáncer de seno. En estudios *in vitro*, el 4-hidroxi tamoxifen inhibe el crecimiento de células tanto normales y cancerosas del seno (Nomura, 1985; Malet, 1988, 2002; Charlier, 1995). Adicionalmente, el 4-hidroxi tamoxifen administrado transdérmicamente inhibe un efecto antitumoral en tumores de seno humanos cultivados subcutáneamente en ratones (Patente de los Estados Unidos No. 5, 904,930).
- 30 La US 4, 919,937 divulga un gel percutáneo que comprende 4-hidroxi tamoxifen y progesterona para el tratamiento de condiciones del seno.
- La US 5,904,930 divulga un parche transdérmico que comprende un derivado y un aditivo que promueve la absorción para la administración sistémica.
- 40 Kuttenn et al. (Contracept. Fertil. Sex., 1991, 19, 2, 165-171) divulga que el 4-hidroxitamoxifen pasa la barrera cutánea y se encuentra preferencialmente en el tejido tumoral, en fracciones subcelulares ricas en receptor de estradiol y en menor grado en el tejido normal.
- 45 En experimentos limitados en humanos han mostrado que el 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea puede concentrarse en tumores de seno locales con muy poca distribución sistémica (Mauvais-Jarvis, 1986). Sin embargo, el estudio más extendido reportado de este tipo, en el cual los pacientes fueron tratados durante tres semanas, mostró que las concentraciones en el tejido del seno de 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea permanecieron más bajas que aquellas observadas después del tratamiento con tamoxifen oral (Pujol, 1995). De acuerdo con lo anterior, los investigadores concluyeron que no podrían proponer el 4-hidroxi tamoxifen percutáneo como un tratamiento alternativo al tamoxifen.
- 50 De manera importante, ninguno de los estudios reportados concernientes al 4-hidroxi tamoxifen en humanos tiene efecto antitumoral evaluado. Esta falla deja abierta la pregunta más importante – si el 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea ejerce realmente un efecto sobre el cáncer de seno en humanos. Por lo tanto,

existe una fuerte necesidad para tratamientos y profilaxis de cáncer de seno que provoquen pocos efectos sistémicos colaterales.

Resumen de la invención

5 La presente invención se relaciona con el tratamiento de cáncer de seno administrando 4-hidroxi tamoxifen. Esta metodología de tratamiento, implementada por vía tópica, reduce efectivamente la proliferación de tejido tumoral y da como resultado niveles de fármaco en plasma inferiores que el tamoxifen oral.

La presente solicitud también describe la prevención del cáncer de seno administrando 4-hidroxi tamoxifen. Como sucede con la metodología del tratamiento, la metodología profiláctica también se implementa preferiblemente por vía tópica.

10 El objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para administración percutánea que comprende 4-hidroxi tamoxifen y miristato de isopropilo como un potenciador de la penetración para uso en el tratamiento del cáncer de seno.

15 Para propósitos de la profilaxis o tratamiento, el 4-hidroxi tamoxifen puede ser administrado por cualquier medio que lo libere a las células portadoras del receptor de estrógeno *in vivo*. De acuerdo con la invención la administración se hace por vía percutánea (por vía tópica), para evitar el efecto del primer paso y el metabolismo relacionado en el hígado del 4-hidroxi tamoxifen. Para la administración percutánea, el 4-hidroxi tamoxifen puede ser aplicado en cualquier superficie de la piel. La aplicación a los senos es ventajosa porque el 4-hidroxi tamoxifen tiende a concentrarse en tejidos subcutáneos locales con los receptores de estrógeno cuando se administra por vía percutánea.

20 Un amplio rango de formulaciones tópicos son adecuadas para llevar a cabo la invención, pero se prefieren soluciones hidroalcohólicas y geles hidroalcohólicos. La concentración de 4-hidroxi tamoxifen en estas formulaciones puede variar, pero una dosis debería dar como resultado concentraciones en tejidos locales de 4-hidroxi tamoxifen que se opongan efectivamente a los efectos impulsados por estrógenos.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 ilustra el metabolismo del tamoxifen.

La figura 2 ilustra la concentración media en plasma de 4-hidroxi tamoxifen en mujeres saludables después de administración cutánea.

30 La figura 3 ilustra la concentración de 4-hidroxi tamoxifen en tejidos, de acuerdo con el modo de administración y dosificación. El panel A muestra la concentración de 4-hidroxi tamoxifen en tejidos tumorales. El panel B muestra la concentración de 4-hidroxi tamoxifen en plasma.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 Un aspecto importante de la presente invención es el descubrimiento sorprendente de que el 4-hidroxi tamoxifen, cuando se administra por vía percutánea, es efectivo no solamente en el tratamiento sino también en la prevención del cáncer de seno. Además, el 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea da como resultado niveles en plasma inferiores del fármaco que la dosis estándar de tamoxifen oral, lo cual se traduce en efectos colaterales adversos menores. De acuerdo con lo anterior, el 4-hidroxi tamoxifen por vía percutánea es una alternativa al tamoxifen tanto para el tratamiento como para la profilaxis en este contexto.

40 Los inventores han llevado a cabo el primer estudio para demostrar que el 4-hidroxi tamoxifen reduce la proliferación tumoral en seno *in vivo* en humanos (véase ejemplo 4, más adelante). En resumen, administrar un gel de 4-hidroxi tamoxifen por vía percutánea a pacientes humanos diagnosticados con cáncer de seno positivo al receptor de estrógenos. Después de solamente 2 – 3 semanas de administración, los inventores observaron reducciones relacionadas con la dosis en los índices de proliferación de tejidos tumorales, con la dosis más alta (2.0 mg/día) con una equivalencia aproximada a una dosis estándar de tamoxifen oral. Los índices de proliferación de tejidos tumorales evaluados fueron Ki67 (Gerdes 1984; Schluter 1993) y el Antígeno Nuclear de Células Proliferantes (PCNA) (Waseem, 1990). Aunque el gel percutáneo de 4-hidroxi tamoxifen y el tamoxifen oral forman equivalentes en la reducción de la proliferación del tejido tumoral, los niveles en plasma del 4-hidroxi tamoxifen fueron consistentemente inferiores en pacientes que recibían el gel de 4-hidroxi tamoxifen.

50 El compuesto 4-hidroxi tamoxifen o 1-[4-(2-N-dimetilaminoetoxi)fenil]-1-(4-hidroxifenil)-2-fenilbut-1-ene, constituye un metabolito activo del compuesto antiestrógeno bien caracterizado, tamoxifen. Debido a la presencia de un doble enlace entre dos átomos de carbono, el 4-hidroxi tamoxifen existe en dos formas estereoisoméricas. De acuerdo con la literatura médica y bioquímica, las formas isoméricas del 4-hidroxi tamoxifen se designan comúnmente como isómeros *cis* y *trans*. Desde una perspectiva puramente química, sin embargo, esta designación no es estrictamente

exacta porque cada átomo de carbono con doble enlace no contiene un grupo químico idéntico. Por lo tanto, es más apropiado referirse a los isómeros como configuraciones E (la así llamada forma cis) y Z (la así llamada forma trans). Ambos isómeros E y Z del 4-hidroxi tamoxifen, bien sea solos o en combinación, son útiles de acuerdo con la presente invención. El isómero Z es el preferido, sin embargo, porque es más activo que el isómero E.

5 El 4-hidroxi tamoxifen actúa como un modulador del receptor de estrógenos selectivo (SERM) que exhibe especificidad al tejido para tejidos receptores del estrógeno. En tejidos de seno, funciona como un antagonista del estrógeno. Los estudios han mostrado que el 4-hidroxi tamoxifen puede regular la actividad transcripcional de los receptores relacionados con el estrógeno, el cual puede contribuir a su actividad específica a los tejidos. In vitro, el 4-hidroxi tamoxifen exhibe más potencia que el tamoxifen, según se mide por afinidad de enlazamiento a los
10 receptores de estrógeno o ER, y una afinidad de enlazamiento similar al estradiol para los receptores del estrógeno (Robertson et al., 1982; Kuiper et al. 1997). El Z-4-hidroxi tamoxifen inhibe el crecimiento en cultivo de células epiteliales de seno humanas normales 100 veces más que el Z-tamoxifen (Malet et al., 1988).

Aunque el 4-hidroxi tamoxifen es un metabolito del tamoxifen, su utilidad para el cáncer de seno no fue presagiada por experimentos previos con el tamoxifen mismo. El tamoxifen se metaboliza extensamente en humanos, como se muestra en la figura 1. Así, su acción in vivo es el resultado neto de acciones individuales del compuesto original y sus compuestos metabolitos compitiendo por la ocupación de los receptores dentro de los tejidos objetivo. Por ejemplo, véase Jordan, 1982. Cada uno de estos compuestos manifiesta actividades biológicas diferentes e impredecibles en diferentes células, determinadas en parte por el efecto individual de cada compuesto sobre la conformación del receptor de estrógeno. Esto es, el enlazamiento al receptor del estrógeno a cada compuesto genera una conformación única receptor-ligando que recluta diferentes cofactores, y da como resultado diversas farmacologías para los diferentes compuestos (Wijayarathne et al., 1999; Giambiagi et al., 1988).

Se han documentado varios ejemplos de estos efectos variables. Por ejemplo, el tamoxifen, pero no el 4-hidroxi tamoxifen es un potente carcinógeno del hígado en ratas. (Carthew et al., 2001; Sauvez et al., 1999). Adicionalmente, el tamoxifen, pero no el 4-hidroxi tamoxifen inicia según se informa apoptosis en células epiteliales mamarias humanas normales p53(-) (Dietze et al., 2001). En contraste, el 4-hidroxi tamoxifen exhibe un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de la estrona sulfatasa en líneas celulares de cáncer mamario, mientras que el tamoxifen tiene poco o ningún efecto en este aspecto (Chetrite et al., 1993).

Estudios previos con 4-hidroxi tamoxifen también no predijeron su efectividad para el tratamiento y prevención del cáncer de seno. La capacidad de cualquier fármaco para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* o en un ensayo de xenoinjerto es un indicador crudo de cómo el fármaco podría actuar en humanos (Gura, 1997). Los cultivos de células, un ambiente artificial, no proveen información relacionada a como el fármaco actúa en un sistema biológico completo, y los animales frecuentemente no procesan los fármacos de la misma forma que los humanos. Además, estudios previos en humanos con 4-hidroxi tamoxifen solamente evaluaron la disponibilidad del fármaco, y no proveyeron información concerniente al efecto del fármaco sobre tumores de seno. En contraste, experimentos llevados a cabo por los presentes inventores han demostrado sorprendentemente que el 4-hidroxi tamoxifen, administrado por vía percutánea, produce reducciones relacionadas con la dosis en los índices de proliferación de tejidos tumorales.

Los métodos para preparar el 4-hidroxi tamoxifen son bien conocidos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4, 919,937 describe una síntesis, derivada de Robertson y Katzenellenbogen, 1982, que ocurre en etapas:

40 Etapa 1 - Reacción entre 4-(β-dimetilaminoetoxi)-α-etildeoxibenzoína y p-(2-tetrahidropiraniloxi)fenilmagnesio bromuro;

Etapa 2 – Separadamente de la etapa 1, formación de 1-(4-hidroxifenil)-2-fenil-1-butanona por hidroxilación de 1,2-difenil-1-butanona;

45 Etapa 3 - Reacción entre los productos de las etapas 1 y 2 para formar 1-(4-dimetilaminoetoxifenil)-1-[p-2-tetrahidropiraniloxi]fenil]-2-fenilbutan-1-ol;

Etapa 4 - Deshidratación con metanol/ácido clorhídrico produce 1-[p-(β-dimetilaminoetoxi)fenil]-Z-1-(p-hidroxifenil)-2-fenil-1-but-1-ene=4-OH-tamoxifen, una mezcla de isómeros E y Z;

Etapa 5 - Separación de los isómeros E y Z por cromatografía y cristalización hasta actividad específica constante.

De acuerdo con la presente invención, el 4-hidroxi tamoxifen puede ser administrado a un paciente diagnosticado con cáncer de seno. El cáncer preferiblemente será positivo al receptor de estrógenos, y se cree que el 4-hidroxi tamoxifen primariamente ejerce su efecto actuando sobre los receptores de estrógeno. Adicionalmente, se prefiere que el cáncer de seno esté localizado en el seno. Por ejemplo, un tumor primario de seno y/o un tumor metastático localizado únicamente en el seno puede ser tratado por administración tópica. Sin embargo, los tumores de cáncer de seno y otras localizaciones que son accesibles a 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía tópica también pueden ser tratados de esta manera.

La presente solicitud también describe la administración de 4-hidroxi tamoxifen por vía profiláctica, a un paciente con riesgo incrementado para desarrollar cáncer de seno. Muchos factores de riesgo para el cáncer de seno están bien establecidos. Por ejemplo, la historia familiar de cáncer de seno, historia personal de cáncer de seno, detección por biopsia de seno previa de enfermedades proliferativa en seno tales como hiperplasia atípica, e irradiación del seno
 5 previa colocan todos a un paciente en un riesgo elevado para desarrollar cáncer de seno. Factores de riesgo genéticos particulares incluyen mutaciones BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK-2 y p53. Ciertos factores relacionados con el estilo de vida para mujeres incluyen partos retrasados hasta después de la edad de 30 años, uso a largo plazo de anticonceptivos orales, y uso a largo plazo de terapia de reemplazo de hormonas. Un practicante médico experimentado puede evaluar estos u otros factores de riesgo para determinar si un paciente se beneficiara del uso
 10 profiláctico del 4-hidroxi tamoxifen. Al hacer tal establecimiento, un médico puede emplear el modelo Gail.

El 4-hidroxi tamoxifen es particularmente útil para prevenir cáncer de seno en mujeres premenopáusicas. En esta población, un antiestrógeno debe competir con altas cantidades de estrógeno circulante para ocupar los receptores de estrógeno. Debido a que el 4-hidroxi tamoxifen tiene 100 veces más afinidad por los receptores de estrógeno que el tamoxifen, es más capaz de competir por los receptores en dosis bajas. La capacidad para utilizar una dosis
 15 baja representa una importancia particular en un contexto profiláctico, donde una exposición del paciente al fármaco es a largo plazo y los efectos laterales son menos tolerables.

Como resultado de la presente invención, el 4-hidroxi tamoxifen se puede administrar en cualquier forma de dosificación y a través de cualquier sistema que entrega el compuesto activo a los receptores de estrógeno en los senos y/o tumores in vivo por "administración percutánea", una frase que denota cualquier modo de administración
 20 de un fármaco a partir de la superficie de la piel de un paciente, a través de las capas de stratum corneum, epidermis y dermis, y hacia la microcirculación. Esto se logra típicamente por difusión mediante un gradiente de concentración. La difusión puede ocurrir a través de penetración intracelular (a través de la célula), y penetración intercelular (entre las células), penetración *transapendageal* (a través de los folículos del cabello, glándulas sudoríparas y sebáceas) o cualquier combinación de estas.

La administración percutánea de 4-hidroxi tamoxifen ofrece varias ventajas. Primero, evita el metabolismo hepático que ocurre subsecuente a la administración oral (Mauvais-Jarvis et al., 1986). En segundo lugar, la administración percutánea reduce significativamente la exposición sistémica al fármaco, y los riesgos concurrentes de la activación no específica de receptores de estrógenos a través del cuerpo; esto, porque el 4-hidroxi tamoxifen tópico se absorbe
 25 primariamente en tejidos locales. En particular, cuando el 4-hidroxi tamoxifen se aplica por vía percutánea a los senos, se acumula en altas concentraciones en el tejido del seno, preferiblemente debido a muchos receptores de estrógeno en el mismo, sin crear una alta concentración en el plasma (Mauvais-Jarvis et al., supra). De acuerdo con la presente invención, por lo tanto, el 4-hidroxi tamoxifen puede ser aplicado a cualquier superficie de la piel, pero preferiblemente a uno o ambos senos.

Aunque la invención no está restringida a ninguna teoría en particular, los efectos colaterales clínicamente significativos de los agentes antiestrógeno se presentan cuando los agentes desplazan el estradiol en tejidos no objetivo. Puesto que el 4-hidroxi tamoxifen y el estradiol tienen afinidades de enlazamiento similares por los receptores de estrógeno, una competición entre ellos por el enlazamiento al receptor sería aproximadamente igual cuando la concentración de cada compuesto se aproxima a la del otro. Si la concentración del 4-hidroxi tamoxifen
 35 excede la concentración de estradiol, el primero se enlazara preferencialmente a los receptores de estrógeno y viceversa.

De acuerdo con lo anterior, son preferidas las dosis de 4-hidroxi tamoxifen que dan como resultado concentraciones de plasma menores a aproximadamente 80 pg/mL, o la concentración media de estradiol en mujeres normales premenopáusicas. Más preferiblemente, dosis de 4-hidroxi tamoxifen darán como resultado concentraciones en plasma menores de aproximadamente 50 pg/mL. Las dosis diarias para ser administradas pueden ser estimadas
 45 inicialmente con base en los coeficientes de absorción de 4-hidroxi tamoxifen, la concentración de tejido en el seno que se desea, y la concentración en plasma que no debería ser excedida. Desde luego, la dosis inicial puede ser optimizada en cada paciente, dependiendo de las respuestas individuales.

Como se anotó anteriormente, al dirigir el 4-hidroxi tamoxifen al tejido del seno, pueden alcanzarse altas concentraciones en aquel tejido sin elevar simultáneamente los niveles en plasma de 4-hidroxi tamoxifen hasta un punto donde se presente la competición sistémica significativa por los receptores del estradiol. A una dosis percutánea de 1 mg/seno/día, la concentración de 4-hidroxi tamoxifen en el tejido del seno excede las concentraciones normales de estradiol en tejido de seno en un factor de 4. (Barrat et al., 1990; Pujol et al., supra). Además, el 4-hidroxi tamoxifen aplicado de esta manera alcanza concentraciones en el tejido del seno que está en un orden de magnitud por encima de las concentraciones en plasma, esto es 10:1. En contraste, la relación en tejido
 50 de seno a plasma de 4-hidroxi tamoxifen después de la administración oral de tamoxifen es aproximadamente 5:1.

En una formulación percutánea, las dosis en el orden de 0.25 – 2.0 mg/seno/día de 4-hidroxi tamoxifen deberían alcanzar el resultado deseado, con dosis de aproximadamente de 0.5 – 1.0 mg/seno/día como preferida. En

realizaciones particulares, la dosificación es de aproximadamente 0.5, 0.75 o 1.0 mg/seno/día de 4-hidroxi tamoxifen.

5 La administración percutánea puede ser lograda principalmente de dos maneras diferentes: (i) mezclando un compuesto terapéuticamente activo o su sal no tóxica farmacéuticamente aceptable con vehículos farmacéuticos adecuados y, opcionalmente, potenciadores de la penetración para formar ungüentos, emulsiones, lociones, soluciones, cremas, geles o similares, en donde se aplica una cantidad de dicha preparación sobre una cierta área de la piel o (ii) incorporando la sustancia terapéuticamente activa en parches o en sistemas de administración transdérmica de acuerdo con tecnologías conocidas.

10 La efectividad de la administración percutánea del fármaco depende de muchos factores, incluyendo concentración del fármaco, área superficial de aplicación, tiempo y duración de la aplicación, hidratación de la piel, propiedades físico químicas del fármaco y partición del fármaco entre la formulación y la piel. Las formulaciones del fármaco previstas para uso percutáneo aprovechan la ventaja de estos factores para alcanzar una administración óptima. Tales formulaciones comprenden frecuentemente potenciadores de la penetración que mejora la absorción percutánea reduciendo la resistencia del stratum corneum alterando de manera inversa sus fisiolípidos y proteínas en los espacios intercelulares. Tales potenciadores de la absorción percutánea incluyen surfactantes, DMSO, alcohol, acetona, propilen glicol, polietilen glicol, ácidos grasos o alcoholes grasos y sus derivados, hidroxiacidos, pirrolidonas, urea, aceites esenciales y mezclas de los mismos. Además, de los potenciadores químicos, los métodos físicos pueden incrementar la absorción subcutánea. Por ejemplo, los vendajes oclusivos incluyen la hidratación de la piel. Otros métodos físicos incluyen iontoforesis y sonoforesis, los cuales utilizan campos eléctricos y ultrasonido de alta frecuencia, respectivamente, para potenciar la absorción de fármacos que son absorbidos pobremente debido a su tamaño y sus características iónicas.

15 Los muchos factores y métodos relativos a la administración percutánea de fármacos están revisados en REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, Alfonso R. Gennaro (Lippincott Williams & Wilkins, 2000), at pages 836-58, and in PERCUTANEOUS ABSORPTION: DRUGS COSMETICS MECHANISMS METHODOLOGY, Bronaugh and Maibach (Marcel Dekker, 1999). Como lo evidencian estas publicaciones, las personas en el campo farmacéutico pueden manipular los diversos factores y métodos para alcanzar administración percutánea eficaz.

20 El 4-hidroxi tamoxifen es una molécula grande y muy lipofílica; por lo tanto, sin la ayuda de los potenciadores de la penetración penetra pobremente la piel. De acuerdo con lo anterior, las formulaciones de 4-hidroxi tamoxifen utilizadas en la presente invención comprenden uno o más potenciadores de la penetración incluyendo alcoholes porque el 4-hidroxi tamoxifen es soluble en alcohol y miristato de isopropilo.

25 Para la administración percutánea, el 4-hidroxi tamoxifen puede ser administrado en un ungüento, crema, gel, emulsión, loción, polvo, aceite o formulación similar. Con este propósito, la formulación puede comprender aditivos excipientes habituales, incluyendo aceites vegetales como aceite de almendras, aceite de oliva, aceite de drupa de melocotón, aceite de cacahuete y aceite de castor, aceites animales, DMSO, grasa y sustancias similares a la grasa, lipoides de la lanolina, fosfátidos, hidrocarburos tales como parafinas, gelatina de petróleo, ceras, agentes emulsificantes de detergentes, lecitina, alcoholes, carotina, polioles o poliglicoles tales como glicerol (o glicerina), éteres de glicerol, glicoles, éteres de glicol, polietilen glicol, polipropilen glicol, alcoholes grasos no volátiles, ácidos, ésteres compuestos alcohólicos volátiles, urea, talco, derivados de celulosa, agentes colorantes, antioxidantes y conservantes.

30 De acuerdo con la presente invención el 4-hidroxi tamoxifen también puede ser administrado a través de un parche transdérmico. En una realización, el parche comprende un reservorio para la fórmula del 4-hidroxi tamoxifen. El parche puede comprender (a) una lámina de respaldo impermeable a una solución, (b) un elemento similar a una capa que tiene una cavidad, (c) una membrana microporosa o semipermeables, (d) una capa autoadhesiva, y (e) opcionalmente, una película de soporte removible. El elemento similar a una capa que tiene una cavidad puede ser conformado por la lámina de soporte y la membrana. Alternativamente, el parche puede comprender (a) una lámina de soporte impermeable a la solución, (b) una espuma de poro abierto, una espuma de poro cerrado, una capa similar a un tejido o una capa tipo red fibrosa como reservorio, (c) si la capa de acuerdo con (b) no es autoadhesiva, una capa autoadhesiva, y (d) opcionalmente una película de soporte removible.

35 En realizaciones preferidas de la invención, el 4-hidroxi tamoxifen se formula en un gel hidroalcohólico. La cantidad de 4-hidroxi tamoxifen en tal gel puede variar desde aproximadamente 0.001 hasta aproximadamente 1.0 gramos de 4-hidroxi tamoxifen por 100 gramos de gel. Preferiblemente varía en el rango de 0.01 hasta aproximadamente 0.1 gramos de 4-hidroxi tamoxifen por 100 gramos de gel.

40 Las formulaciones de 4-hidroxi tamoxifen comprenden miristato de isopropilo como potenciador de la penetración. Cuando se utiliza miristato de hidroxipropilo en un gel, la cantidad puede variar desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 5.0 gramos por 100 gramos de gel. Preferiblemente, la cantidad de miristato de isopropilo varía desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 2.0 gramos por 100 gramos de gel.

5 Las formulaciones de 4-hidroxi tamoxifen de la invención comprenderán generalmente uno o más vehículos no acuosos. Estos vehículos deben ser capaces de disolver tanto el 4-hidroxi tamoxifen como cualquier potenciador de penetración usado. También deberían tener un bajo punto de ebullición, preferiblemente menor a 100°C a presión atmosférica, para permitir una rápida evaporación por contacto con la piel. Ejemplos de vehículos no acuosos adecuados incluyen etanol, isopropanol y acetato de etilo. El etanol y el isopropanol son los preferidos. En particular, el etanol contribuye de manera efectiva a la absorción percutánea del 4-hidroxi tamoxifen evaporándose rápidamente por contacto con la piel. La cantidad de vehículo no acuoso en una formulación en gel varía generalmente de entre 54% y 85% en peso, y preferiblemente de entre 65% y 75%.

10 Las formulaciones también pueden comprender un vehículo acuoso, el cual permite la solubilización de cualquier molécula hidrofílica en una formulación, y también promueve la difusión de moléculas lipofílicas a partir de la formulación hacia la piel. Un vehículo acuoso también puede regular el pH. Los vehículos acuosos incluyen soluciones reguladoras alcalinizantes y básicas, incluyendo soluciones reguladas con fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio dibásico o monobásico), soluciones reguladas con citrato (por ejemplo citrato de sodio o citrato de potasio) y simplemente agua purificada. La cantidad de un vehículo acuoso varía preferiblemente entre 15% y 45% en peso de una formulación en gel, y más preferiblemente entre 25% y 35%.

20 Adicionalmente, las formulaciones de 4-hidroxi tamoxifen pueden comprender uno o más agentes gelificantes para incrementar la viscosidad de una formulación y/o para funcionar como agente solubilizante. Dependiendo de la naturaleza del agente gelificante, puede constituir entre 0.1% y 20% en peso de una formulación, preferiblemente entre 0.5% y 10%, y aún más preferiblemente entre 1% y 5%. Agentes gelificantes preferidos incluyen carbómeros, derivados de celulosa, poloxámeros y poloxaminas. Mas particularmente, agentes gelificantes preferidos son quitosano, dextrano, pectinas, goma natural y derivados de celulosa tales como etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil celulosa, hidroxipropil metil celulosa (HPMC) y carboximetil celulosa (CMC). Un agente gelificante altamente preferido es hidroxipropil celulosa.

25 Cuando una formulación comprende un agente gelificante, en particular un polímero acrílico no preneutralizado, puede también comprender ventajosamente un agente neutralizante. La relación agente neutralizante/agente gelificante preferiblemente está entre 10:1 y 0.1:1, más preferiblemente entre 7:1 y 0.5:1, y todavía más preferiblemente entre 4:1 y 1:1. Un agente neutralizante debería formar, en la presencia del polímero, sales que son solubles en el vehículo. Un agente neutralizante también debería permitir un hinchamiento óptimo de las cadenas del polímero durante la neutralización de cargas y la formación de las sales del polímero. Agentes neutralizantes útiles incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, arginina, aminometil propano y trometamina. Los experimentados en la técnica seleccionaran un agente neutralizante de acuerdo con el tipo de agente gelificante empleado en una formulación. Cuando se utilizan derivados de celulosa como agentes gelificantes, sin embargo, no se requieren agentes neutralizantes.

30 La Tabla 1 describe la composición de dos formulaciones en gel de 4-hidroxi tamoxifen altamente preferidas.

35 Tabla 1: Composición de formulaciones en gel de 4-hidroxi tamoxifen

Ingrediente	Cantidad por 100 g de gel	
	20 mg 4-OHT gel	57 mg 4-OHT gel
4-hidroxi tamoxifen	0.02 g	0.057 g
Alcohol etílico al 95%, EP	72 g	72 g
Miristato de isopropilo, EP	1 g	1 g
Hidroxipropilcelulosa, EP	1.5 g	1.5 g
Regulador de fosfato (pH 7, diluido 1:4)	q.s. 100 g	q.s. 100 g

Con referencia a lo que sigue, los ejemplos ilustrativos ayudarán a proveer un entendimiento más completo de la invención.

Ejemplo 1: Demostración de la administración de 4-hidroxi tamoxifen percutáneo

40 Cuatro pacientes con cáncer de seno recibieron [³H]-4-hidroxi tamoxifen en una solución alcohólica aplicada directamente a los senos en intervalos especificados entre 12 horas a 7 días antes de cirugía para escindir el tejido

enfermo. Después de la cirugía, tanto el tejido escindido como el tejido de seno normal que rodeaba el tumor contenían radioactividad (Kuttenn et al., 1985).

5 En un estudio de seguimiento, 9 de 12 pacientes programados para escisión quirúrgica de cáncer de seno dependiente de hormonas recibieron Z-[³H]-4-hidroxi tamoxifen (80 μCi) en una solución alcohólica al 60%, y 3 pacientes recibieron Z-[³H]-tamoxifen (80 μCi) para comparación. Los pacientes recibieron el fármaco marcado con [³H] aplicado directamente sobre los senos afectados a intervalos especificados que variaban de 12 horas a 7 días antes de la cirugía para escindir el tejido enfermo. El tejido del seno de tres regiones: el tumor, el tejido que rodea inmediatamente el tumor, y el tejido normal, fue escindido e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. Adicionalmente, se obtuvieron mezclas de plasma y orina en intervalos programados y se congelaron hasta el análisis.

10 La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis llevados a cabo. El 4-hidroxi tamoxifen se concentró predominantemente en las fracciones citosólicas y nucleares del tejido del seno, donde los receptores de estrógeno están presentes. En estos sitios intracelulares, el 4-hidroxi tamoxifen permaneció sin metabolizar excepto por la isomerización limitada de la forma Z a la E. La retención en el seno duró aproximadamente 4 días en el grupo del 4-hidroxi tamoxifen, pero fue más corta y bastante más débil en el grupo del tamoxifen.

15 Tabla 2: [³H]-4-hidroxi tamoxifen y metabolitos identificados en tejido de tumor de seno después de administración percutánea de Z-[³H]-4-hidroxi tamoxifen en el seno afectado

Metabolitos	Porcentaje de metabolitos en tejido de seno				
	12 horas ¹	24 horas	36 horas	Día 4	Día 7
4-hidroxi tamoxifen	97	94	78	70	65
N-desmetil-4-hidroxi tamoxifen	2	4	14	20	16
Bisfenol	1	2	3	8	8
N-desmetil tamoxifen			<1	<1	3 – 4
Tamoxifen				<1	2
¹ Tiempo después de la administración de Z-[³ H]-4-hidroxi tamoxifen					

20 El porcentaje de radioactividad identificado como [³H]-4-hidroxi tamoxifen en tejido de seno después de la administración percutánea disminuyó lentamente durante 7 días (del 97% a 65%). Durante este periodo se observó una isomerización progresiva del isómero Z hacia el isómero E, con porcentajes similares observados en el día 7 (32% y 33%).

25 La radioactividad en sangre debida al [³H]-4-tamoxifen se incrementó gradualmente, con una meseta de los días 4 a 6. Esto contrasta con el [³H]-tamoxifen, el cual rápidamente aparece en la sangre, estabilizándose a los 2 días. A 36 horas después de la administración percutánea de [³H]-4-hidroxi tamoxifen, solamente el 0.5% de la radioactividad administrada se mostró en la sangre.

En contraste con la casi ausencia del metabolismo del 4-hidroxi tamoxifen en el tejido del seno, se presentó un metabolismo marcado en la sangre. En sangre, a 24 horas después de la administración, el 68% de la radioactividad representaba 4-hidroxi tamoxifen, 18% representaba N-desmetil-4-hidroxi tamoxifen y 11% representaba bisfenol.

30 El pico de eliminación urinaria ocurrió en un tiempo posterior después de la administración percutánea de 4-hidroxi tamoxifen en la orina un incremento progresivo de metabolitos, principalmente N-desmetil-4-hidroxi tamoxifen y bisfenol.

35 Este ejemplo demuestra que la aplicación percutánea de 4-hidroxi tamoxifen a los senos da como resultado una concentración sustancial y duradera en tejido local del fármaco, con metabolismo mínimo, concentraciones estables y muy bajas en plasma, y eliminación lenta a través de la orina.

Ejemplo 2: Demostración de la farmacocinética y farmacodinámica de 4-OH-tamoxifen administrado por vía percutánea en comparación con 20 mg de tamoxifen oral.

Este estudio comparó las concentraciones en tejido y plasma de 4-hidroxi tamoxifen después de la administración percutánea a través de un gel hidroalcohólico con concentraciones en tejido y plasma de 4-hidroxi tamoxifen después de la administración oral de tamoxifen (Pujol, 1995).

Treinta y un pacientes programados para cirugía de cáncer de seno fueron asignados aleatoriamente a uno de cinco grupos. Recibieron tratamiento bien sea con tamoxifen oral o 4-hidroxi tamoxifen percutáneo como se delinea en la Tabla 3. El tratamiento fue diario y duró durante 3 – 4 semanas antes de la cirugía. El estudio evaluó tres dosis diferentes de 4-hidroxi tamoxifen (0.5, 1, o 2 mg/día) y dos áreas de aplicación (bien sea a ambos senos, o a una superficie grande de piel incluyendo brazos, antebrazos y hombros). Un grupo de pacientes recibió 20 mg/día (10 mg b.i.d.) de tamoxifen oral (Nolvalex[®]).

Tabla 3: Grupos de tratamiento

Grupo	N	Fármaco	Sitio de aplicación	Dosis	
				mg/seno/día	Dosis diaria total (mg/día)
1	6	PO tamoxifen	--	--	20 ^a
2	6	4-OHT gel	Ambos senos	0.25	0.5
3	5	4-OHT gel	Ambos senos	0.50	1
4	5	4-OHT gel	Brazos, antebrazos y hombros	--	1
5	6	4-OHT gel	Brazos, antebrazos y hombros	--	2 ^b
^a 10 mg b.i.d.					
^b Dividido en dos aplicaciones diarias; 1 mg en la mañana y 1 mg en la tarde					

El gel de 4-hidroxi tamoxifen (20 mg de 4-hidroxi tamoxifen/100 g de gel hidroalcohólico; Besins-International Laboratories) fue empacado en una bomba de medición de dosis presurizada que suministraba 1.25 g de gel/dosis medida (esto es, 0.25 mg de 4-hidroxi tamoxifen/dosis).

Durante la cirugía, se escindieron dos muestras (1 cm³ de cada una) de tejido de seno, uno tumoral y el otro macroscópicamente normal. Inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido hasta el ensayo. Se obtuvieron muestras de sangre en el día de y un día antes de la cirugía. Todas las muestras de tejido y plasma fueron analizadas en cuanto a la concentración de 4-hidroxi tamoxifen por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS).

Las muestras de sangre pre y post tratamiento fueron probadas en cuanto al conteo de sangre completa (CBC), bilirrubina, transaminasa glutámica en suero (SGPT), transaminasa glutámica-oxolacética en suero (SGOT), fosfatasa alcalina, creatinina, estradiol, hormona estimulante de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), globulina de enlazamiento a hormona sexual (SHBG), colesterol, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), triglicéridos, fibrinógeno y antitrombina III.

La Tabla 4 resume la concentración de 4-hidroxi tamoxifen encontrada en tejidos de seno y plasma. Los tejidos de senos normales y tumorales contenían concentraciones similares de 4-hidroxi tamoxifen en todos los cinco grupos de tratamiento. El 4-hidroxi tamoxifen se concentró a cantidades superiores en tejido de seno cuando el gel fue aplicado directamente a los senos, en vez de a otras superficies grandes de piel.

Tabla 4: Concentraciones de 4-hidroxi tamoxifen

Grupo	N	Promedio ± SD de 4-hidroxi tamoxifen (Rango)			
		Concentraciones en plasma (pg/mL)		Tejido normal (Pg/g)	Tumor (pg/g)
		Día precirugía	Día de cirugía		
1	6	2326 ± 585 (1371 – 2959) ^a	2317 ± 1098 (881 – 4176)	10215 ± 2151 (5873 – 11511)	12453 ± 3751 (9568-18904) ^a
2	6	0 (0-0) ^a	17 ± 27 (0 ^c – 61)	353 ± 513 (0 ^d -1317)	1447 ± 2673 (0 ^f – 6889)
3	5	164 ± 131 (29 – 279) ^b	62 ± 71 (28 – 190)	1112 ± 1125 (197 – 2979)	1877 ± 2472 (345 – 6211)
4	5	94 ± 76 (35 – 201) ^b	13 ± 29 (0 ^c – 65)	140 ± 130 (0 ^e – 270)	552 ± 357 (271 – 1150)
5	6	78 ± 138 (0 ^e – 284) ^b	73 ± 114 (0 ^c – 244)	992 ± 2195 (0 ^d – 5462)	224 ± 312 (0 ^d – 799)
^a n=5 ^b n=4 ^c 4 pacientes tuvieron niveles indetectables de 4-hidroxi tamoxifen (LOQ=20 pg/ml) ^d 3 pacientes tenían niveles indetectables de 4-hidroxi tamoxifen ^e 2 pacientes tenían niveles indetectables de 4-hidroxi tamoxifen ^f 1 paciente tenía niveles indetectables de 4-hidroxi tamoxifen					

5 Los efectos colaterales no plantean un problema significativo. El tratamiento cutáneo no causa ninguna irritación local. Una mujer en el grupo 2 (0.5 mg/día de gel de 4-hidroxi tamoxifen) reportó vértigos, cistitis, y vaginitis moderada que se presentaron en el séptimo día de tratamiento. Una mujer en el grupo 1 (tamoxifen oral) reportó calentamientos instantáneos y vaginitis moderada en el quinto día de tratamiento.

10 No existió diferencia entre las muestras de sangre pre y post tratamiento para cualquiera de las evaluaciones de hematología o química del suero en los pacientes que recibieron gel de 4-hidroxi tamoxifen. Sin embargo, se observó un descenso estadísticamente significativo en antitrombina III y fibrinógeno y un incremento estadísticamente significativo en recuentos de plaquetas y linfocitos en el grupo de tamoxifen oral, consistente con los efectos biológicos de este fármaco observados en otros estudios.

Ejemplo 3: Demostración de la tolerancia y la farmacocinética de 4-OH-tamoxifen administrado por vía percutánea en mujeres sanas

15 Este estudio demuestra la tolerancia y la farmacocinética de 4-hidroxi tamoxifen en gel aplicado por vía tópica en mujeres premenopáusicas sanas, en edades de 18 – 45 años. Cada participante aplicó el gel diariamente durante la duración de dos ciclos menstruales.

20 Se probaron tres dosis y dos concentraciones de gel, como se resume en la Tabla 5. Para los grupos A – C, el gel, que contenía 20 mg de 4-hidroxi tamoxifen/100 g, fue dispensado a partir de una bomba medidora de dosis presurizada que suministraba 0.25 mg de 4-hidroxi tamoxifen/dosis. El estudio del grupo fue suspendido porque la cantidad de gel fue demasiado grande para ser aplicada a un seno individual. Los grupos D y E recibieron un gel más concentrado que contenía casi 3 veces más de 4-hidroxi tamoxifen: 57 mg de 4-hidroxi tamoxifen/100g, o 50 mg

de 4-hidroxi tamoxifen/100 mL de gel. Este gel más concentrado también fue suministrado mediante una bomba de medición de dosis que suministro 0.25 mg de 4-hidroxi tamoxifen/dosis.

Tabla 5: Grupos de tratamiento

Grupo	N	Dosis (mg/día)	Concentración en gel (mg de 4-OHT/g de gel)	Tratamiento
A	12	0.5	20 mg/100 g	1 dosis/seno/día medida
B	8	1	20 mg/100 g	2 dosis/seno/día medidas
C	2	2	20 mg/100 g	El estudio fue interrumpido
D	12	1	57 mg/100 g	2 dosis/seno/día medidas
E	12	2	57 mg/100 g	4 dosis/seno/día medidas

5 Al final del ciclo menstrual cada paciente recibió una dosis individual después de la cual se recolectaron muestras de sangre en serie a las 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas.

En el primer día de la siguiente menstruación, comenzó el tratamiento, que consistía en la aplicación diaria del gel a lo largo de dos ciclos menstruales. Las muestras de sangre fueron recolectadas 24 horas después de la aplicación matutina del gel en los días 7, 20 y 25 del primero y segundo ciclos. En el último día de administración, el día 25 del segundo ciclo menstrual, se recolectaron muestras de sangre en serie antes de la aplicación y a 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas después de la aplicación del gel. Las muestras fueron analizadas en cuanto a 4-hidroxi tamoxifen, estradiol, progesterona, FSH y LH.

10 Las concentraciones en plasma de 4-hidroxi tamoxifen permanecieron detectables 72 horas después de la última aplicación de gel. Por lo tanto, para asegurar que los puntos de datos fueron obtenidos hasta que el 4-hidroxi tamoxifen se hiciera indetectable en la sangre, se recolectaron muestras de sangre adicionales de algunos de los participantes en intervalos de hasta 92 días después de la última aplicación del gel.

15 La Tabla 6 presenta las concentraciones en plasma media \pm desviación estándar (SD) de 4-hidroxi tamoxifen, con rangos en paréntesis. Una dosis sencilla de 0.5 mg no produjo concentraciones en plasma detectables de 4-hidroxi tamoxifen, pero 6 de 12 pacientes tuvieron concentraciones en plasma detectables (>5 pg/mL) después de una dosis sencilla de 1 mg.

Tabla 6: Concentraciones medias \pm SD en plasma de 4-hidroxi tamoxifen en mujeres sanas después de administración cutánea diaria durante dos ciclos menstruales

Ciclo	Día	Tiempo después de aplicación (hr)	Promedio \pm SD (Rango como se indica en paréntesis) en pg/mL			
			0.5 mg/día (n=12) ¹	1 mg/día (n=8) ¹	1 mg/día (n=12) ²	2 mg/día (n=12) ²
Primero	1	0	(0 – 17.2)	(0 – 13.9)	(0 – 9.5)	(0 – 0)
	7	24	6.4 \pm 5.6 (<LOQ – 16.8)	15.2 \pm 9.7 (<LOQ – 26.8)	14.4 \pm 13.1 (<LOQ – 37.9)	26.9 \pm 18.2 (8.9 – 71.3)
	20	24	13.6 \pm 7.9 (<LOQ – 25.9)	17.3 \pm 9.5 (<LOQ – 29.8)	18.1 \pm 15.8 (<LOQ – 44.5)	44.0 \pm 29.2 (10.5 – 117.5)
	25	24	23.9 \pm 23.4 (<LOQ – 73.1)	15.5 \pm 6.6 (6.4 – 25.0)	19.8 \pm 16.2 (6.2 – 57.0)	45.4 \pm 31.0 (17.9 – 120.1)

ES 2 456 957 T3

(continuación)

Ciclo	Día	Tiempo después de aplicación (hr)	Promedio ± SD (Rango como se indica en paréntesis) en pg/mL			
			0.5 mg/día (n=12) ¹	1 mg/día (n=8) ¹	1 mg/día (n=12) ²	2 mg/día (n=12) ²
Segundo	7	24	25.2 ± 16.1 (6.5 – 61.7)	17.4 ± 11.2 (5.7 – 39.6)	22.2 ± 16.4 (9.0 – 64.4)	42.2 ± 24.8 (18.2 – 98.0)
	20	24	15.7 ± 14.0 (<LOQ – 52.3)	14.8 ± 6.5 (5.4 – 24.8)	24.4 ± 20.1 (<LOQ – 65.4)	38.9 ± 27.1 (18.7 – 119.7)
	25	0 ³	10.8 ± 9.9 (<LOQ – 36.4)	15.7 ± 17.1 (<LOQ – 56.4)	27.2 ± 20.8 (8.0 – 72.1)	43.2 ± 27.7 (16.9 – 120.3)
		0.5	10.9 ± 7.4 (<LOQ – 26.0)	13.5 ± 9.1 (<LOQ – 27.7)	25.9 ± 18.7 (8.7 – 69.2)	44.5 ± 29.9 (13.6 – 124.5)
		1	10.4 ± 7.8 (<LOQ – 26.7)	10.8 ± 6.6 (<LOQ – 23.8)	28.7 ± 19.5 (8.8 – 69.2)	40.5 ± 25.1 (14.2 – 106.7)
			1.5	9.0 ± 8.2 (<LOQ – 25.1)	11.8 ± 8.0 (<LOQ – 23.6)	25.6 ± 17.8 (7.5 – 67.0)
2			11.8 ± 9.5 (<LOQ – 26.9)	10.7 ± 6.9 (<LOQ – 24.7)	25.1 ± 18.0 (6.9 – 67.3)	36.8 ± 21.6 (13.0 – 83.7)
3			10.0 ± 7.9 (<LOQ – 23.1)	11.4 ± 7.9 (<LOQ – 28.1)	24.8 ± 20.5 (9.0 – 69.9)	36.1 ± 20.6 (11.9 – 89.4)
		4	9.2 ± 8.3 (<LOQ – 25.3)	11.2 ± 7.3 (<LOQ – 25.7)	26.8 ± 23.3 (6.4 – 78.1)	38.1 ± 21.2 (16.5 – 92.0)
		6	11.4 ± 8.5 (<LOQ – 26.6)	10.7 ± 6.4 (<LOQ – 22.8)	25.0 ± 18.2 (9.0 – 65.3)	41.0 ± 29.1 (14.0 – 123.8)
		12	11.0 ± 9.7 (<LOQ – 29.1)	11.8 ± 7.8 (<LOQ – 28.1)	28.3 ± 22.9 (6.4 – 74.6)	45.1 ± 30.6 (18.7 – 126.8)
		18	9.7 ± 8.8 (<LOQ – 24.9)	12.2 ± 8.3 (<LOQ – 29.6)	23.4 ± 17.4 (8.1 – 57.9)	39.8 ± 25.5 (16.0 – 107.3)
	26	24	12.4 ± 9.4 (<LOQ – 34.4)	18.6 ± 14.2 (<LOQ – 40.1)	26.0 ± 19.6 (8.9 – 61.9)	44.0 ± 33.0 (15.8 – 132.5)
		36	10.9 ± 6.9 (5.0 – 25.8)	13.4 ± 7.5 (<LOQ – 25.4)	25.7 ± 18.4 (8.8 – 61.3)	42.1 ± 31.5 (15.1 – 129.3)

(continuación)

Ciclo	Día	Tiempo después de aplicación (hr)	Promedio ± SD (Rango como se indica en paréntesis) en pg/mL			
			0.5 mg/día (n=12) ¹	1 mg/día (n=8) ¹	1 mg/día (n=12) ²	2 mg/día (n=12) ²
	27	48	12.1 ± 6.5 (4.8 – 26.6)	12.5 ± 6.0 (<LOQ – 19.6)	22.0 ± 16.0 (5.6 – 50.2)	38.1 ± 25.3 (17.5 – 110.0)
	28	72	9.9 ± 7.1 (<LOQ – 22.3)	9.9 ± 5.8 (<LOQ – 19.6)	18.9 ± 12.4 (5.6 – 37.8)	33.2 ± 22.2 (17.7 – 98.0)
		+ 5 días	--	5.8 ± 5.2 (<LOQ – 12.4)	11.4 ± 8.2 (<LOQ – 25.8)	20.4 ± 17.3 (9.1 – 71.6)
		+ 8 días	<LOQ	(<LOQ – 17.4)	(0 – 14.8)	10.8 ± 13.4 (<LOQ – 52.0)
		+ 12 días	(Máximos 9.09)	(<LOQ – 7.0)	(0 - <LOQ)	(0 – 30.4)
		+ 20 días	0	<LOQ	(0 - <LOQ)	(0 - <LOQ)
¹ La concentración de gel fue 20 mg de 4-hidroxi tamoxifen por 100 g de gel ² La concentración de gel fue de 57 mg de 4-hidroxi tamoxifen por 100 g de gel ³ El punto de tiempo 0 es 24 horas después de la aplicación en el día 24 y antes de la aplicación final en el día 25. LOQ = Límite de cuantificación (<5 pg/mL)						

5 La figura 2 muestra una curva de concentración de plasma-tiempo, después de la última administración en el día 25 del segundo ciclo menstrual. La Tabla 7 muestra parámetros farmacocinéticos promedio que se relacionan con la última administración, en el día 25 del segundo ciclo menstrual.

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos promedio de 4- hidroxi tamoxifen en mujeres sanas después de la última administración

Parámetros	Promedio ± SD (El rango se indica en paréntesis)			
	0.5 mg/día (n=12) ^a	1 mg/día (n=8) ^a	1 mg/día (n=12) ^b	2 mg/día (n=12) ^b
C _{max} (pg/mL)	17.0 ± 8.5 (7.6 – 34.4)	21.0 ± 14.0 (<LOQ – 40.1)	35.1 ± 22.4 (9.9 – 78.1)	51.6 ± 31.7 (22.1 – 132.5)
t _{max} (hr)	40 ± 81 (0.5 – 288)	24 ± 18 (0.5 – 48)	12.8 ± 14.9 (1 – 36)	11.8 ± 12.3 (0.5 – 36)
t _{1/2} (hr)	-	-	(58 – 118)	(49 – 101)

(continuación)

Parámetros	Promedio \pm SD (El rango se indica en paréntesis)			
	0.5 mg/día (n=12) ^a	1 mg/día (n=8) ^a	1 mg/día (n=12) ^b	2 mg/día (n=12) ^b
AUC ₀₋₂₄ (pg·hr/mL)	256.3 \pm 205.3 (24.6 – 651.1)	300.9 \pm 190.8 (0 – 693.6)	619 \pm 466 (187 – 1522)	998 \pm 653 (424 – 2778)
C _{av} =AUC ₀₋₂₄ /24 (pg/mL)	10.7 \pm 8.5 1.0 – 27.1)	12.5 \pm 7.9 (0 – 28.9)	25.8 \pm 19.4 (7.8 – 63.4)	41.6 \pm 27.2 (17.7 – 115.8)
T(1stC<LOQ) (hr)	--	274 \pm 141 (144 – 480)	236 \pm 72 (144 – 384)	326 \pm 97 (192 – 480)

^a La concentración de gel fue de 20 mg de 4-hidroxi tamoxifen por 100 g de gel

^b La concentración de gel fue de 57 mg de 4-hidroxi tamoxifen por 100 g de gel

AUC₀₋₂₄ = área bajo la curva de concentración-tiempo para 0 – 24 horas; C_{av} = cálculo de área bajo la curva durante 24 horas (AUC₀₋₂₄) dividida por 24 horas; C_{max} = concentración máxima en plasma; t_{1/2} = vida media; T(1stC<LOQ) = primer punto de tiempo en el cual la concentración de plasma estaba por debajo del límite de cuantificación; t_{max} = tiempo de concentración máxima en plasma.

Los datos son consistentes con una respuesta a la dosis a través de las tres dosis probadas (0.5, 1 y 2 mg). El gel más concentrado fue mejor absorbido, aproximadamente el doble, que el gel menos concentrado, con base en AUC y Cav.

La tolerancia biológica fue excelente en todos los 36 pacientes. El tratamiento no afectó los niveles de FSH, LH, estradiol u hormona progesterona durante los ciclos menstruales. Además, el examen ecográfico de los ovarios al final del tratamiento fue normal en todos los pacientes, mostrando folículos en desarrollo de tamaño normal. Un paciente desarrolló una reacción alérgica al gel y 10 reportaron acné facial (5 de los cuales tenían una historia anterior de acné).

En resumen, este estudio indica que la exposición al 4-hidroxi tamoxifen después de la aplicación tópica se incrementa con la dosis, que las concentraciones en plasma de 4-hidroxi tamoxifen son inferiores que las concentraciones típicas de estradiol (80 pg/mL), y que no hay una evidencia detectable por laboratorio o por clínica de efectos sistémicos.

Ejemplo 4: Demostración de que el 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea produce reducciones relacionadas con la dosis en los índices de proliferación de tejido tumoral

Este estudio demuestra que el 4-hidroxi tamoxifen administrado por vía percutánea produce reducciones relacionadas con la dosis en los índices de proliferación de tejidos tumorales en seno. Es la primera comparación directa del gel de 4-hidroxi tamoxifen con tamoxifen y controles no tratados sobre puntos finales biológicos de cáncer de seno en humanos. Los resultados muestran que la administración percutánea de gel de 4-hidroxi tamoxifen durante 2 – 3 semanas produce reducciones dependientes de la dosis en los índices de proliferación de tejido tumoral (Ki-67 y PCNA) en mujeres postmenopáusicas programadas para sufrir cirugía para el cáncer de seno, con equivalencia aproximada entre la dosis de 2.0 mg/día de 4-hidroxi tamoxifen y la dosis de 20 mg/día de tamoxifen oral. Los niveles de los receptores de estrógeno y progesterona no mostraron reducciones relacionadas con la dosis con el tratamiento de 4-hidroxi tamoxifen. Los niveles en plasma de 4-hidroxi tamoxifen fueron consistentemente más altos en el grupo de tamoxifen oral que en los grupos con gel de 4-hidroxi tamoxifen, y las concentraciones de tejido tumoral de 4-hidroxi tamoxifen se incrementaron con el incremento de la dosis de 4-hidroxi tamoxifen.

El presente estudio también provee información sobre los procesos biológicos que subyacen a los efectos del tamoxifen. El grupo que recibió 2 mg de 4-hidroxi tamoxifen percutáneo mostró el mismo efecto citostático sobre la proliferación de células cancerosas del seno que el grupo de tamoxifen oral a pesar de las concentraciones

marcadamente inferiores en plasma del 4-hidroxi tamoxifen. Este hallazgo muestra que un mayor efecto del tamoxifen es mediado localmente por los sectores de estrógenos en el tejido tumoral.

Diseño de estudio

5 Un estudio en fase IIb en grupos paralelos aleatorio, abierto, fue diseñado para comparar los efectos de tres niveles de dosis de 4-hidroxi tamoxifen, tamoxifen oral y sin tratamiento sobre marcadores de la proliferación tumoral (Ki-67 y PCNA). El antígeno Ki-67 fue detectado por el anticuerpo MIB1 y el PCNA (Antígeno Nuclear de Célula Proliferativa) fue detectado con anticuerpo monoclonal PC-10.

Pacientes

10 Los participantes en el estudio fueron mujeres postmenopáusicas diagnosticadas con cáncer de seno invasivo positivo al receptor de estrógeno, según lo determino la biopsia según Trucut. Los criterios para el reclutamiento incluyeron edades de más de 50 años, cáncer de seno primario positivo al receptor de estrógeno T1 o T2 confirmado, y adecuación para cirugía dentro de 1 mes después de la biopsia. Los pacientes con cáncer inflamatorio, metástasis conocida o participación de nódulos linfáticos fueron excluidos como lo fueron los pacientes con radioterapia o quimioterapia previa y terapia de reemplazo hormonal en marcha (se observó un periodo mínimo de lavado de 8 días antes de la biopsia de Trucut). Otros criterios de exclusión fueron una historia de tromboflebitis que requirieron tratamiento con anticoagulantes, retinopatía, alergia cutánea al alcohol o dermatitis mamaria que contraindica la aplicación de un gel.

15 Los pacientes fueron distribuidos de manera aleatoria en uno de cinco grupos de tratamiento: 0.5 mg/d de 4-OHT (0.5 ml de gel [0.25 mg de 4-OHT] aplicado en cada seno diariamente); 1.0 mg/d de 4-OHT (1 ml de gel [0.5 mg de 4-OHT] aplicado a cada seno diariamente); 2.0 mg/d de 4-OHT (2 ml de gel [1.0 mg de 4-OHT] aplicado a cada seno diariamente); tamoxifen oral (20 mg/d como una dosis individual) o sin tratamiento (control no tratado). Los pacientes fueron programados para la cirugía de recesión tumoral con un intento curativo entre el día 15 y el día 22 después del inicio del tratamiento. Un día antes de la cirugía, se obtuvo también una muestra de sangre para la determinación de las concentraciones de 4-OHT. En el día de la cirugía, los pacientes fueron redefinidos para terapia concomitante, condiciones concomitantes, hematología, bioquímica, 4-OHT en plasma, concentraciones de estrona (E1) y estradiol (E2).

Muestreo del tumor

20 Se utilizó una biopsia Tru-cut/de núcleo tomada en la primera asistencia clínica para propósitos de diagnóstico, como muestra de tumor predistribución aleatoria. Se obtuvo un espécimen postratamiento obtenido en una recesión quirúrgica definitiva. Todas las muestra de tejido fueron fijadas en formalina al 3.7% inmediatamente después de la remoción, luego embebidas en cera de parafina para seccionamiento y subsecuente análisis de los marcadores biológicos. Los extractos de tumor (antes y después del tratamiento) también fueron almacenados en nitrógeno líquido para el ensayo subsecuente de los receptores de estrógeno y progesterona, así como los niveles de 4-OHT.

Análisis de la expresión del marcador tumoral

35 **Expresión del antígeno asociado a la proliferación.** Los índices (LI) de marcación del Ki-67 y del Antígeno Nuclear de Célula Proliferante (PCNA) fueron establecidos sobre secciones embebidas en parafina de los especímenes de tejido pre y post tratamiento. El antígeno KI-67 fue establecido utilizando el anticuerpo monoclonal M1B1 (DAKO, Dinamarca), tal como se utiliza en condiciones de rutina en patología. El anti-PCNA (DAKO) completó el panel de anticuerpos utilizados para analizar la proliferación en tejidos fijados. La detección se hizo sin desnaturalización por calor. Se analizaron seis secciones en serie por caso con el fin de estandarizar el muestreo. El análisis fue llevado a cabo con un sistema asistido por ordenador (Système microphotométrique à balayage automatique; Samba-Alcatel, Grenoble, Francia). Para cada preparación, los umbrales de densidad óptica (OD) fueron determinados utilizando imágenes microscópicas reales del campo analizado como referencia. Las mediciones de inmunotinción fueron llevadas a cabo a x 25. Se analizaron veinte campos para cada sección. La superficie nuclear teñida fue determinada (segmentación y determinación de umbral) y se marcó un LI (células teñidas/elementos contrateñidos). La inmunotinción OD fue expresada en unidades arbitrarias. El control del análisis cuantitativo de la inmunotinción y la reproducibilidad del procedimiento se llevaron a cabo: - por comparación con mediciones repetidas hechas sobre las mismas preparaciones, - por comparación con las mediciones compiladas en seis secciones secuenciales del mismo espécimen. La evaluación de las variaciones en el tejido en el análisis cuantitativo de inmunotinción fueron llevadas a cabo comparando las mediciones de inmunotinción por OD de veinte campos tomadas a partir de secciones no consecutivas para cada espécimen. La intensidad de la inmunoreactividad del PCNA desplegada por las células proliferantes activamente en nódulos linfáticos (centroblastos) sirvió como referencia para los umbrales de tinción positiva en tejidos de seno. Los resultados se expresaron como LI.

55 **Expresión del receptor de estrógeno y progesterona.** Las concentraciones de receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PgR) fueron analizadas en tejido tumoral antes y después del tratamiento bien sea con el ensayo de enlazamiento de ligando (LBA) utilizando el método de dextrano-carbón recubierto (Korenman, 1974) y/o por el

método inmunohistoquímico (ICH) sobre secciones embebidas en parafina. El punto de corte para la positividad de ER fue más de 10 fmol/mg medida utilizando radioinmunoensayo o más de 10% de las células tumorales marcadas con un ensayo inmunoenzimático (Bevitt, 1997).

5 **Ensayo de 4-OHT.** Las concentraciones de 4-OHT en plasma, tejido tumoral y tejido normal fueron llevadas a cabo utilizando cromatografía de gases (GC) combinadas con espectrometría de masas (MS) utilizada en el modo de ionización química con ión negativo (NICI) (Girault, 1993). Los límites de cuantificación del método fueron de 5 pg/ml para el plasma y 50 pg/g para muestras de tejido respectivamente. Los extractos tumorales y el tejido de seno normal obtenidos en el momento de la cirugía (después del tratamiento) fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta el ensayo subsecuente de 4-OHT.

10 Análisis estadístico

15 Con base en el tamaño de muestra planeado de 14 pacientes en el grupo de control y 42 pacientes (3 grupos) asignados al gel de 4-OHT, este estudio tuvo buena capacidad (90%) para detectar un descenso relativo superior al 50% de la hipótesis en el índice de marcación de Ki-67 en el grupo de 4-OHT que en el grupo sin tratamiento utilizando una prueba de dos lados con error tipo I de 5%. El punto final de eficacia primaria cambio en la expresión del marcador de proliferación tumoral. Otras variables del estudio fueron consideradas como puntos finales secundarios. Este análisis "por protocolo" incluyó solamente aquellos que recibieron al menos 13 días de tratamiento, completaron el final del establecimiento de tratamiento para el punto final primario, y no tuvieron desviaciones o violaciones significativas del protocolo.

20 Las comparaciones del grupo de tratamiento fueron hechas utilizando análisis de varianza (ANOVA). La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada en casos donde la distribución de los datos fue no simétrica/no normal. Las variables categóricas fueron analizadas utilizando la prueba exacta de Fisher. Las pruebas de hipótesis fueron llevadas a cabo en el nivel de significado $\alpha = 0.05$ ajustado para comparaciones múltiples. Las interferencias cayeron dentro de las siguientes categorías para las variables medidas: - prueba para interferencias entre los cinco grupos de tratamiento; - examen de diferencias entre los tres niveles de dosis de 4-OHT, y - examen de diferencias entre cada nivel de dosis de 4-OHT y tamoxifen oral.

Resultados

30 **Características de pacientes.** Un total de 55 pacientes fueron reclutados en el ensayo. Seis pacientes fueron excluidos del análisis: uno (en el grupo de 4-OHT 1.0 mg/d) retiró su consentimiento, a uno (0.5 mg/d) no se le pudo hacer seguimiento, uno (2.0 mg/d) fue negativo al receptor de estrógeno al inicio del estudio, uno (0.5 mg/d) recibió terapia de reemplazo hormonal, y dos (0.5 y 1.0 mg/d) descontinuaron su tratamiento después de solamente 6 y 12 días. Por lo tanto, un total de 49 pacientes fue evaluable en cuanto a la eficacia. Los grupos estuvieron bien balanceados con respecto a tamaño de tumor, duración de la amenorrea y grado del tumor en la cirugía. Los pacientes en el grupo de control no tratado eran mayores que los de los grupos de tratamiento activos (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros geográficos de la población estudiada

Variable	Control	Tam Oral (20mg/d)	4-OHT gel (0.5 mg/d)	4-OHT gel (1 mg/d)	4-OHT gel (2 mg/d)	Mediana (min:max)	
						Total	P
N (Pacientes)	11	11	8	9	10	49	
Edad (Años)	72	62	65	64	61.5	65	0.07
	58:88	57:83	54:78	50:70	52:79	50:88	
BMI (kg/m ²)	24.6	25	24.7	25.9	23.6	24.7	0.88
	19.5:33.9	19.7:35.5	20.6:40.4	19.6:30.8	21.5:35.5	19.5:40.4	
Tumor							

35

(continuación)

Variable	Control	Tam Oral (20mg/d)	4-OHT gel (0.5 mg/d)	4-OHT gel (1 mg/d)	4-OHT gel (2 mg/d)	Total	P
Izquierdo	6	3	5	1	8	23	0.018
Derecho	5	8	3	8	2	26	
Amenorrea	21	10	14.7	9	12.5	13.3	0.40
(Años)	5:31.7	5:34	2:23.3	1.33	2:31.2	1:34	
Tamaño del tumor	1.5	1.5	2.0	2.0	1.75	2.0	0.90
(cm)	1.0:2.5	1.0:10.0	1.0:2.5	1.0:3.0	1.0:4.0	1.0:10.0	
Grado							
I	4	3	1	3	4		
II	4	7	6	4	5		
III	3	1	1	2	0	-	-
pN+ espécimen	5 (45%)	4 (36%)	3 (38%)	3 (33%)	5 (50%)	-	-

5 **Expresión de antígeno asociado con la proliferación.** Después de ajustar los niveles de línea base, el LI de Ki-67 del tejido tumoral después del tratamiento difirió significativamente entre los 5 grupos (Tabla 8). Los pacientes tratados (4-OHT [todas las dosis] y tamoxifen oral) tuvieron marcadores de LI Ki-67 promedio significativamente inferiores comparados con el grupo no tratado ($P = 0.0054$). La marcación de LI de Ki-67 promedio después de tratamientos fue dependiente de la dosis para los grupos de tratamiento con 4-OHT. Además, se demostró una relación de respuesta a la dosis con una equivalencia aproximada entre el grupo de 4-OHT 2.0 mg/d y el grupo de tamoxifen oral en la Tabla 9A la cual muestra el porcentaje de pacientes que tuvieron descensos en los LI de KI-67

10 de unidades arbitrarias (%) ≥ 1 , ≥ 2 o ≥ 3 . No hubo diferencias significativas en la marcación de Ki-67 entre tamoxifen y cualquier dosis de 4-OH. La respuesta del tejido tumoral a los diversos tratamientos medidos por LI de PCNA fue paralela a la establecida por el LI de Ki-67 (Tabla 8, 9B). Después del tratamiento, el LI de PCNA del tejido tumoral para los cuatro grupos tratados difirió significativamente, del control no tratado ($P=0.002$). Como se vio con los LI de Ki-67, el porcentaje de pacientes que tuvo descensos en el índice PCNA de ≥ 1 , ≥ 2 o ≥ 3 unidades (%) demostró un fuerte efecto del tratamiento de 4-OHT especialmente en los grupos de 4-OHT 1 y 2 mg/d, con respecto a los

15 controles no tratados y mostró una equivalencia aproximada con tamoxifen oral (Tabla 9B). No hubo diferencias significativas en la marcación de PCNA entre el tamoxifen y cualquier dosis de 4-OHT. La respuesta definida como un tumor que tenía un descenso del LI de PCNA o del LI de Ki-67 de tres unidades arbitrarias demostró una

20 tendencia para incrementarse con la dosis de 4-OHT. Sin embargo, el tamaño de la muestra no fue suficiente para demostrar el significado para la relación.

Tabla 8: Evolución de marcadores proliferativas de acuerdo con el tratamiento

	Control	Tam Oral (20mg/d)	4-OHT gel (0.5mg/d)	4-OHT gel (1 mg/d)	4-OHT gel (2 mg/d)	P*	P**	P***
KI 67	5	6.7	4.1	6.8	6.7	0.44	0.48	0.24
Tru-cut (t)	(2.4:9.0)	(2.5:11.6)	(0.99:12.8)	(3.2:11.3)	(3.5:10.3)			

(continuación)

						Mediana (min : max)		
	Control	Tam Oral (20mg/d)	4-OHT gel (0.5mg/d)	4-OHT gel (1 mg/d)	4-OHT gel (2 mg/d)	P*	P**	P***
KI 67	5.8	2.8	3.3	3.3	3.2	0.0054	0.42	0.98
Tumor(T)	(2.7:12.4)	(1.2:3.7)	(0.8:8.99)	(0.9:6.7)	(2.05:4.8)			
Δ (t-T)	0.28	-3.8	0.8	-4.5	-3.9	-	-	-
	(-2.5:8.4)	(-10.2:1.0)	(-4.1:1.9)	(-5.9:1.1)	(-7:-0.6)			
PCNA	11.4	7.8	7.2	11	6.9	0.12	0.11	0.04
Tru-cut (t)	(3.3:14.7)	(1.8:15.1)	(4.6:9.6)	(5.2:16.2)	(5.9:11.4)			
PCNA	11.9	3.0	4.6	6.3	4.5	0.002	0.19	0.19
Tumor (T)	(3.6:15.2)	(1.4:7.6)	(2.3:5.3)	(4.0:8.2)	(0.7:9.1)			
Δ (t-T)	0.54	-2.9	-2.2	-4.4	-4.2	-	-	-
	(-0.81:2.9)	(-9.4:0.12)	(7.3:0.61)	(-11:2.9)	(-7.4:2.2)			
<p>P* : Prueba de Kruskal-Wallis entre los 5 grupos</p> <p>P** : Prueba de Kruskal-Wallis entre los 4 grupos con Tam oral</p> <p>P*** : Prueba de Kruskal-Wallis entre los 3 grupos con 4-OHT gel</p>								

Tabla 9: Porcentaje de pacientes que exhiben un descenso en el índice de Ki-67/MIB1 (A) o el índice en PCNA (B) de acuerdo con el tratamiento

A

	Control N=11	Tam oral (20mg/d) N=11	4-OHT gel (0.5mg/d) N=8	4-OHT gel (1 mg/d) N=9	4-OHT gel 2 mg/d N=10
≥ 1.0 Unidades de bajo descenso	40%	90%	50%	89%	87%
≥ 2.0 Unidades de bajo descenso	20%	70%	25%	78%	62%
≥ 3.0 Unidades de bajo descenso	0%	60%	25%	56%	62%

(continuación)

	Control N=11	Tam oral (20mg/d) N=11	4-OHT gel (0.5mg/d) N=8	4-OHT gel (1 mg/d) N=9	4-OHT gel 2 mg/d) N=10
B					
	CONTROL N=11	Tam oral (20mg/d) N=11	4-OHT gel (0.5mg/d) N=8	4-OHT gel (1 mg/d) N=8	4-OHT gel (2 mg/d) N=10
≥1.0 Unidades de bajo descenso	0%	73%	75%	87%	78%
≥2.0 Unidades de bajo descenso	0%	73%	50%	87%	78%
≥3.0 Unidades de bajo descenso	0%	45%	37%	75%	67%

- 5 **Expresión de ER.** Utilizando RIA, las concentraciones de ER en pretratamiento fueron estadísticamente similares a través de los grupos con los valores de grupo promedios con una variación de 5 a 56 fmol/mg. Los valores individuales mostraron un amplio rango (9 hasta 321 fmol/mg). El tratamiento de los tumores positivos a ER con tamoxifen o 4-OHT dieron como resultado un descenso significativo (P= 0.012) en la concentración de ER con respecto al grupo de control no tratado. Utilizando ICH la concentración de ER (% de células marcadas) demostró el mismo valor promedio en la línea base (70 a 85%) a través de los grupos y no mostró una tendencia a incrementos significativos estadísticamente después del tratamiento en todos los grupos.
- 10 **Expresión de PgR.** Las mediciones de RIA de PgR estuvieron dispersas en la línea base y se incrementaron después del tratamiento en todos los grupos, sin significado estadístico o un patrón relacionado con la dosis. Los resultados de PgR con mediciones de ICH no indicaron ningún efecto consistente del tratamiento o cambios relacionados con la dosis.
- 15 **Concentraciones de 4-OHT en tejido y plasma. (Tabla 10, figura 3).** La concentración promedio de 4-OHT fue claramente dos veces más alta en el grupo de tamoxifen (4237 pg/g) en comparación con la del grupo de 2.0 mg/d de 4-OHT (1698 pg/g). A pesar de un incremento en las concentraciones promedio de 4-OHT en el tejido (pg/g) de acuerdo con la dosis percutánea suministrada (687, 1377 y 1698 pg/g para 0.5, 1 y 2 mg/d respectivamente), la diferencia entre los tres grupos no fue significativa estadísticamente (P= 0.13). La concentración de 4-OHT en tejido no tumoral fue aproximadamente la mitad de la del tejido tumoral en todos los grupos excepto en el de 0.5 mg/d.
- 20 Para la concentración en plasma promedio de 4-OHT, hubo una diferencia significativa entre los cuatro grupos de tratamiento (P=0.0015) con un nivel alto para el grupo de tamoxifen oral contra los grupos de 4-OHT en gel (1495 pg/ml versus 31, 35 y 164 pg/ml, respectivamente). Adicionalmente, hay un incremento significativo (P=0.035) de 4-OHT en plasma con la dosis percutánea de 4-OHT ascendente.

Tabla 10: Concentración de 4-OHT en tejidos de seno tumorales, normales y plasma

4-OHT	Control n=11	Tam oral (20mg/d) n=11	OHT gel (0.5mg/d) N=8	OHT gel (1.0mg/d) n=9	OHT gel (2.0mg/d) n=10	Promedio (min:max)		
						*	**	***
Tumor pg/g	:	4237 2388:7386	687 83:1978	1377 556:2955	1698 327:5123	-	0.0003	0.13
Seno pg/g	:	2038 1058:4461	528 83:3126	278 73:777	762 141:2080	-	0.0024	0.36
Plasma pg/ml	:	1495 32:1995	31 18:144	35 20:84	164 31:306	-	0.0015	0.035
Plasma E2 pg/ml	9.7	8.28	11	9	20	0.55	-	-
<p>p* : Prueba de Krukal-Wallis entre los 5 grupos</p> <p>p** : Prueba de Kruskal-Wallis entre los 4 grupos con Tam oral</p> <p>p***: Prueba de Kruskall-Wallis entre los 3 grupos con gel de 4-OHT</p>								

Publicaciones citadas

- 5 Barrat, J., B. de Lignier, L. Marpeau, L. Larue, S. Fournier, K. Nahoul, G. Linares, H. Giorgi, and G. Contesso, Effet in vivo de l'administration locale de progestrone sur l'activité mitotique des galactophores humains, J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 19:269-274 (1990) (French).
- Bevitt D, Milton ID, Piggot N , Henry L, Carter MJ, Toms GL, et al. New monoclonal antibodies to estrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry, J. Pathol., 183: 228-32 (1997).
- 10 Bronaugh and Maibach, Percutaneous Absorption: Drugs Cosmetics Mechanisms Methodology, Marcel Dekker 1999.
- Carthew, P., P.N. Lee, R.E Edwards, R.T. Heydon, B.M. Nolan, E.A. Martin, Cumulative exposure to tamoxifen : DNA adducts and liver cancer in the rat, Arch. Toxicol., 75: 375-80 (2001).
- Charlier, C., A. Chariot, N. Antoine, M.P. Merville, J. Gielen, V. Castronovo, Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells, 49(3): 351-8 (1995).
- 15 Chetrite , G., C. Varin, L. Delalonde, J.R. Pasqualini, Effect of promegestone, tamoxifen, 4-hidroxitamoxifen and ICT 164,384 on the oestrone sulphatase activity of human breast cancer cells, Anticancer Res., 13(4) 931-4 (Jul-Aug. 1993).
- Dietze, E.C., L.E. Caldwell, S.L. Grupin, M. Mancini, and V.L. Seewald, Tamoxifen, but not 4-hidroxitamoxifen initiates apoptosis in p53(-) normal human mammary epithelial cells by inducing mitochondrial depolarization, J. Biol. Chem., 276(7): 5384-94 (Feb. 16, 2001).
- 20 Fentiman, I.S., Tamoxifen and mastalgia. An emerging indication, Drugs 32: 477-80 (1986).
- Fentiman, I.S., M. Caleffi, H. Hamed, and M.A. Chaudary, Dosage and duration of tamoxifen treatment for mastalgia: a controlled trial, British Journal of Surgery 75: 845-46 (1988).
- 25 Fentiman, I.S., M. Caleffi, H. Hamed, and M.A. Chaudary, Studies of tamoxifen in women with mastalgia, British Journal of Clinical Practice, Supplement 68, 43(11): 34-36(1989)

- Fischer, W., K. Klokkers, A. Sendl-Lang, Transdermal system in the form of a patch comprising a tamoxifen derivative, U.S. Patent 5,904,930.
- Gerdes, J., H. Lenke, Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67, *J. Immunology*, 133: 1710-15 (1984).
- 5 Giambiagi, N. and J.R. Pasqualini, Immunological differences between the estradiol-, tamoxifen and 4-hidroxitamoxifen estrogen receptor complexes detected by two monoclonal antibodies, *J. Steroid Biochem.*, 30(1-6): 213-7 (1988).
- Girault J, Istin B, Fourtillan J.B. Quantitative measurement of 4-Hidroxi Tamoxifen in human plasma and mammary tumours by combined Gas Chromatography/Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Biol. Mass. Spectrom.*, 22:395-402 (1993).
- 10 Gura, T, Systems for identifying new drugs are often faulty, *Science*, 278: 1041-42 (1997).
- IBIS Investigators, First results from the International Breast Cancer Intervention Study (IBIS-I): a randomised prevention trial, *Lancet*, 360(9336): 817-24 (2002).
- Jordan, V.C., Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2(2) 123-38 (1982).
- 15 Korenman SG, Stevens RH, Carpenter LA, Robb M, Niswender GD, Sherman BM. Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values, *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 38:718-20 (1974).
- Kuiper, G.G.J.M., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Heggblad, S. Nilsson, J. Gustafsson, Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β , *Endocrinology*, 138:863-870 (1997).
- 20 Kuttenn, F. and P. Mauvais-Jarvis, Intratumoral levels and metabolism of 4-hidroxitamoxifen after percutaneous administration at the breast level, *C.R. Acad. Sci. III*. 300:457-462 (1985) (French).
- Malet C., A. Gompel, P. Spritzer, N Bricourt, NH Yaneva, I. Mowszowicz, F. Kuttenn and P Mauvais Jarvis, Tamoxifen and hidroxitamoxifen isomers versus estradiol effects on normal human breast cells in culture, *Cancer Research*, 48: 7193-7199 (1988).
- 25 Malet, C., P. Spritzer, C. Cumins, D. Guillaumin, P. Mauvais-Jarvis, F. Kuttenn, Effect of 4-hidroxitamoxifen isomers on growth and ultrastructural aspects of normal human breast epithelial (HBE) cells in culture, *J. Steroid Biochem. & Mol. Bio.*, 82: 289-96 (2002).
- Mauvais-Jarvis, P., N. Baudot, D. Castaigne, P. Banzet, and F. Kuttenn, Trans-4-hidroxitamoxifen concentration and metabolism after local percutaneous administration to human breast, *Cancer Research*, 46:1521-1525 (1986).
- 30 Murphy, C.S., S.M. Langan-Fahey, R. McCague, and V.C. Jordan, Structure-function relationships of hidroxilated metabolites of tamoxifen that control the proliferation of estrogen-responsive T47D breast cancer cells in vitro, *Mol. Pharmac.* 38:737-743 (1990)
- Nemani M, Linares-Cruz G, Bruzzoni-Giovanelli H, Roperch JP, Tuynder M, Bougueleret L, et al. Activation of the human homologue of the *Drosophila* sina gene in apoptosis and tumor suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 9039-42 (1996).
- 35 Nomura, Y., H. Tashiro, F. Takaeko, Effects of antiestrogens and medroxioprogesterone acetate on the clonogenic growth of tamoxifen-sensitive and resistant human breast cancer cells, *Jpn. J. Cancer Chemotherapy*, 12(4): 844-50 (1985).
- Pujol, H., J. Girault, P. Rouanet, S. Fournier, J. Grenier, J. Simony, J.B. Fourtillan, and J.L. Pujol, Phase 1 study of percutaneous 4-hidroxi-tamoxifen with analyses of 4-hidroxi-tamoxifen concentrations in breast cancer and normal breast tissue, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36:493-498 (1995).
- 40 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 836-858.
- 45 Robertson and Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.*, 47: 2387 (1982).

- Robertson, D.W., J.A. Katzenellenbogen, D.J. Long, E.A. Rorke and B.S. Katzenellenbogen, Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen, *J. Steroid Biochemistry*, 16(1):1-13 (1982).
- 5 Sauvez, F., D. Salin-Drouin, M. Attia, H. Bertheux, and R. Forster, Cutaneously applied 4-hydroxitamoxien is not carcinogenic in female rats. *Carcinogenesis*, 20: 843-50 (1999).
- Schluter, C., M. Duchrow, C. Wohlsensberg, MHG Becker, G. Key, H.D. Flag, The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements representing a new kind of cell maintaining proteins, *Cell Biology*, 123: 513-22 (1993).
- 10 Waseem, N.H., D.P. Lane, Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Structural conservation and the detection of the nucleolar form, *J. Cell. Sci.*, 96: 121-9 (1990).
- Wijayaratne, A.L., S.C. Nagel, L.A. Paige, D.J. Christensen, J.D. Norris, D.M. Fowlkes, and D.P. McDonnell, Comparative Analyses of Mechanistic Difference among Antiestrogens, *Endocrinology*, 140(12): 5828-5840 (1999).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para administración percutánea para uso en el tratamiento de cáncer de seno, comprendiendo dicha composición farmacéutica 4-hidroxi tamoxifen y miristato de isopropilo como mejorador de la penetración.
- 5 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica contiene una cantidad de 4-hidroxi tamoxifen de tal forma que aproximadamente 0.25 a 2.0 mg/seno, preferiblemente aproximadamente 0.5 a 1.0 mg/seno de dicho 4-hidroxi tamoxifen pueden ser administrados a un paciente por día.
- 10 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con una de la reivindicaciones 1-2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde dicho medicamento contiene una cantidad de 4-hidroxi tamoxifen de tal manera que aproximadamente 0.25 mg/seno, preferiblemente aproximadamente 0.5 mg/seno, más preferiblemente aproximadamente 0.75 mg/seno, aún más preferiblemente aproximadamente 1.0 mg/seno, de dicho 4-hidroxi tamoxifen pueden ser administrados por día.
- 15 4. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho cáncer de seno es positivo al receptor de estrógeno.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica está en una forma seleccionada del grupo que consiste de un gel hidroalcohólico, una solución hidroalcohólica, un parche, un ungüento, una crema, una emulsión, una loción, un polvo o un aceite.
- 20 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho 4-hidroxi tamoxifen es formulado en una solución alcohólica.
7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho 4-hidroxi tamoxifen es formulado en un gel hidroalcohólico.
- 25 8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en tratamiento de cáncer de seno de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho gel hidroalcohólico comprende alcohol etílico, miristato de isopropilo, e hidroxipropilcelulosa.
9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es una composición hidroalcohólica que contiene miristato de isopropilo como un mejorador de la penetración, un vehículo acuoso, un vehículo alcohólico y un agente gelificante.
- 30 10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente neutralizante.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde dicha composición farmacéutica comprende:
 - a) aproximadamente 0.01% a 0.1% en peso de 4-hidroxi tamoxifen,
 - 35 b) aproximadamente 0.5% a 2% en peso de miristato de isopropilo,
 - c) aproximadamente 65% a 75% en peso de alcohol,
 - d) aproximadamente 25% a 35% en peso de vehículo acuoso,
 - e) aproximadamente 0.5% a 5% en peso de agente gelificante,
 en donde el porcentaje de los componentes son peso a peso de la composición.
- 40 12. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer de seno.

Figura 1: Representación del Metabolismo de Tamoxifen

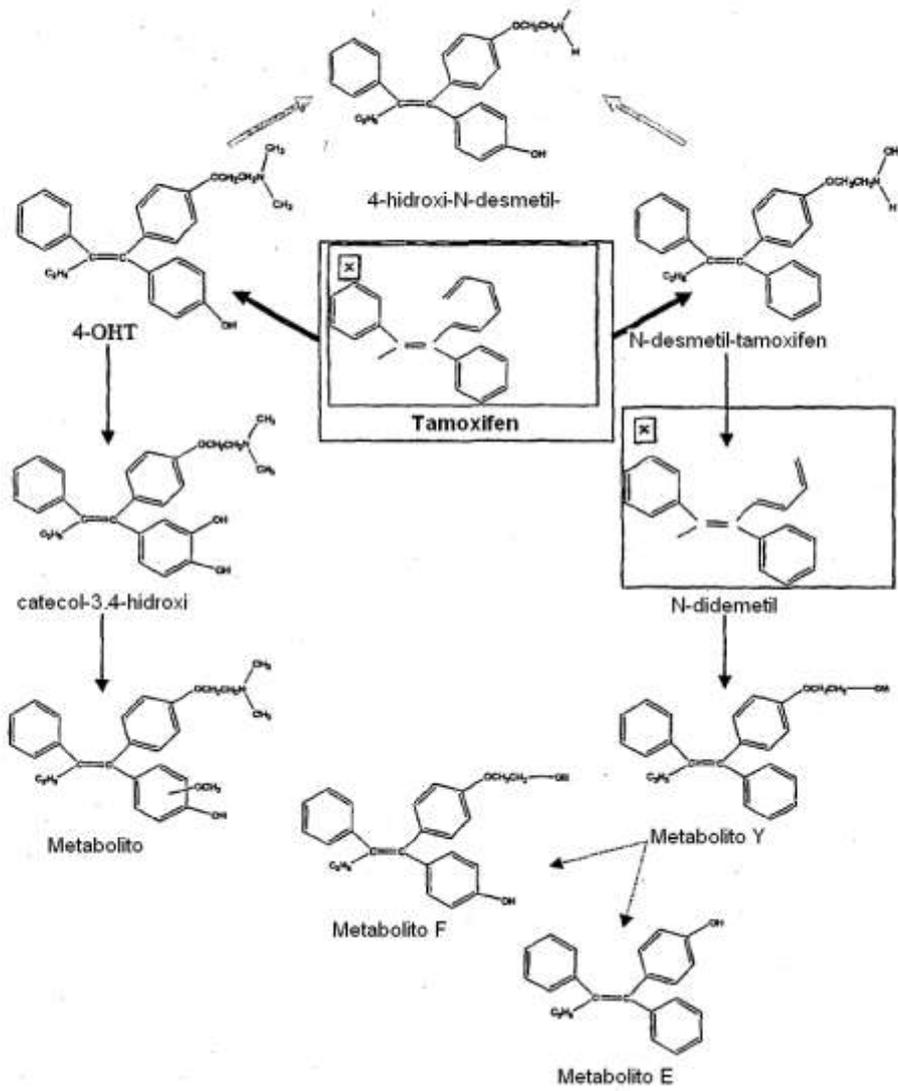


Figura 2: Concentración Media \pm SD en plasma de 4-hidroxi tamoxifen en Mujeres Sanas Después de la Última Administración Cutánea (Día 25 del Segundo Ciclo)

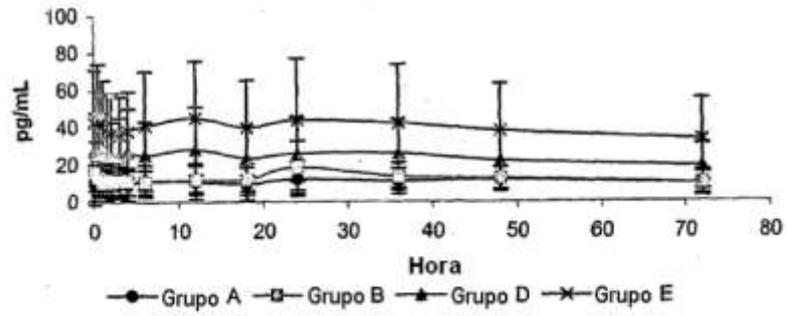
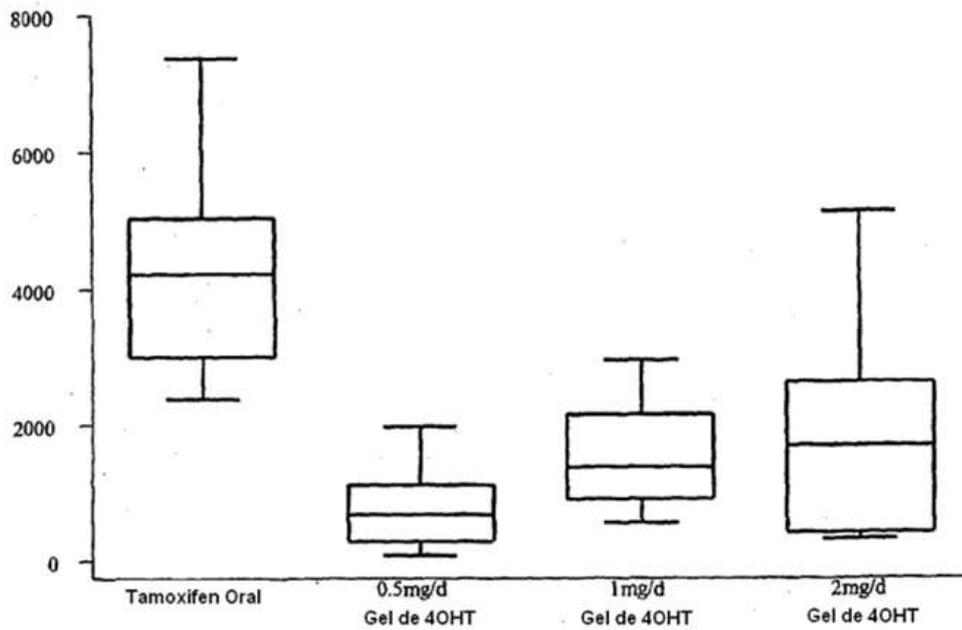


Figura 3: Concentración en tejido tumoral de 4 OHT de acuerdo con la forma y dosis de administración

La parte superior e inferior de cada recuadro representa los percentiles 75° y 25°, respectivamente. La línea horizontal dentro de los recuadros representa el percentil 50° (mediana) y el final de cada "diagrama de caja" los percentiles 10° y 90°.

A: Concentración en tejido tumoral de 4-OHT (pg/g)



B : Niveles en plasma de 4-OHT (pg/ml)

