



PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

10-35469

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: FORMULACIÓN QUE CONTIENE UN COMPUESTO INHIBIDOR DE
QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA Y MÉTODO PARA TRATAR TUMORES
UTILIZANDO EL MISMO

SOLICITANTE: SCHERING CORPORATION

DIRECCIÓN: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 25 de Marzo de 2010

P2010/000034

Cond
17-04-2010
Nº Exch

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-035469-00000-0000

Fecha: 2010-03-25 17:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000034

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: SCHERING CORPORATION

Dirección: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth,
NJ 07033-0530 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARE

Dirección: World Trade Center, Torre A, Calle
100 No. 8A-37 Piso 10.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/010778

Fecha Septiembre 16, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/038701

Fecha Marzo 26, 2009

6

Título (54) FORMULACIÓN QUE CONTIENE UN COMPUESTO INHIBIDOR DE
QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA Y MÉTODO PARA TRATAR TUMORES
UTILIZANDO EL MISMO

Clasificación Internacional (51) A61K 9/08, A61K 31/519, A61P 35/00, A61K 47/12

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Septiembre 17, 2007

Octubre 17, 2007

May 16, 2008

(31) Número de Solicitud

60/994.185

60/999.469

61/053.784

9

Comprobante de pago No. 10-

Fecha Marzo 25 de 2010

10

ANEXOS

2

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver Exp. N° 08-034.063

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

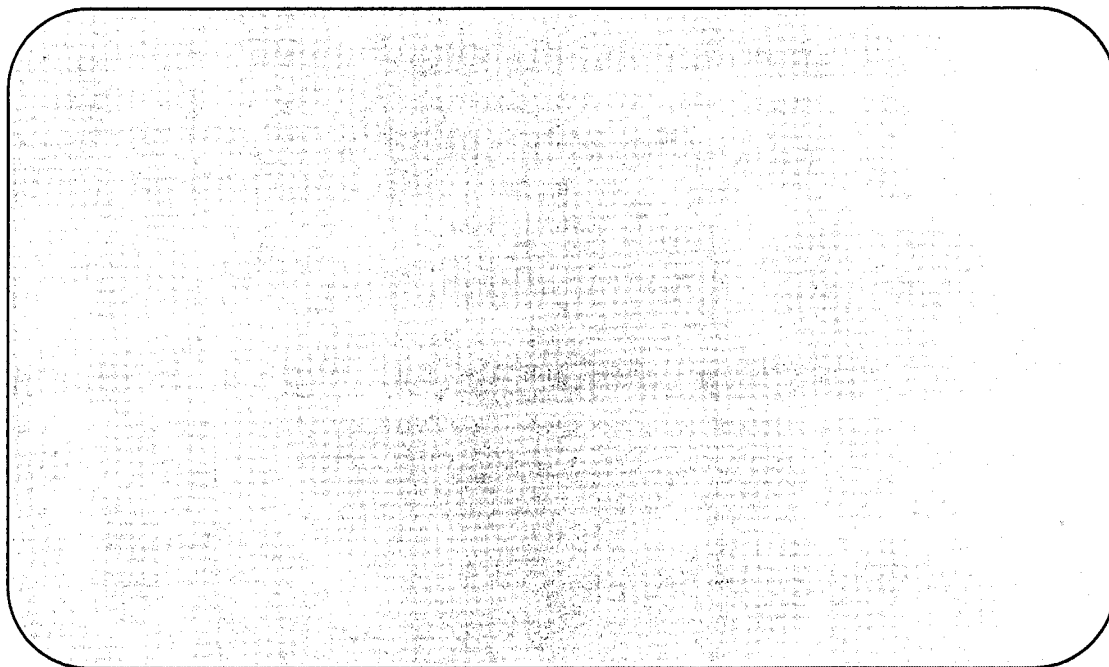
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2008/010778

1. Valentyn ANTOCHSHUK,
207 Rankin Avenue, Cranford,
New Jersey 07016
Estados Unidos
Nacionalidad: Ucraniano

2. Rajat BANNERJI,
185 Lake Road, Morristown,
New Jersey 07960
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

3. Anita DABBARA,
23 East Kincaid Court,
Princeton Junction,
New Jersey 08550
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

4. Paul KIRSCHMEIER,
106 Culberson Road, Basking Ridge,
New Jersey 07920
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

5. David A. PARRY,
1759 Begen Avenue, Mountain View,
California 94040
Estados Unidos
Nacionalidad: Británico

6. Mohammed SHAMEEM,
4 Surim Court, Nanuet,
New Jersey 10954
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

7. Paul STATKEVICH,
16 Barbieri Court, Raritan,
New Jersey 08869
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

8. Siu-Long YAO,
14 Marian Drive, West Windsor,
New Jersey 08550
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 23,448
FECHA : MARZO 25 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-035469- -00000-0000

Fecha: 2010-03-25 17:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325578492	25/03/2010	3,794,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SCHERING CORPORATION**

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento Público
2. ha sido firmado por Marguerite La Corte
3. Quien ejerce funciones de Notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de Marguertie La Corte Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 29 de agosto 2003
7. Por John E. McCormac Contador Publico- Tesorero de Nueva Jersey
8. No. A 180345
9. Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma legible de John M.

PODER DE REPRESENTACIÓN

Bilingüe inglés- español otorgado en Kenilworth, Nueva Jersey, Estados Unidos, el 7 de agosto de 2003 y firmado por Edward H. Mazer - Director Juridico senior.

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, fechado el 7 de agosto, 2003 certificando las funciones de Edward H. Mazer - Director Juridico senior, de Schering Corporation.

Las certificaciones anteriores se basan en el Poder de representación fechado el 4 noviembre de 2002.

Sello: Marguerite La Corte- Notario público,
Estado de Nueva Jersey
Su comisión vence el 7 de octubre de 2003.
Sello en alto relieve del Notario Público

Es traducción fiel del inglés, con
confrontación. Bogotá 5 septiembre, 2003.

copia archivo, para
Marlén Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

6

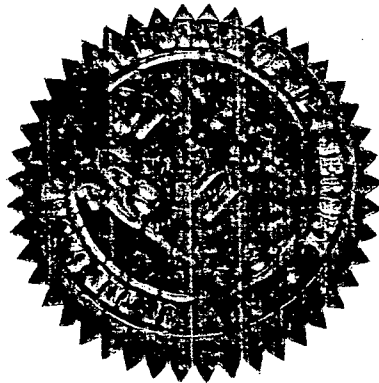
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARGUERITE LA CORTE
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARGUERITE LA CORTE, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 29TH DAY OF AUGUST 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A180345
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,
SCHERING CORPORATION

domiciled in
2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0532, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en
por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:



Edward H. Mazer, Senior Legal Director

Date/Fecha:

August 7, 2003

City/Country/Ciudad, País: **Kenilworth, New Jersey, U.S.A.**

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date, **August 7, 2003**

The undersigned Notary Public certifies:

1. That **Edward H. Mazer**

of legal age and domiciled in

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Senior Legal Director of SCHERING CORPORATION**

3. That **SCHERING CORPORATION**

having its principal place of business located in

2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0530, U.S.A.

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Power of Attorney, dated November 4, 2002.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

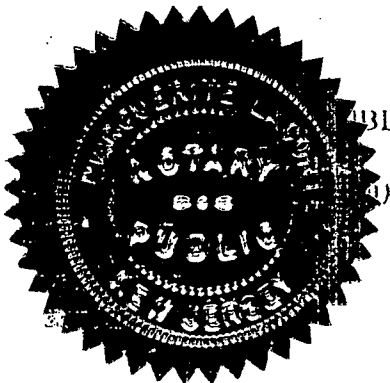
4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):



PUBLIC (Signature):

Marguerite La Corte

Marguerite La Corte

Notary Public of New Jersey

My Commission Expires October 7, 2003

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 March 2009 (26.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/038701 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 9/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/010778

(22) International Filing Date:

16 September 2008 (16.09.2008)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/994,185 17 September 2007 (17.09.2007) US
60/999,469 17 October 2007 (17.10.2007) US
61/053,784 16 May 2008 (16.05.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING CORPORATION** [US/US]; 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ANTOCHSHUK, Valentyn** [UA/US]; 207 Rankin Avenue, Cranford, New Jersey 07016 (US). **BANNERJI, Rajat** [US/US]; 185 Lake Road, Morristown, New Jersey 07960 (US). **DABBARA, Anita** [US/US]; 23 East Kincaid Court, Princeton Junction, New Jersey 08550 (US). **KIRSCHMEIER, Paul** [US/US]; 106 Culberson Road, Basking Ridge, New Jersey 07920 (US). **PARRY, David, A.** [GB/US]; 1759 Begen Avenue, Mountain View, California 94040 (US).

SHAMEEM, Mohammed [US/US]; 4 Surim Court, Nanuet, New York 10954 (US). **STATKEVICH, Paul** [US/US]; 16 Barbieri Court, Raritan, New Jersey 08869 (US). **YAO, Siu-Long** [US/US]; 14 Marian Drive, West Windsor, New Jersey 08550 (US).

(74) Agent: **GRUPPI, Carol, M.**; Schering Corporation, 2000 Galloping Hill Road, Patent Dept. K-6-1 1990, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: FORMULATION CONTAINING CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITING COMPOUND AND METHOD OF TREATING TUMORS USING THE SAME

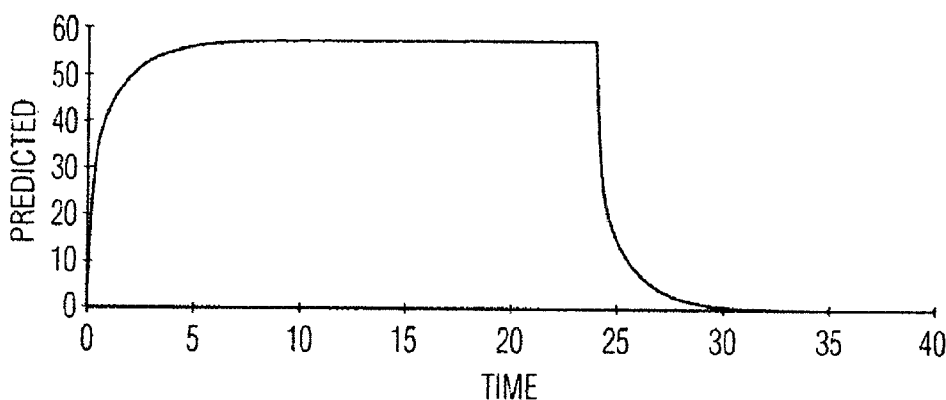


FIG. 1

(57) Abstract: This application discloses a novel formulation containing a 3-amino-4-substituted pyrazole derivative which has cyclin-dependent kinase inhibiting properties, and a method of treating tumors using the novel formulation.



Declaration under Rule 4.17:

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

17

**FORMULATION CONTAINING CYCLIN-DEPENDENT KINASE
INHIBITING COMPOUND AND METHOD OF TREATING TUMORS
USING THE SAME**

This application claims the benefit of priority under 35 USC 119(e) of provisional patent applications U.S.S.N.: 60/994,185 filed September 17, 2007, U.S.S.N.: 60/999,469 filed October 17, 2007 and U.S.S.N.: 61/053,784 filed May 16, 2008, the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

Field of the Invention

This application discloses a novel formulation containing a 3-amino-4-substituted pyrazole derivative which has cyclin-dependent kinase inhibiting properties, and a method of treating tumors using the novel formulation.

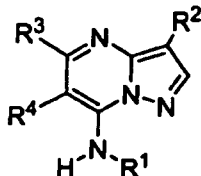
Background of the Invention

Identification of any publication in this section or any section of this application is not an admission that such publication is prior art to the present invention.

The mammalian cell cycle is a non-redundant process that integrates extracellular signaling, DNA synthesis, and mitosis. Disregulation of cell cycle control is a hallmark of all human cancers and is frequently associated with aberrant activation/regulation of cyclin-dependent kinases, also termed herein for convenience, CDKs. The lack of cell cycle regulation in tumor cells is believed to increase the propensity of apoptosis in tumor cells compared to normal tissue. Accordingly, specific CDK inhibitors may preferentially kill tumor cells while inducing only reversible cell cycle arrests within normal proliferating compartments. Tumor cell apoptosis may be achievable without mutagenic effect to normal tissue. Therefore, identification of compounds inhibiting essential, rate-limiting activities of CDK2 and CDK1 presents an attractive therapeutic strategy for treatment and management of oncology indications.

Compounds having cyclin-dependent kinase inhibiting properties (CDK inhibitors) and which contain a 3-amino-4-substituted pyrazole derivative structure are described in U.S. Patent No. 7,119,200 to Guzi et al. (herein, "the '200 patent" and herein incorporated by reference in its entirety), issued October 10, 2006. Efficient

syntheses of these CDK-inhibiting compounds, for example, the compounds of Formula I, are described in published U.S. application no. 2006/0281756 (the '756 publication, herein incorporated by reference in its entirety),

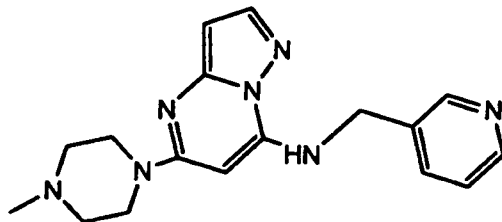


Formula I

- 5 wherein, R¹, R², R³, and R⁴ are as defined in the '756 publication, which is incorporated herein in its entirety by reference.

The compounds of Formula I are useful in the therapy of proliferative diseases, for example, cancerous tumors.

- 10 As described in the '200 patent, which is incorporated by reference herein in its entirety, 2-(quinolin-5-yl)-4,5 disubstituted-azole derivatives of Formula I have been shown to have CDK inhibition activity with desirable IC₅₀ values using *in vitro* CDK2 inhibition tests and curve-fitting calculations. For example, the compound of Formula Ia, wherein, with reference to Formula I, R¹ is pyridin-3-yl-methylamine, R² is hydrogen, R³ is 1-methyl-piperazine, and R⁴ is hydrogen, has been shown to have a
15 calculated IC₅₀ value of 5.6 micromolar for CDK receptor sites (see Table 87 in the '200 patent in Col. 706, Example 1).

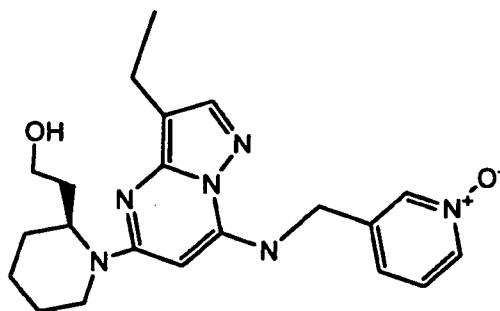


Formula Ia

- 20 Other compounds having the structure of Formula I, for example, the compound of Formula II, wherein, with reference to Formula I, R¹ is 3-methyl-pyridine N-oxide, R² is ethyl, R³ is 2-piperidin-2-yl-ethanol, and R⁴ is hydrogen (see Example 1000 in the '200 patent beginning in Col. 667), also have useful CDK inhibition activity. The compound of Formula II is useful in inhibiting tumors, including, but not limited to, proliferation, angiogenesis and/or metastasis.

13

3



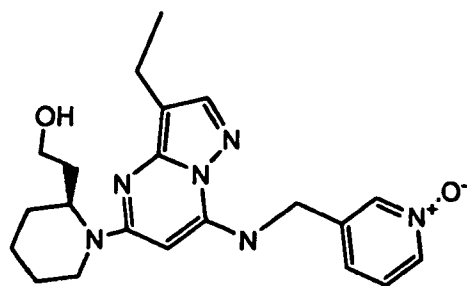
Formula II,

By way of example, the compound of Formula II may be useful in the treatment of a variety of cancers, including (but not limited to) the following: carcinoma, including that of the bladder, breast, for example breast cancer, colon, for example, colo-rectal cancer, kidney, bile duct, liver, lung, for example, small cell lung cancer and non small cell lung cancer, esophagus, gall bladder, pancreas, stomach, cervix, thyroid, prostate, ovarian cancer, vulvar cancer, peritoneal cancer, pseudomyxoma peritonei, and skin, for example, melanoma, and squamous cell carcinoma; hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia (CLL), B-cell lymphoma T-cell lymphoma, Hodgkins lymphoma, non-Hodgkins lymphoma [e.g., mantle cell lymphoma (MCL)], hairy cell lymphoma and Burkett's lymphoma; hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome and promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and rhabdomyosarcoma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma and schwannomas; and other tumors, including, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoacanthoma, thyroid follicular cancer and Kaposi's sarcoma.

Objectives and Summary of the Invention

What is needed is a pharmaceutical formulation whereby compounds of Formula I having useful CDK inhibition activity can be administered to a patient in need of a therapeutic treatment in which administration of such compounds would be beneficial in the management or treatment of a disease state, for example, the management or treatment of tumors. These and other objectives and/or advantages are provided by the present invention.

One preferred aspect of the present invention is the provision of a concentrated pharmaceutical formulation containing the compound of Formula II,



Formula II,

which can be adapted for administration to a mammal in need of treatment having a tumor responsive to the compound of Formula II, the formulation comprising the compound of Formula II, citric acid, sodium citrate and water at a pH of from about pH 2.5 to about pH 7.0. In one preferred embodiment, the buffered solution has a pH of from about 3.4 to about 5. In some embodiments it is preferred to use a mole ratio of the compound of Formula II : sodium citrate : citric acid of 1 mole of the compound of Formula II : 3.66 moles of sodium citrate : 8.8 moles of citric acid. In some embodiments it is preferred for the formulation to comprise an aqueous solution containing on a wt./vol. basis: (a) 5 mg/ml of the compound of Formula II; (b) 21.4 mg/ml citric acid; and (c) 11.4 mg/ml sodium citrate dehydrate optionally admixed with hydrochloric acid and/or sodium hydroxide sufficient to adjust the pH of the concentrate to a pH of from about pH 2.5 to about pH 7.0, preferably the pH is adjusted to a pH of from about pH 3.0 to about pH 4.0, more preferably the pH is adjusted to about pH 3.5.

Another preferred aspect of the invention is an IV-infusible formulation comprising the compound of Formula II in a buffered solution having a pH of from about pH 2.5 to about pH 7.0, the formulation provides at least one PK behavior at a dosage indicated in accordance with those at shown in Figure 2A and/or 2B and/or in Table V, when infused into a human at the indicated dosage levels. In one preferred embodiment, the buffered solution has a pH of from about 3.4 to about 5. Preferably, the formulation provides at least one of the AUC/dose curves illustrated in Figures 2A and/or 3 when infused at the dosage level shown for each curve in a 2-hour infusion.

Another preferred aspect of the invention is an IV-infusible formulation comprising the compound of Formula II in a buffered solution having a pH of from about pH 2.5 to about pH 7.0, the formulation provides at least one PK behavior at a dosage indicated in accordance with those at shown in Figure 2C and/or Table VI, when infused into a human at the indicated dosage levels. Preferably, the formulation

provides at least one of the AUC/dose curves illustrated in Figure 2C when infused at the dosage level shown for each curve in a 2-hour infusion. In one preferred embodiment, the buffered solution has a pH of from about 3.4 to about 5.

Another preferred aspect of the invention is the provision of a formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides the PK profile shown in Figure 2A, 2B, and/or 2C upon IV infusion into a human. Preferably the formula comprises a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of: 1 mole of the compound : 8.8 moles of organic acid : 3.7 moles of conjugate salt. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 1.85 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.15 hours, a C_{max} of about 77 ng/ml, and/or an AUC of about 181 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 3.7 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.75 hours, a C_{max} of about 136 ng/ml, and/or an AUC of about 336 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 7.4 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.86 hours, a C_{max} of about 353 ng/ml, and/or an AUC of about 994 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 14.8 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.78 hours, a C_{max} of about 396 ng/ml, and/or an AUC of about 1053 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 29.6 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.79 hours, a C_{max} of about 1020 ng/ml, and/or an AUC of about 2531 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 41.4 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.8 hours, a C_{max} of about 1343 ng/ml, and/or an AUC of about 3041 ng hr/mL. More preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 50 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 2.9 hours, a C_{max} of about 1820 ng/ml, and/or an AUC of about 4050 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 58 mg/M² having a $t_{1/2}$ of about 3.2 hours, a C_{max} of about 1460 ng/ml, and/or an AUC of about 3290 ng hr/mL.

Table VIII is a cumulative representation of the data in Tables V, VI and VII with an expansion in patient numbers at certain doses as indicated in Table VIII. Another embodiment is the provision of a formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides the PK profile shown in Figure 2A, 2B, and/or 2C upon IV infusion into a human. Preferably the formula

comprises a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of:
1 mole of the compound : 8.8 moles of organic acid : 3.7 moles of conjugate salt..

Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
1.85 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.29 hours, a C_{max} of about 91 ng/ml, and/or an AUC

5 of about 211 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour
infusion of a dose comprising 3.7 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.75 hours, a C_{max} of
about 136 ng/ml, and/or an AUC of about 336 ng hr/mL. Preferably the formulation
provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 7.4 mg/M² having a t_{1/2} of
about 2.86 hours, a C_{max} of about 353 ng/ml, and/or an AUC of about 972 ng hr/mL.

10 Preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
14.8 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.78 hours, a C_{max} of about 396 ng/ml, and/or an
AUC of about 1050 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a two hour
infusion of a dose comprising 29.6 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.98 hours, a C_{max} of
about 890 ng/ml, and/or an AUC of about 2430 ng hr/mL. Preferably the formulation

15 provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 41.4 mg/M² having a t_{1/2} of
about 2.8 hours, a C_{max} of about 1300 ng/ml, and/or an AUC of about 2890 ng hr/mL.

More preferably the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose
comprising 50 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.9 hours, a C_{max} of about 1820 ng/ml,
and/or an AUC of about 4090 ng hr/mL. Preferably the formulation provides a PK for a
20 two hour infusion of a dose comprising 58 mg/M² having a t_{1/2} of about 3.2 hours, a
C_{max} of about 1460 ng/ml, and/or an AUC of about 3300 ng hr/mL.

In some embodiments it is preferred to prepare the concentrate by providing a
solution containing an organic acid and its conjugate salt, dissolve the desired amount
of the compound of Formula II therein, titrate the resulting solution with aqueous acid
25 and aqueous base until the solution containing the compound of Formula II attains the
desired pH, and optionally diluting the buffered solution with water or an aqueous
solution, for example, a saline solution, to achieve the desired concentration of the
compound of Formula II. In one preferred embodiment, the buffered solution has a pH
of from about 3 to about 5. In some embodiments it is preferred to prepare the solution
30 used to prepare the concentrate from an organic acid and conjugate salt selected from
citric acid/sodium citrate and lactic acid/sodium lactate.

In one aspect the present invention comprises treating or managing a disease
state by administering the concentrate, or a diluted form of the concentrate, to a

17

mammal in need thereof, preferably by admixing the concentrate with the contents of a Normal Saline USP IV bag, preferably a standard 250 ml saline IV bag, to provide a medicament suitable for intravenous infusion. In some embodiments it is preferred to admix a sufficient quantity of the concentrate to provide from about 0.92 micrograms of the compound of Formula II/ml of saline solution to about 372 micrograms of the compound of Formula II/ml of saline solution.

In some embodiments, an amount of the diluted concentrate is administered to a mammal in need of treatment equal to from about 0.33 mg/m² to about 58 mg/m² of the compound of Formula II, preferably from about 0.33 mg/m² to about 58 mg/m² of the compound of Formula II, more preferably from about 50 mg/m² to about 58 mg/m² of the compound of Formula II. In some embodiments it is preferred to administer about 50 mg/m² of the compound of Formula II. In some embodiments it is preferred to administer the diluted concentrate by IV infusion.

In some embodiments it is preferred to administer by IV infusion the amount of diluted concentrate necessary to provide the desired amount of the compound of Formula II over a period of from about 1 hour to about 24 hours. In some embodiments administering an IV infusion comprising a dose of from about 0.33 mg/m² of the compound of Formula II to about 58 mg/m² of the compound of Formula II it is preferred to administer the infusion over a period of about 2 hours. In some embodiments it is preferred to administer to a mammal in need of therapy an amount of diluted concentrate necessary to provide a dose of 14.8 mg/m² of the compound of Formula II at an infusion rate that yields a steady state plasma concentration of about 58 ng/ml, preferably at a rate that delivers the diluted concentrate over a period of 24 hours.

In certain preferred embodiments, compound of Formula II is administered in one or more cycles at the desired dose density. In one preferred embodiment, the compound of Formula II is administered in a 28-day cycle comprising once weekly administration of the compound of Formula II for three weeks with one week off. In another preferred embodiment, the compound of Formula II is administered in a 21-day cycle comprising administration at Day 1 followed by 20 days off.

Brief Description Of The Figures

Figure 1 presents a graph estimating the concentration(ng/ml) versus time(hours) profile for a 24 hour infusion of a solution comprising 14.8 mg/m² of the compound of Formula II.

5 Figure 2A presents a graph showing C_{max} and mean concentration/time profiles in volunteer human patients receiving one of 9 different 2-hour IV infusion - administered doses of the present formulation in an amount ranging from 0.33 mg/m² to 41.4.6 mg/m² of the compound of Formula II over a 12 hour time period.

10 Figure 2B presents a graph showing mean concentration/time profiles in volunteer human patients receiving one of 9 different 2-hour IV infusion -administered doses of the present formulation ranging from 0.33 mg/m² to 41.4 mg/m² of the compound of Formula II over a 24 hour time period.

15 Figure 2C presents a graph showing mean concentration/time profiles in volunteer human patients receiving one of 8 different 2-hour IV infusion -administered doses of the present formulation in an amount ranging from 1.85 mg/m² to 58 mg/m² of the compound of Formula II over a 12 hour time period.

Figure 3 presents a graph showing exposure in healthy human volunteers for a series of doses of the present formulation containing an amount of the compound of Formula II ranging from 0.33 mg/m² to 41.4 mg/m² administered by 2 hour infusion IV.

20 Figure 4 presents a graph showing the effects of various dosing regimes of the compound of Formula II on tumor volume suppression in A549 NSCLC mouse xenograft models.

Figure 5 presents a graph showing the binding affinity of the compound of Formula II to Cyclin A/CDK2 complexes.

25 Figure 6 presents a graph showing the inhibition effect of the compound of Formula II in A2780 mouse xenograft ovarian cancer model.

Figure 7 presents micrographs of typical hair follicles harvested from nude mice exposed to dosages of the compound of Formula II, demonstrating suppression of phospho-Rb within the proliferating epithelial cells of the basal epithelium and hair follicles.

30 Figure 8 presents a graph showing concentration/time profiles for a patient administered by 2 hour IV infusion a dose of the compound of Formula II in the amount of 1.85 mg/m² as observed on days 1 and 15 of a 28 day dosing cycle.

19

Figures 9A and 9B present individual patient PK profiles over 24 hours after receiving IV infusion dosages of the compound of Formula II in the amounts of 29.8 mg/m² and 41.4 mg/m² respectively.

Figure 10 presents data showing the effect of various dosage levels of the compound of Formula II on BrdU incorporation in *ex vivo* blood samples.

Figure 11 presents a chart showing falling levels of biomarkers in a patient diagnosed with pseudomyxoma peritonei after receiving 6 cycles of IV infusion dosages of the compound of Formula II.

Figures 12A and 12B present data showing the effect of various dosage levels of the compound of Formula II on BrdU incorporation in *ex vivo* blood samples.

Figure 13 presents data showing the percentage inhibition of BrdU incorporation at an 8 hour timepoint following exposure to various dosage levels of the compound of Formula II in *ex vivo* blood samples.

Detailed Description of the Invention

As mentioned above, compounds of Formula II (defined herein) have activity as useful pharmaceutical compounds having cyclin-dependent kinase inhibiting properties. In particular, the inventors have surprisingly found that the compound of Formula II, when administered as an IV formulation is provided in therapeutic levels. *In vitro* calculations indicate that the compound of Formula II inhibits the cyclin-dependent kinases CDK1 with a calculated drug affinity (IC₅₀) of 4 nM, CDK2 with calculated drug affinity (IC₅₀) of 1 nM, CDK5 with a calculated drug affinity (IC₅₀) of 1 nM, and CDK9 with a calculated drug affinity (IC₅₀) of 4nM. Moreover, the inventors have surprisingly found inhibition of CDK2/CDK1 in tumor cells leading to cell cycle arrest and apoptosis in more than 100 tumor cell lines including the standard NCI panel. Additionally, the inventors have surprisingly found that exposure of xenograft models to plasma trough concentrations of less than 25 nM of the compound of Formula II for less than two hours results in tumor growth inhibition or regression. The inventors have surprisingly found that a formulation containing the compound of Formula II suitable for IV administration to humans to achieve beneficial plasma levels for the treatment or management of proliferative disorders can be prepared which formulation comprises a buffered aqueous solution of the compound of Formula II. The formulations comprising the compound of Formula II, methods of treating benign and proliferative

disease states using the formulations of the invention containing the compound of Formula II, and examples are described next in greater detail.

Preparation of an IV Formulation Comprising the Compound of Formula II

5 One aspect of the present invention is a formulation comprising the compound of Formula II suitable for intravenous (IV) administration. The compound of Formula II is soluble in acidic media, but sparingly soluble in neutral and basic media. The inventors have surprisingly found that a suitable formulation can be prepared by dissolving the compound of Formula II in an acidic solution made by dissolving in
10 water an organic acid suitable for incorporation into a buffered system, and then titrating the solution of the compound of Formula II and dissolved organic acid to a desired final pH using a suitable base and a suitable acid as necessary to adjust the pH.

Suitable acids are any organic that can provide an aqueous solution having a
15 pH more acidic than about pH 7.0, preferably a pH at least as acidic as pH 3.5, and when titrated with a suitable base can provide a buffer solution having a pH in the range which includes from about pH 7 to about pH 2.5, and preferably can provide a buffer solution having a pH of about pH 3.5. Preferably, the organic acid selected is freely water soluble, for example, lactic or citric acid, more preferable, the organic acid
20 chosen has more than one acidic proton, for example, citric acid.

The compound of Formula II, sparingly soluble in neutral water, is readily soluble in aqueous acid solutions. Accordingly, in some embodiments, in the preparation of the formulation of the invention it is preferred to initially prepare an aqueous acid solution, preferably an acid solution comprising at least about 0.111 M
25 of the selected acid, dissolve therein a conjugate salt, for example, sodium citrate and sodium lactate, and then dissolve in the resulting buffer solution an aliquot of the compound of Formula II. After dissolution is complete the resulting solution is titrated to achieve the desired pH using an acid, for example hydrochloric acid, and base, for example, sodium hydroxide, in the amounts needed to bring the solution to the desired
30 pH or within the desired pH range. Preferably the solution is more basic than about pH 2.5, more preferred is a solution having a pH of from about pH 3 to about pH 5. In one preferred embodiment, the solution has a pH from about pH 3.0 to about pH 4.2, more preferably from about pH 3.4 to about pH 3.6. Once the desired pH is attained,

the volume of the buffered acid solution containing the API is adjusted with one or more aliquots of water to bring the solution to a volume that yields a solution providing about 5 mg/ml of the API. It will be appreciated that suitable solutions can be prepared under aseptic manufacturing conditions or sterilized after manufacturing.

5 It will be appreciated that the formulation of the invention may be prepared using other processes yielding a buffered acidic aqueous solution having the desired concentration of API and a pH of from about pH 2.5 to about pH 7.0, preferably from about pH 3 to about pH 5, more preferably from about pH 3.0 to about pH 4.2, without departing from the formulation of the invention.

10 Method of Use

In one embodiment, the formulation of the invention is a concentrated formulation intended to be diluted as needed by addition of the concentrate into a standard IV bag containing 250 ml of 0.9% saline solution in an amount that provides
15 the desired number of milligrams of API to effect treatment. It is within the scope of the invention to adjust the concentration of the formulation as necessary to provide a formulation sufficiently concentrated in API to accommodate in the dead space of a 250 mL saline bag an amount of the concentrate providing the desired number of mg of API. However, preferably the concentrate contains about 5 mg/ml and when
20 needed in an amount in excess of that which can be accommodated within the dead space of a 250 ml saline bag, the amount of concentrate needed is divided into aliquots which are added to multiple saline bags for administration to the patient. As will be appreciated as greater or lesser amounts of the concentrated solution are introduced into the saline bag the pH will be altered. Preferably, the pH of the
25 infusible solution is between pH 3.4 and pH 7, more preferably between about pH 3.4 and about pH 5. Slightly more acidic solutions may be obtained at high dilution levels of the concentrate, as will be appreciated, due to the lowered buffering ability of the concentrate with increasing dilution. It will be appreciated that any pH value compatible with the patient's physiology can be used as long as infusion time is
30 adjusted to prevent or minimize damage to the vein in which the composition is infused.

In another embodiment, the formulation of the invention is an aliquot of a sufficient amount of the above-described concentrate diluted in an amount of a saline

solution to provide an IV infusible solution containing a sufficient amount of the compound of Formula II to provide a therapeutic level of the compound of Formula II to a patient when infused into the patient.

Without wanting to be bound by theory, it is believed that typically up to about 58 mg/m² of the compound of Formula II is administered to a patient in need of therapy, although greater amounts and lesser amounts can be administered as desired. Preferably, about 50 mg/m² to about 58 mg/m² of the compound of Formula II is administered to a patient in need of therapy. In one preferred embodiment, about 50 mg/m² is administered to a patient in need of therapy.

The entire amount of concentrate diluted in saline solution is infused to a patient over a period of time, typically a period of from about 2 hours to about 24 hours. In some embodiments it is preferred to infuse the entire amount of the formulation to a patient over a 2 hour period. In other embodiments it is preferred to infuse the entire amount of the formulation to a patient over an 8 hour period. In yet other embodiments, to enable a longer steady-state plasma level of the API, it is preferred to infuse the entire amount of the formulation to a patient over a 24 hour period. In some embodiments it is preferred to administer a dosage density of about 50 mg/m²/ 3 weeks. In some embodiments it is preferred to administer this dosage density in a 28-day cycle, that is, as a 16.7 mg/m² dose once-a-week for 3 weeks followed by one week off. In some embodiments it is preferred to administer this dosage density in a 21-day cycle, that is, as a single 50 mg/m² dose every 3 weeks (*i.e.*, administration at Day 1 followed by 20 days off). In other embodiments, it is preferred to administer a dosage density of about 58 mg/m²/ 3 weeks. In some embodiments, it is preferred to administer this dosage density in a 28-day cycle, that is, as a 19.3 mg/m² dose once-a-week for 3 weeks followed by one week off. In some embodiments, it is preferred to administer this dosage density in a 21-day cycle, that is, as a single 58 mg/m² dose every 3 weeks (*i.e.*, administration at Day 1 followed by 20 days off). Greater or lesser amounts can be used. Administration cycles which provide regular doses, for example, a 28-day cycle comprising once weekly administration for three weeks with a week off, or a 21-day cycle comprising administration at Day 1 followed by 20 days off, can be employed to provide the desired dose density.

23

Due to the key role of CDKs in the regulation of cellular proliferation in general, the novel formulation(s) containing a CDK inhibitor of Formula II are believed to act as reversible cytostatic agents useful in the treatment of any disease process which features abnormal cellular proliferation, for example tumor growth, for example, in treating cancer, including solid tumors such as skin, for example, melanoma, breast, for example breast cancer, brain, colon and colorectal cancer, prostate cancer, for example, prostate cancer, gall bladder, thyroid, cervical carcinomas, testicular carcinomas, vulvar cancer, pseudomyxoma peritonei, peritoneal cancer, ovarian cancer, non small cell lung cancer (NSCLC), etc. More particularly, cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include, but are not limited to: Cardiac: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma), myxoma, rhabdomyoma, fibroma, lipoma and teratoma; Lung: bronchogenic carcinoma (squamous cell, undifferentiated small cell, undifferentiated large cell, adenocarcinoma), alveolar (bronchiolar) carcinoma, bronchial adenoma, sarcoma, lymphoma, chondromatous hamartoma, mesothelioma; Gastrointestinal: esophagus (squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, lymphoma), stomach (carcinoma, lymphoma, leiomyosarcoma), pancreas (ductal adenocarcinoma, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, carcinoid tumors, vipoma), small bowel (adenocarcinoma, lymphoma, carcinoid tumors, Karposi's sarcoma, leiomyoma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), large bowel (adenocarcinoma, tubular adenoma, villous adenoma, hamartoma, leiomyoma); Genitourinary tract: kidney (adenocarcinoma, Wilm's tumor (nephroblastoma), lymphoma, leukemia), bladder and urethra (squamous cell carcinoma, transitional cell carcinoma, adenocarcinoma), prostate (adenocarcinoma, sarcoma), testis (seminoma, teratoma, embryonal carcinoma, teratocarcinoma, choriocarcinoma, sarcoma, interstitial cell carcinoma, fibroma, fibroadenoma, adenomatoid tumors, lipoma); Liver: hepatoma (hepatocellular carcinoma), cholangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, hepatocellular adenoma, hemangioma; Bone: osteogenic sarcoma (osteosarcoma), fibrosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, malignant lymphoma (reticulum cell sarcoma), multiple myeloma, malignant giant cell tumor chordoma, osteochondroma (osteochondrosarcoma), benign chondroma, chondroblastoma, chondromyxofibroma, osteoid osteoma and giant cell tumors; Nervous system: skull (osteoma, hemangioma,

24

granuloma, xanthoma, osteitis deformans), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), brain (astrocytoma, medulloblastoma, glioma, ependymoma, germinoma (pinealoma), glioblastoma multiform, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, congenital tumors), spinal cord neurofibroma, meningeoma, glioma, sarcoma); Gynecological: uterus (endometrial carcinoma), cervix (cervical carcinoma, pre-tumor cervical dysplasia), ovaries (ovarian carcinoma (serous cystadenocarcinoma, mucinous cystadenocarcinoma, unclassified carcinoma), granulosa-thecal cell tumors, Sertoli-Leydig cell tumors, dysgerminoma, malignant teratoma), vulva (squamous cell carcinoma, intraepithelial carcinoma, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (clear cell carcinoma, squamous cell carcinoma, botryoid sarcoma (embryonal rhabdomyosarcoma), fallopian tubes (carcinoma); Hematologic: blood (myeloid leukemia (acute and chronic), acute lymphoblastic leukemia, acute and chronic lymphocytic leukemia, myeloproliferative diseases, multiple myeloma, myelodysplastic syndrome), Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma (mantle cell lymphoma), B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, hairy cell lymphoma, Burkett's lymphoma, promyelocytic leukemia; Skin: malignant melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, Kaposi's sarcoma, moles dysplastic nevi, lipoma, angioma, dermatofibroma, keloids, psoriasis; Adrenal glands: neuroblastoma; and Other tumors for example: xeroderma pigmentosum, keratoacanthoma and thyroid follicular cancer.

In some embodiments a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II is used to treat non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, ovarian cancer, acute leukemias [e.g., acute myelogenous leukemia (AML) or acute lymphocytic leukemia (ALL)], chronic leukemias (e.g., CLL), non-Hodgkin's lymphoma (e.g., MCL), melanoma, and multiple myeloma.

In one embodiment, a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II is administered to a patient over an 8 hour period. By way of example, and not limitation, dosage ranges of a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II for an 8 hour infusion period may be from about 1.85 mg/m² to about 70 mg/m² and from about 15 mg/m² to about 30 mg/m². In some embodiments this dosage is administered as a 21 day cycle (administration on Day 1 followed by 20 days off).

In another embodiment, a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II is administered to a patient over a 24 hour period. By way of example, and not limitation, dosages ranges for a 24 hour period may be from about 1.85 mg/m² to about 100 mg/m², from about 50 mg/m² to about 80 mg/m² and from about 30 mg/m² to about 70.0 mg/m². In some embodiments this dosage is administered as a 21 day cycle (administration on Day 1 followed by 20 days off).

In another embodiment, solid tumors (e.g., breast, melanoma, ovarian) are treated by the methods described herein. By way of example, and not limitation, in this embodiment a dosage of a formulation comprising a CDK inhibitor of formula II from about 1.85 mg/m² to about 58 mg/m² (e.g., 20 mg/m², 30 mg/m², 40 mg/m², 50 mg/m²) is administered on a 21 day cycle (i.e., administration at Day 1 followed by 20 days off). The dosage may be infused over a 2 hour, 8 hour or 24 hour time period.

In an alternative embodiment, solid tumors (e.g., breast, melanoma, ovarian) are treated by the methods described herein in conjunction with growth factors (e.g. GCSF and GMCSF). By way of example, and not limitation, dosage ranges of a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II may be from about 0.33 mg/m² and from about 100 mg/m² in a 21 day schedule (administration on Day 1 followed by 20 days off). The dosage may be infused over a 2 hour, 8 hour or 24 hour time period.

In another embodiment, a dosage of a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II from about 1.85 mg/m² to about 100 mg/m² and from about 40 mg/m² to about 70 mg/m² is administered in a 21 day cycle (i.e., administration at Day 1 followed by 20 days off). The dosage may be infused over a 2 hour, 8 hour or 24 hour time period.

In yet another embodiment, a dosage of a formulation of the invention comprising a CDK inhibitor of Formula II from about 0.33 mg/m² to about 30 mg/m², from about 0.33 mg/m² to about 14 mg/m² or from about 7 mg/m² to about 12 mg/m² is administered in a 28 day cycle (i.e., dosage once a week for three weeks followed by one week off). The dosage may be infused over a 2 hour, 8 hour or 24 hour time period. In some embodiments hematologic cancers are treated. In other embodiments solid tumors are treated.

As used herein, treatment of cancer includes treatment of cancerous cells, including cells afflicted by any one of the above-identified conditions.

The formulations of the present invention may also be useful in the chemoprevention of cancer. Chemoprevention is defined as inhibiting the development of invasive cancer by either blocking the initiating mutagenic event or by blocking the progression of pre-malignant cells that have already suffered an insult or inhibiting tumor relapse.

5 The formulations of the present invention may also be useful in inhibiting tumor angiogenesis and metastasis.

EXAMPLES

Described next are various examples which illustrate the formulation and method of treatment of the invention. All animal experiments were carried out in accordance with good laboratory practices in accordance with the standards of the pharmaceutical industry. All reagents used in the preparation of formulations were USP or Food Grade.

Example 1: Preparation of a Formulation Containing the Compound of Formula II

Into a 500 L stainless steel vessel equipped with a stirring paddle was placed 400 kg water at ambient temperature (between 20 and 30 °C). Citric acid (10,682 g) was dissolved therein, with stirring. The vessel was stirred for 10 minutes maintaining ambient temperature and the addition equipment was rinsed with 0.2 kg additional water, which was added to the solution. When the citric acid dissolution was complete, stirring was continued and 5,710 g of sodium citrate were added to the solution with stirring until it had dissolved, maintaining ambient temperature. The addition equipment was rinsed with 0.2 kg additional water which was added to the citric acid/sodium citrate solution. The temperature of the solution was adjusted and maintained at a temperature between 20 °C and 30 °C. Into the solution was added, with stirring, 2,585 g of the compound of Formula II (96.7 % active, API, compound of Formula II prepared in accordance with the methods described in the above-referenced '756 publication). Stirring was continued until all of the added API was dissolved in the citric acid/sodium citrate solution. The addition equipment was rinsed into the solution with 1.2 kg of additional water. When dissolution was complete, the volume of the resulting solution was adjusted to 490 kg by addition of water, and the pH was adjusted by titration with 1 M sodium hydroxide solution, and 0.1 M HCl

27

solution to yield a final pH of pH 3.5. The volume of the buffered solution was adjusted to 507 kg by adding water.

Example 2: Studies of Xenograft Cancer Model Tumors in Nude Mice

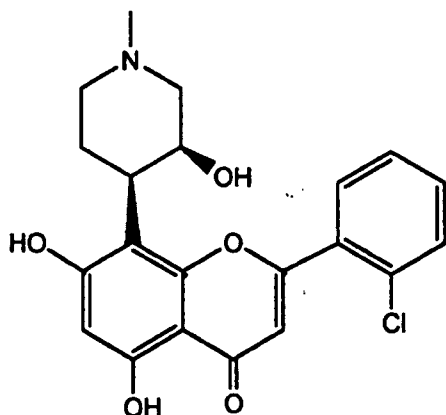
5 The efficacy of the formulation comprising the compound of Formula II prepared in Example 1 was examined in the A2780 xenograft ovarian cancer model. For all experimental models, maximum tolerated dose was defined as that dose, over the duration of the given schedule, which resulted in a 20% weight loss in subject mice.

10 In carrying out this study, A2780 cells were inoculated into nude mice subcutaneously and tumors were permitted to grow until they had a volume of approximately 100 mm³ (approximately 7 days). Groups of ten of these test animals were injected IP with the formulation prepared in Example I at dosage levels of: 8 mg/kg (13% maximum tolerated dose (MTD)); 16 mg/kg (27% MTD); 32 mg/kg (53%
15 MTD); and 48 mg/kg (80% MTD), daily for 10 days. A solution of paclitaxel was injected IP into a control group at a dosage level of 20 mg/kg twice weekly (50% MTD) along with control groups injected with formulation that did not include API. The results of inhibition of tumor growth are shown in Figure 6. Figure 6 shows that the control groups had tumor growth to a volume of about 800 mm³ over the ten day
20 period, while animals that were dosed with paclitaxel had tumor growth inhibited by 63%.. Groups of mice receiving formulation comprising the compound of Formula II exhibited tumor growth inhibition of 70% (both 8 mg/kg and 16 mg/kg dosing levels), 90% (32 mg/kg dosing level), and 96% (48 mg/kg dosing level). These data show that the 50% inhibition level (which in this model defines the minimum effective dose) is
25 apparently less than 8 mg/kg. Moreover, it was found that animals exposed to the maximum dosage level of the compound of Formula II showed body-weight loss over the course of the experiment of about 5%, demonstrating that the formulation is well tolerated.

30 The formulation was administered to BALB/c mice at a dosage level of 40 mg/kg once per day for five days. Blood samples were obtained on days 1 and 7 following the last dose and analyzed on an Advia 120 hematology analyzer immediately after diluting 1:5 in PBS. A full differential blood count was performed, including red blood cell analysis (including reticulocyte, variant count, and hemoglobin

analyses), white blood cell analysis (including differential lineage counts and peroxidase staining) and a thrombopoiesis analysis. No effect was observed on platelets or red blood cells.

In a related study, escalating doses of the formulation prepared in Example 1 and a formulation containing the compound of Formula III,



Formula III

(Flavopiridol) were administered to nude mice bearing A2780 ovarian carcinoma xenografts on a once per day for 7 days dosing schedule. For this study, maximum tolerated dose was considered that dosage level inducing a 20% loss of body weight over the duration of the experiment and the minimum effective dose (MED) was defined as that dosage level inducing at least a 50% inhibition of tumor growth. The results are shown in Table I, which reports various therapeutic indices for each compound. The data in Table I indicate that the compound of Formula III was poorly tolerated yielding a nominal therapeutic index (MTD/MED) of less than 1, while the compound of Formula II was well tolerated and effective at a significantly lower dose than the MTD, the compound of Formula II yielding a nominal therapeutic index of greater than 10.

28
29

TABLE I

Compound	A/CDK2 IC ₅₀ (μM)	In-Cell IC ₅₀ (Thymidine; μM)	MTD* (mg/kg)	MED* (mg/kg)	Therapeutic index (MTD/MED)
Formula III	0.012	0.07	<10	10	<1
Formula II	0.001	0.004	60	5	12
*Dosage based on a dosing regime of once per day, intraperitoneal (IP)..					

With reference to Figure 4, nude mice bearing A549 NSCLC xenografts, ~ established at a volume of greater than 100 mm³, were injected with a dosage equivalent to 260 mg/kg of the compound of Formula II using the formulation prepared in Example I over 5 different schedules shown: (a) 20 mg/kg once a day for 13 days; (b) 29 mg/kg for 3 days, followed by 2 days off for three cycles; (c) 52 mg/kg on days 1, 4, 7, 10, and 13; (d) 17 mg/kg thrice per day (equivalent to 52 mg/kg in 24 hours) on days 1, 4, 7, 10, and 13; and (e) 87 mg/kg on days 1, 7, and 13. As shown in Figure 4, regression in tumor volume and mass was observed on all dosing schedules. Similar studies were done using xenograft bearing mice for tumor type models of RPMI 8226, A549 NSCLC, NCI H460, PC3 (prostate), H82 (SCLC), SW527 (breast), and MDA MB231 (breast). The results, in comparison with the benchmark cytotoxic agents noted, are presented in Table II, below.

TABLE II

Tumor Model	% inhibition observed at dosage of 5 mg/kg Formula II	% inhibition observed at dosage of 5 mg/kg Formula II	% inhibition observed with benchmark cytotoxic agent
RPMI 8226	135 (regression)	150 (regression)	62 (bortezomib)
A549 NSCLC	73	160 (regression)	0 (paclitaxel)
NCI H460	45	90	5 (paclitaxel)
PC3 (prostate)	93	95 (regression)	65 (paclitaxel)
H82 (SCLC)	56	65	40 (carboplatin)
SW527 (breast)	12	82	31 (paclitaxel)
MDA MB231 (breast)	52	70	68 (paclitaxel)

Nude mice were given a single dose intraperitoneal of the formulation prepared in Example I equivalent to 40 mg/kg. Skin samples were harvested at various intervals following dosing and compared with biopsies harvested prior to dosing (T0). Biopsied samples were fixed overnight in 10% formalin. Samples were then placed in 70% alcohol for storage before being embedded in paraffin blocks, sectioned and stained with phospho-Rb Ser 807/811-specific antisera.

As shown in Figure 7, which illustrates typical samples taken at intervals over several hours (T2 post dose) and (T4 post dose), the samples taken post-administration of the formulation indicate that the formulation induced rapid and sustained suppression of phospho-Rb within the proliferating epithelial cells of the basal epithelium and hair follicles.

With reference to Figure 4, nude mice bearing xenografts were also dosed at the rate of 87 mg/kg once every six days, with the dosing schedule divided for single daily dose (20 mg/kg), single daily dose for 3 days followed by a 2 day off period (29 mg/kg single dose), single dose every three days (52 mg/kg, single dose), three 17 mg/kg doses in one day, repeated every three days, and one 87 mg/kg dose given every 6 days. Tumor regression was observed in animals treated with the compound of Formula II as compared with a control. The degree of tumor regression was similar for all dosing schedules examined.

Example 3: Inhibition of Thymidine Incorporation or Alamar Blue Viability in a Variety of Human Tumor Cell Lines and Confirmation of Cell Apoptosis Following Short Exposure to the Compound of Formula II

With reference to Table 4, various human tumor cell lines were exposed to increasing concentrations of the compound of Formula II for 24 hours and then assessed by inhibition of thymidine incorporation (adherent cells) or alamar blue viability assay (suspension cell lines). The level of activation of apoptosis was also assessed by determining the levels of activated caspase in each cell line. In each experiment, cells were exposed to increasing concentration of the compound of Formula II in cell medium for two hours by making multiple batches of the medium containing different amounts of the compound of Formula II and exposing different batches of cells to the medium containing the compound of Formula II at each particular concentration. The medium was removed and the cells were re-fed

complete medium without the compound of Formula II present. The cells were evaluated fluorometrically for levels of activated caspase six hours post washout. Samples of each cell line were also subjected to SDS-PAGE and subsequently immunoblotted for p85 PARP caspase cleavage product. A positive apoptosis result was deemed if detectable activation of caspases and accumulation of p85 PARP was observed following a two hour exposure of a cell line to less than 0.1 micromolar concentrations of the compound of Formula II.

These data are presented in Table III. IC₅₀ values were calculated using the procedure described in the above-referenced '200 patent (Table 87 therein). The data in Table III indicate that all tumor types underwent cell cycle arrest in at least a portion of the different cell lines tested. Moreover, no tumor type tested exhibited particular sensitivity or resistance to the compound of Formula II. Additionally, these data show that caspase activation and apoptosis were detected in over 85% of the cell lines tested following a single exposure to the compound of Formula II. It should be mentioned that approximately 50% of the NCI-60 screening set are positive for MDR1 (multiple drug resistance Gene 1) gene expression.

TABLE III – Inhibition in a Variety of Cell Lines

Tumor Type	Mean In-Cell IC ₅₀ (nanomolar)	Caspase Activation (number of sensitive cell lines out of total tested/ single exposure)
Prostate	12	4 of 5
Breast	8	6 of 7
Colon	17	5 of 9
NSCLC	14	8 of 9
SCLC	6	2 of 6
Ovarian	14	5 of 7
Pancreatic	15	11 of 15
Melanoma	9	9 of 9
Leukemia	6	5 of 6
Bladder	10	1 of 2
Liver	8	2 of 2
Mantle Cell	7	3 of 4

32

lymphoma		
Lymphoma (NHL)	7	8 of 8

Activation of apoptosis following short exposure times of A2780 cells to the compound of Formula II was confirmed by exposing A2780 ovarian cancer cell cultures to increasing concentrations of the compound of Formula II dissolved in growth medium for a period of two hours then removing the cells and re-feeding them in complete media without the compound of Formula II present for six hours (washout period). After the 6 hour washout period, cell extracts were prepared and evaluated by fluorometric assay for activated caspases (RFLU). In this study it was observed that caspase activity was reproducibly detected following 2 hours of exposure to the compound of Formula II present in as little as 0.05 micromolar concentration. When compared to cells treated with higher concentrations of the compound of Formula II (up to 5.0 micromolar) it was found that caspase activity did not increase. These data indicate that caspase activity is maximal at exposure levels of 0.05 micromolar.

To confirm that a two hour exposure profile was sufficient to induce durable effects on cell cycle distribution, asynchronously growing A2780 cells were exposed to concentrations of the compound of Formula II dissolved in growth media for two hours ranging from 0.001 micromolar to 30 micromolar in 16 batches, each approximately doubling the concentration of the compound of Formula II over the previous batch concentration. In each experiment, after exposure, the cells were washed out and re-fed growth media without the compound of Formula II present for 24 hours, then pulsed for 30 minutes with BrdU to establish the percentage of cells undergoing active DNA replication. Cells were then fixed, stained with an FITC-conjugated, anti-BrdU monoclonal antibody and propidium iodide. The cells thus prepared were analyzed using 2-color flow cytometry with doublet-discrimination. This study showed that at exposures of greater than 0.5 micromolar, the compound of Formula II completely suppressed DNA synthesis 24 hours after exposure. The samples exposed to concentrations of greater than 0.5 micromolar also showed accumulation of subG1 (associated with apoptotic cells). Escalation of exposure above 0.5 micromolar, up to concentrations of 30 micromolar did not augment the apoptotic phenotype.

Assessment of the mechanistic effects of short exposures of the compound of Formula II was carried out by exposing asynchronously growing A2780 cells to growth medium containing 0.1 mM of the compound of Formula II for two hours, washing out the cells and re-feeding the cells with medium that did not include the compound of Formula II. Following washout, lysates were prepared from the cells to assess the duration of the effects of exposure. Samples were separated on SDS-PAGE and immunoblotted with antisera specific for hypo-phosphorylated retinoblastoma protein and p85 PARP to assess inhibition of CDK's and activation of apoptosis. It was found that a 2 hours exposure of the cells to 0.1 mM of the compound of Formula II was sufficient to induce suppression of RB phosphorylation and caspase activation for a period exceeding 6 hours after the washout period.

Asynchronously growing A2780 cells were exposed to increasing concentrations of the compound of Formula II or the compound of Formula III for 16 hours. Cell lysates were separated on SDS-Page and immunoblotted with a rabbit polyclonal antisera specific for a CDK phosphorylation site (Ser 07/811) on the retinoblastoma tumor-suppressor protein (RB, a known CDK substrate). Accumulation of the p85 PARP product was also monitored to assess activation of caspases and correlate inhibition of CDKs with the onset of apoptosis. Consistent with the study described above in cell data assessing inhibition of thymidine incorporation (IC_{50} of 4nM), the formulation comprising the compound of Formula II suppressed phospho-Ser 807/811 following exposure. Phospho-Ser 807/811 was undetectable in lysates exposed to concentrations of greater than 6.25 nM in the compound of Formula II, and it was observed that complete suppression of detectable RB phosphorylation was required for the onset of apoptosis, indicated by the detectable p85 PARP. In comparison, exposure to the compound of Formula III (flavopiridol) did not induce significant suppression of RB phosphorylation, requiring concentrations of about 1 micromolar to induce detectable effects on phospho-Ser 807/811 levels. At concentration levels below those necessary to observe inhibition of RB phosphorylation, activation of apoptosis was observed. It was also observed that there was poor correlation between IC_{50}/EC_{50} for the compound of Formula III in various in-cell assays of thymidine incorporation and mechanism based biomarkers, for example, phospho-RB.

34

Table IV indicates that the compound of Formula II is selective for the CDK family of Ser/Thr kinases, as determined by Upstate kinase Profiler counter-screening, whereas the compound of Formula III has more general activity, including the inhibition of c-Src tyrosine kinase.

5

TABLE IV

Kinase	Cmpd. Form. II at 1 μM*	Cmpd. Form. II at 10 μM*	Cmpd. Form. III at 1 μM*	Cmpd. Form. III at 10 μM*
AMPK	94	82	67	20
Blk	69	100	73	26
CaMKII	102	91	44	30
CDK6/cyclinD3	12	3	25	6
CDK7/cyclinH/MAT1	7	4	18	6
cSRC	117	111	3	4
Fes	87	91	44	13
Lyn	108	110	73	18
MSK1	94	97	74	37
PKCα	96	94	66	20
PKCβII	110	113	75	26
PKCε	93	88	45	9
PKCθ	95	95	23	5
Rsk2	104	76	65	18
YES	92	98	68	40

* % remaining activity

Figure 5 also shows that the compound of Formula II binds with high affinity to cyclin A/CDK2 complexes.

10

Example 4: Studies in Human Volunteers

The formulation prepared in Example 1 was infused into volunteer human cancer patients after diluting it in a 250 ml standard 0.9 % saline IV bag. The contents of the IV bag were infused over a two hour period. Dosages were prepared using an amount of the formulation providing doses of 0.33 mg/m², 0.66 mg/m², 1.32 mg/m², 1.85 mg/m², 2.59 mg/m², 3.63 mg/m², 5.08 mg/m², 7.11 mg/m², 10.00 mg/m², 12.00

15

mg/m² and 14.00 mg/m² of the compound of Formula II for the patient infused. Each patient was dosed on a 28 day cycle, comprising an infusion once a week for the first three weeks of the cycle on days 1, 8, and 15 of each cycle, with no dose administered in the week following the third dose. Plasma samples were collected prior to the start of an infusion, and at hours 1, 2 (completion of infusion), 2.25, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.4, 6.0, 8.0, and 24 after the beginning of the infusion. Volunteer human cancer patients were also dosed once every three weeks (*i.e.*, on a 21-day cycle) via a 2 hour IV infusion with 1.85 mg/m², 3.7 mg/m², 7.4 mg/m², 14.8 mg/m², 29.6 mg/m², 41.4 mg/m², 50 mg/m², and 58 mg/m². PK and AUC results obtained were similar between the 21-day dosing schedule and the comparable 28-day dosing schedule described above.

With reference to Figures 2A, 2B, and 2C, which show the plasma concentration in ng/ml of the compound of Formula II following commencement of a two hour infusion for the various dosage levels indicated, for each infusion, C_{max} is achieved between 1 and 2 hours after beginning the infusion. When the infusion is complete it can be seen that in each case the compound of Formula II is rapidly eliminated from plasma, with T_{1/2} ranging from about 1.4 to about 3.3 hrs depending on dosage.

With reference to Figure 3, which presents AUC (ng·hr/mL)/dose (mg/m²) for the various doses administered on day 1 (diamonds) and day 15 (squares) of a 28 day dosing cycle, it appears that dose-proportional increases in exposure are observed for dosages of from 0.33 mg/m² to 41.4 mg/m², and that clearance is dosage independent. Figure 2B also shows that plasma levels of 25 nM (attained at plasma concentrations of 10 ng/mL) are available from 2-hour infusions at dosages of greater than 1.32 mg/m².

With reference to Figure 8, which shows mean AUC data for a patient dosed at 1.85 mg/m² on days 1 and 15 of a 28 day dosing schedule, the AUC data for each dose in a cycle are similar. The AUC ratio, expressed as AUC-day 15/AUC-day 1 was 1.09. Plasma concentrations at the end of each infusion on days 1, 8, and 15 of cycle 1, and day 1 of cycle 2 were also found to be similar, indicating consistent exposure for the dosing regime. This indicates also that drug accumulation is not evident using this regime.

With reference to Figure 1, which presents an estimate of a concentration/time profile for a 24 hour infusion of a 14.8 mg/m² dose of the compound of Formula II, it is predicted that by extending infusion times to up to 24 hours, a steady state plasma concentration can be established within 2 hours of commencing the infusion and extended over the duration of the infusion. Accordingly, by changing IV infusion time, the PK profile of the compound of Formula II in the present formulation can be altered. In this case maintaining a therapeutically effective plasma level for an extended period of time.

PK parameters observed in these studies are summarized in Table V, Table VI, and Table VII. Specifically, the data shown graphically in Figures 2A and 2B correspond to Table V and the data shown graphically in Figure 2C correspond to Tables VI and VII. These data indicated that PK exhibited moderate inter-subject variability (C_{max} and AUC) and relatively low to moderate intra-subject variability (approximately 30%) at dosages of from about 0.33 mg/m² to about 58 mg/m². Observed $t_{1/2}$ was between about 1.4 hours and about 3.3 hours.

Table VIII is a cumulative representation of the data in Tables V, VI and VII with an expansion in patient numbers at certain doses as indicated in Table VIII.

37

TABLE V

Dosage (mg/M ²)	t _{1/2} (hours)	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng hr/mL)	CL (L/(hr m ²))
0.33	2.01	11.1	25.2	13.1
0.66	1.48	18.6	32.1	20.6
1.32	NA	63.8	NA	NA
1.85	2.29 (45)	95.7 (26)	201.2 (38)	10.2 (36)
2.59	3.0 (1)	109 (11)	213 (35)	12.9 (35)
3.63	2.56 (38)	163 (63)	423 (91)	14.7 (91)
3.7	2.75	136	336	11.0
7.4	2.86	353	972	7.62
14.8	2.78	396	1053	14.1
29.6	2.98 (11)	890 (44)	2434 (45)	14.0 (40)
41.4	2.80 (29)	1343 (48)	3041 (51)	28.3 (133)

38

TABLE VI

Dose (mg/m ²)	N	C _{max} (ng/mL)		T _{max} (hr)	AUC (t _f) (hr*ng/mL)		t _f (hr)	
		Mean	CV%	Median	Mean	CV%	Median	Range
1.85	1	62.5	NA	1	134	NA	8	8 - 8
3.7	1	136	NA	2	336	NA	24	24 - 24
7.4	1	353	NA	2	970	NA	24	24 - 24
14.8	1	396	NA	2	1050	NA	24	24 - 24
29.6	6	890	44	1	2040	57	24	2.25 - 24
41.4	6	1300	45	2	2870	50	24	6 - 24
50	10	1820	49	1.5	4050	63	24	8 - 24
58	3	1460	20	1	3290	36	24	24 - 24

NA: not applicable

TABLE VII

Dose (mg/m ²)	N	AUC (I) (hr*ng/mL)		t _{1/2} (hr)		CL (L/hr/m ²)	
		Mean	CV%	Mean	CV%	Mean	CV%
1.85	1	136	NA	1.42	NA	13.6	NA
3.7	1	336	NA	2.75	NA	11.0	NA
7.4	1	972	NA	2.86	NA	7.62	NA
14.8	1	1050	NA	2.78	NA	14.1	NA
29.6	5 ^a	2430	45	2.98	11	14.0	40
41.4	6	2890	50	2.84	26	26.8	126
50	10	4090	64	2.90	29	16.3	50
58	3	3300	37	3.15	15	19.7	44

NA: not applicable;

a: n = 4 for t_{1/2} as value not determinable for one patient

TABLE VIII

Mean (CV%) Preliminary Pharmacokinetic Parameters on Day 1 Following a 2-hour Intravenous Infusion Based on Cumulative Data

Dose (mg/m ²)	N	C _{max} (ng/mL)		T _{max} (hr)	AUC(I) (hr*ng/mL)		t _{1/2} (hr)		CL (L/hr/m ²)	
		Mean	CV%	Median	Mean	CV%	Mean	CV%	Mean	CV%
0.33	1	11.1	NA	1	25.2	NA	2.01	NA	13.1	NA
0.66	1	18.6	NA	2	32.1	NA	1.48	NA	20.6	NA
1.32	1	63.8	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1.85	5 ^a	91.0	26	2	201	38	2.29	45	10.2	36
2.59	3 ^b	124	22	1	213	NA	3.02	NA	12.9	NA
3.63	7 ^{c, d}	195	43	1	446	52	2.63	20	11.3	69
3.7	1	136	NA	2	336	NA	2.75	NA	11.0	NA
5.08	3	173	39	2	327	21	3.19	7	15.9	19

7.11	1	347	NA	1	588	NA	3.16	NA	12.1	NA
7.4	1	353	NA	2	972	NA	2.86	NA	7.62	NA
14.8	1	396	NA	2	1050	NA	2.78	NA	14.1	NA
29.6	6 ^a	890	44	1	2430	45	2.98	11	14.0	40
41.4	6	1300	45	2	2890	50	2.84	26	26.8	126
50	10	1820	49	1.5	4090	64	2.90	29	16.3	50
58	3	1460	20	1	3300	37	3.15	15	19.7	44

Abbreviations: AUC(I) = area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity;
CL = clearance; C_{max} = maximum observed plasma concentration; CV% = coefficient of variation,
expressed in percent; t_{1/2} = terminal phase half life; T_{max} = time to maximum observed plasma
concentration; NA = not applicable

a: N = 4: AUC(I), t_{1/2}, and CL; t_{1/2} were not determinable for a patient

b: N = 2: AUC(I), t_{1/2}, and CL; t_{1/2} were not determinable for a patient

c: N = 6: AUC(I), t_{1/2}, and CL; t_{1/2} were not determinable for a patient

d: Data from a patient was not included in descriptive statistics, patient received a < 1 hr infusion and < 3.63 mg/m² dose

e: N = 5: AUC(I), t_{1/2}, and CL; t_{1/2} were not determinable for a patient

Blood samples were collected at 2, 3, 4, 6, and 8 hours post initiation of infusion from patients infused (2 hrs) with dosage levels of the compound of Formula II in amounts equal to 0.33 mg/m²; 0.66 mg/m²; and 1.85 mg/m². The samples were collected in tubes containing heparin and shipped to a central laboratory for evaluation. Whole blood from each sample was diluted 1:5 in complete RPMI media and 200 microliter aliquots were added to wells of a 96-well plate. Samples from each time point were either stimulated with PHA (0.01 mg/ml final concentration), or not stimulated. The sample well plates were incubated for 48 hours at 37 °C under 5% CO₂ and BrdU (10 micromolar) was added to each well. The plates were incubated for an additional 24 hours. Samples were stained with FITC conjugated anti-CD45 antibody. RBC's were lysed and the remaining cells were fixed, permeabilized and treated with DNase. The samples were then incubated with an anti-BrdU antibody. Washed cells were re-suspended and the CD45 and BrdU-positive and -negative populations were detected by FACS. Figures 10, 12A, and 12B show the percent of BrdU incorporation for samples taken for various doses.

With reference to Figure 10, no inhibition of BrdU incorporation is observed at a dose of 0.33 mg/m², but at a dose of 0.66 mg/m², inhibition of BrdU incorporation is observed up to eight hours post infusion. Inhibition of BrdU incorporation is observed at two hours post-infusion at a dose of 1.85 mg/m². These data indicate that the compound of Formula II interacts with cellular mechanistic pathways in a manner likely to disrupt tumor cells.

With reference to Figure 12A, mild inhibition of BrdU incorporation is observed at two hours post-infusion at a dose of 1.85 mg/m². In contrast, as shown in Figures 12A and 12B, inhibition of BrdU incorporation is observed up to 3 hours post infusion at a dose of 3.7 mg/m² and 7.4 mg/m² and up to eight hours post infusion at a dose of 29.6 mg/m², 41.4 mg/m², 50 mg/m², and 58 mg/m². The effect of the compound of Formula II on inhibition of BrdU incorporation observed at a dose of 1.85 mg/m² (see Figure 12A) compared to that seen in Figure 10 can be attributed to Inter-subject variability.

With reference to Figure 13 and Table IXI, percentage inhibition of BrdU incorporation at 8 hours post-infusion generally increased over the range of 1.85 to 58 mg/m². In fact, the percentage inhibition of BrdU incorporation already rose to greater than 75% at a dose of 7.4 mg/m². These data reflect that inhibition of lymphocyte proliferation as measured by BrdU incorporation correlates with the dosage level of the compound of Formula II to which the blood sample was exposed.

TABLE IX

Patient	Dose (mg/M2)	% BrdU incorporated Pre-Dose	% BrdU incorporated at 8 hrs post-infusion	% inhibition of BrdU incorporation at 8 hrs post-infusion
A	1.85	28	65	-133
B	3.7	10	13	-25
C	7.4	51	11	79
D	29.6	29	3	92
E	41.4	27	2*	97*
F	50	33	1	98
G	58	23	0.7	98
H	41.4	41	45	-10
* Values at 4 hr post-infusion				

Patients having a diagnosis of non small cell lung cancer (NSCLC), colorectal cancer, prostate cancer, ovarian cancer, breast cancer, melanoma, vulvar cancer, pseudomyxoma peritonei, peritoneal cancer, cholangiocarcinoma, pancreatic cancer,

41

soft tissue sarcoma, gastric cancer, gastrointestinal stromal tumor (GIST), esophageal cancer, adenoidcystic carcinoma, neuroendocrine tumor or hepatocellular carcinoma have been administered various dosages of the compound of Formula II by 2 hour IV infusion on a 28-day dosing cycle. Each 28-day dosing cycle comprising once weekly administration for three weeks with a week off. No complete or partial responses have been observed by RECIST criteria in the population (see, e.g., Therasse *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 92(3):205-216 (2000)). Nonetheless, one patient diagnosed with NSCLC has stable disease after 6 cycles of 28 day treatment at 0.66 mg/m² and one patient diagnosed with pseudomyxoma peritonei has falling tumor markers, as shown in Figure 11, after 6 cycles of 28 day treatment at 2.59 mg/m², and continued on treatment for a total of 9 cycles. For clarity, the tumor marker indicated as "CA" is CA125. Additionally, one patient with prostate cancer received 4 cycles of 28-day dosing regime who was dosed at 3.63 mg/m² .. One patient with melanoma was treated at 3.63 mg/m² for 9 cycles until disease progression. One patient with soft tissue sarcoma receiving 6 cycles at 7.11 mg/m² continues to have stable disease as does one patient with GIST receiving 5 cycles at 7.11 mg/m². One patient with esophageal cancer receiving 5 cycles at 7.11 mg/m² has stable disease. One patient with adenoidcystic carcinoma received 5 cycles at 7.11mg/m² until disease progression.

Likewise, patients having a diagnosis of a carcinoid, thymic cancer, leiomyosarcoma, NSCLC, colorectal cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC), adenocarcinoma of unknown primary, melanoma, ovarian cancer, non-Hodgkin's lymphoma, neuroendocrine tumor, testicular cancer, breast cancer, prostate cancer, esophageal cancer, pancreatic cancer, thyroid cancer, liposarcoma, cholangiocarcinoma, pseudomyxoma peritonei, chordoma, or sarcomatoid carcinoma were administered various dosages of the compound of Formula II by 2 hour IV infusion on a 21-day dosing cycle. Patients having a diagnosis of liposarcoma, colorectal cancer, neuroendocrine tumor, NSCLC, and esophageal cancer were administered various dosages of the compound of Formula II by 8 hour IV infusion on a 21-day dosing cycle. Each 21-day dosing cycle comprising administration of the dose on Day 1 of a 21-day period. Although no complete or partial responses were observed by RECIST criteria in the population, stable disease was achieved in some of the aforementioned tumor types after 4 or more 21-day dosing cycles. Specifically,

42

two carcinoid patients achieved a stable disease state for 4 cycles at a dose of 29.6 mg/m² and 41.4 mg/m². Similarly, a thymic cancer patient achieved a stable disease state for 4 cycles at a dose of 50 mg/m². A patient with anal cancer achieved stable disease for 6 cycles at a dose of 50 mg/m². Additionally, a leiomyosarcoma patient achieved a stable disease state for 8 cycles at a dose of 41.4 mg/m². A NSCLC patient achieved a stable disease state for 12 cycles at a dose of 50 mg/m². A chordoma patient achieved stable disease for 8 cycles at a dose of 58 mg/m² and a prostate cancer patient achieved stable disease for 7 cycles at a dose of 50 mg/m².

The above description of the invention is intended to be illustrative and not limiting. Various changes or modifications in the embodiments described herein may occur to those skilled in the art. These changes can be made without departing from the scope or spirit of the invention

TABLE X

4-week schedule			
Tumor	Dose mg/m ²	Cycle no.	Status
NSCLC	0.66	6	off study with stable disease
pseudomyxoma	2.59	9	off study with stable disease
prostate	3.63	4	disease progression
melanoma	3.63	9	disease progression
soft tissue sarcoma	7.11	6	on treatment
GIST	7.11	5	on treatment
esophageal ca	7.11	5	on treatment
adenoidcystic	7.11	5	disease progression

TABLEXI

21 day schedule			
Tumor	Dose mg/m ²	Cycle no.	Status
carcinoid	29.6	4	disease progression
carcinoid	41.4	4	disease progression
leiomyosarcoma	41.4	8	disease progression
thymic	50	4	disease progression
NSCLC	50	12	on treatment
chordoma	58	8	on treatment
anal cancer	50	6	disease progression
prostate	50	7	on treatment

43

The above description of the invention is intended to be illustrative and not limiting. Various changes or modifications in the embodiments described herein may occur to those skilled in the art. These changes can be made without departing from the scope or spirit of the invention

46

What is claimed is:

- 5 1. An IV-infusible formulation comprising the compound of Formula II in a buffered solution having a pH of from about pH 3.4 to about pH 5, the formulation providing at least one PK behavior and/or AUC in accordance with that shown in either Figure 2A, 2B, or 2C when infused into a human in at least one of the dosage levels indicated.
- 10 2. The formulation of claim 1 which provides the AUC/dose curves illustrated in Figure 3 when infused in a two hour infusion in an amount providing at least one dosage level shown.
- 15 3. The formulation of claim 1 or claim 2 wherein the buffered solution is an aqueous buffered solution comprising an acid and its conjugate sodium salt wherein the acid is citric acid or lactic acid.
- 20 4. The formulation of claim 1 wherein the buffered solution comprises citric acid and sodium citrate.
- 25 5. The formulation of claim 4 wherein the ratio of citric acid:sodium citrate in the buffered solution is about 1 mole of sodium citrate to about 2.4 moles of citric acid.
- 30 6. The formulation of claim 5 wherein the solution additionally comprises a sodium chloride solution diluent.
7. A method of treating a tumor condition treatable by the administration of the compound of Formula II comprising infusing a solution comprising the compound of Formula II into a patient in need of treatment over a period of from 1 hour to about 24 hours on each of days 1, 8, and 15 of a 28 day cycle, in an amount effective to treat the tumor condition.

45

35

8. The method of claim 7 wherein the cycle is repeated until tumor inhibition or complete remission is observed. .
- 5 9. The method of claim 7 or 8 wherein the amount of the solution infused provides a plasma level of at least about 10 ng/mL.
- 10 10. The method of any of claims 7 to 9 wherein the solution administered comprises the solution of claim 5.
- 15 11. A process for making a concentrate comprising preparing a buffered solution of an organic acid and its conjugate salt, dissolving the compound of Formula II in the buffered solution and adjusting the pH of the resulting solution to a pH of from about pH 3 to about pH 5.1.
- 20 12. The process of claim 11 which further includes the step of admixing the concentrate with the contents of a standard saline IV bag, thereby providing an infusible formulation.
- 25 13. The process of either of claims 11 or 12 wherein the organic acid is citric acid and the conjugate salt is sodium citrate.
14. The process of any of claims 11 to 13 wherein the ratio of organic acid, conjugate salt and the compound of Formula II is 1 mole of the compound of Formula II : 3.66 moles conjugate salt : 8.8 moles organic acid.
15. The process of claim 11 wherein the compound of Formula II is present in the concentrate at the level of 5 mg/mL.
- 30 16. A formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides the PK profile shown in Figure 2 A upon IV infusion into a human.

17. A formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides at least one of the PK profiles shown in Table V upon IV infusion into a human in an amount providing at least one of the indicated dosages.
18. The formulation of claim 17 comprising a mole ratio of the compound of Formula II: organic acid : conjugate salt of 1 mole : 8.8 moles : 3.7 moles.
19. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II : about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein, the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 1.85 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.15 hours, a C_{max} of about 77 ng/ml, and/or an AUC of about 181 ng hr/mL.
20. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II : about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein, the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 3.7 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.75 hours, a C_{max} of about 136 ng/ml, and/or an AUC of about 336 ng hr/mL.
21. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II : about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein, the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising 7.4 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.86 hours, a C_{max} of about 353 ng/ml, and/or an AUC of about 994 ng hr/mL.
22. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II : organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II : about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein, the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising

14.8 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.78 hours, a C_{max} of about 396 ng/ml, and/or an AUC of about 1053 ng hr/mL.

- 5 23. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II :
organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II :
about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein,
the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
29.6 mg/M² having a t_{1/2} of about 2.79 hours, a C_{max} of about 1020 ng/ml,
and/or an AUC of about 2531 ng hr/mL.
- 10 24. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II :
organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II :
about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein,
the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
15 41.4 mg/M² having a t_{1/2} in the range of about 2 to about 2.8 hours, a C_{max} in
the range of about 1020 ng/ml to 1343 ng/ml, and/or an AUC in the range of
of about 2531 ng hr/mL to about 3041 ng hr/mL.
- 20 25. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II :
organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II :
about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein,
the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
50 mg/M² having a t_{1/2} of about 1.5 hours, a C_{max} of about 1820 ng/ml,
and/or an AUC of about 3290 ng hr/mL.
- 25 26. A formulation comprising a mole ratio of the compound of Formula II :
organic acid : conjugate salt of about 1 mole of the compound of Formula II :
about 8.8 moles of organic acid: about 3.7 moles of conjugate salt, wherein,
the formulation provides a PK for a two hour infusion of a dose comprising
30 58 mg/M² having a t_{1/2} of about 1 hours, a C_{max} of about 1460 ng/ml, and/or
an AUC of about 3290 ng hr/mL.

27. A formulation comprising the compound of Formula II exhibiting the PK values and $C_{\max}$ value shown in Table V when administered by an IV infusion in an amount providing the corresponding dose indicated in Table V.
- 5 28. A formulation comprising the compound of Formula II exhibiting the PK values and $C_{\max}$ value shown in Table VI when administered by an IV infusion in an amount providing the corresponding dose indicated in Table VI.
- 10 29. A method of treating a tumor condition treatable by the administration of the compound of Formula II comprising infusing a solution comprising the compound of Formula II into a patient in need of treatment over a period of from 1 hour to about 24 hours wherein the compound is administered on Day 1 followed by 20 days off (21 day cycle), in an amount effective to treat the tumor condition.
- 15 30. The method of claim 29 wherein the cycle is repeated until tumor inhibition or complete remission is observed.
- 20 31. The method of claim 29 or 30 wherein the amount of the solution infused provides a plasma level of at least about 10 ng/mL.
- 25 32. The method of any of claims 29 to 31 wherein the solution administered comprises the solution of claim 5.
- 30 33. The method of any of claims 7 to 10 and 29 to 32 wherein the amount of solution infused provides up to about 58 mg/m² of the compound of Formula II.
34. The method of any of claims 7 to 10 and 29 to 32 wherein the amount of solution infused provides about 50 mg/m² of the compound of Formula II.

49

35. The method of claim 29 wherein the tumor is selected from the group consisting of non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, ovarian cancer, acute leukemias [e.g., acute myelogenous leukemia (AML) or acute lymphocytic leukemia (ALL)], chronic leukemias (e.g., CLL), non-Hodgkin's lymphoma (e.g., MCL), melanoma, and multiple myeloma.
36. The method of claim 29 wherein the time period for the infusion is selected from the group consisting 2 hours, 8 hours and 24 hours.
37. The method of claim 29, wherein the amount of compound of Formula II administered is from about 0.33 mg/m² to about 20 mg/m², from about 0.33 mg/m² to about 14 mg/m² or from about 7 mg/m² to about 12 mg/m².
38. A method of treating a tumor condition treatable by the administration of the compound of Formula II comprising infusing a solution comprising the compound of Formula II into a patient in need of treatment over a period of from 1 hour to about 24 hours wherein the compound is administered on each of days 1, 8, and 15 of a 28 day cycle, in an amount effective to treat the tumor condition.
39. The method of claim 29 wherein the tumor is selected from the group consisting of non-small cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, ovarian cancer, acute leukemias [e.g., acute myelogenous leukemia (AML) or acute lymphocytic leukemia (ALL)], chronic leukemias (e.g., CLL), non-Hodgkin's lymphoma (e.g., MCL), melanoma, and multiple myeloma.
40. The method of claim 38 wherein the time period for the infusion is selected from the group consisting 2 hours, 8 hours and 24 hours.
41. The method of claim 40 wherein the time period for the infusion is 8 hours.

42. The method of claim 41, wherein the amount of compound of Formula II administered is from about 1.85 mg/m² to about 70 mg/m² or from about 15 mg/m² to about 30 mg/m².
43. The method of claim 40 wherein the time period for the infusion is 24 hours.
- 5 44. The method of claim 43, wherein the amount of compound of Formula II administered is from about 1.85 mg/m² to about 100 mg/m², from about 50 mg/m² to about 80 mg/m² or from about 30 mg/m² to about 70.0 mg/m².
- 10 45. The method of claim 38, wherein solid tumors are treated.
46. The method of claim 45, wherein the solid tumors are selected from the group consisting of breast, melanoma and ovarian cancer.
- 15 47. The method of claim 45, wherein the amount of solution infused provides from about 1.8 mg/m² to about 58 mg/m².
48. The method of claim 45 or claim 46 further comprising the administration of growth factors.
- 20 49. The method of claim 48 wherein the growth factors are selected from the group consisting of GCSF and GMCSF.
50. The method of claim 48 or claim 49 wherein the amount of solution infused provides between about 0.33 mg/m² and from about 100 mg/m² in a 21 day schedule.
- 25 51. A formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides the PK profile shown in Figure 2B upon IV infusion into a human.
- 30

52. A formulation comprising an aqueous organic acid, its conjugate salt, and the compound of Formula II which provides the PK profile shown in Figure 2C upon IV infusion into a human.

SZ

1/13

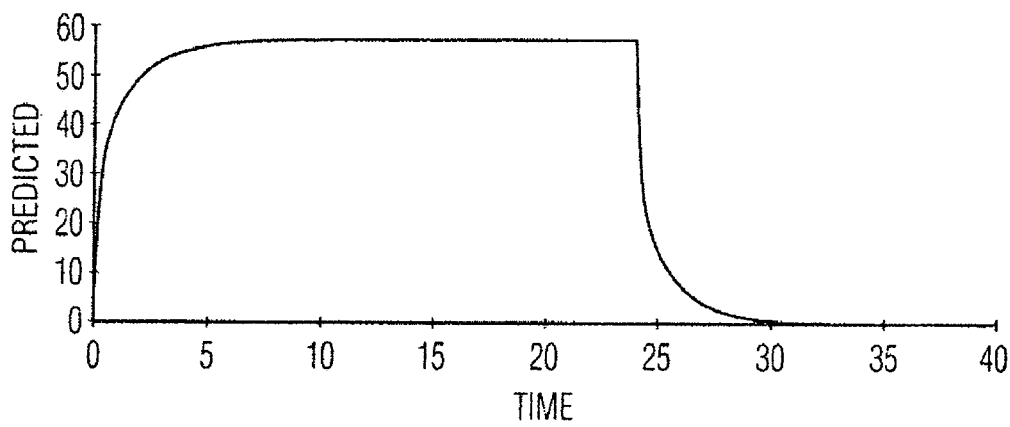


FIG. 1

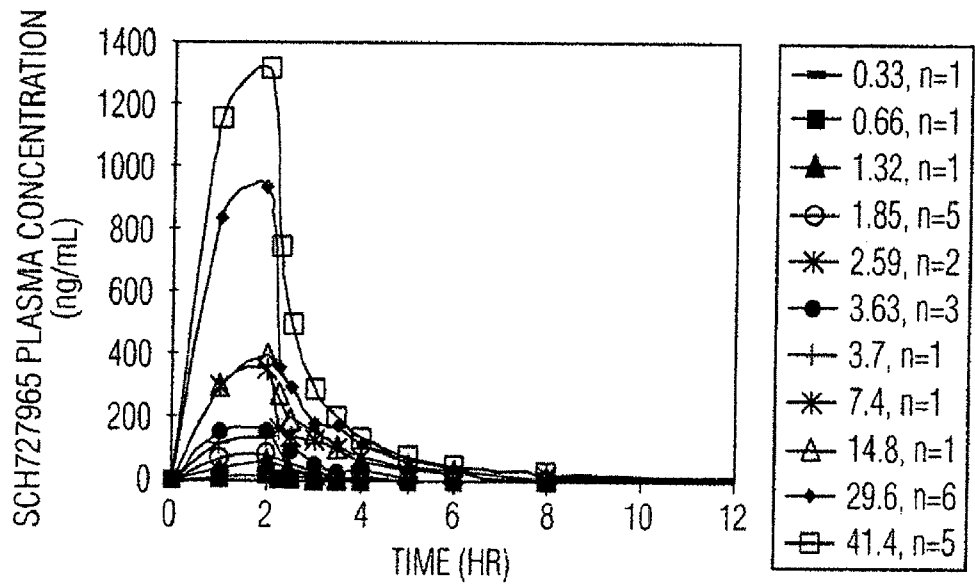


FIG. 2A

2/13

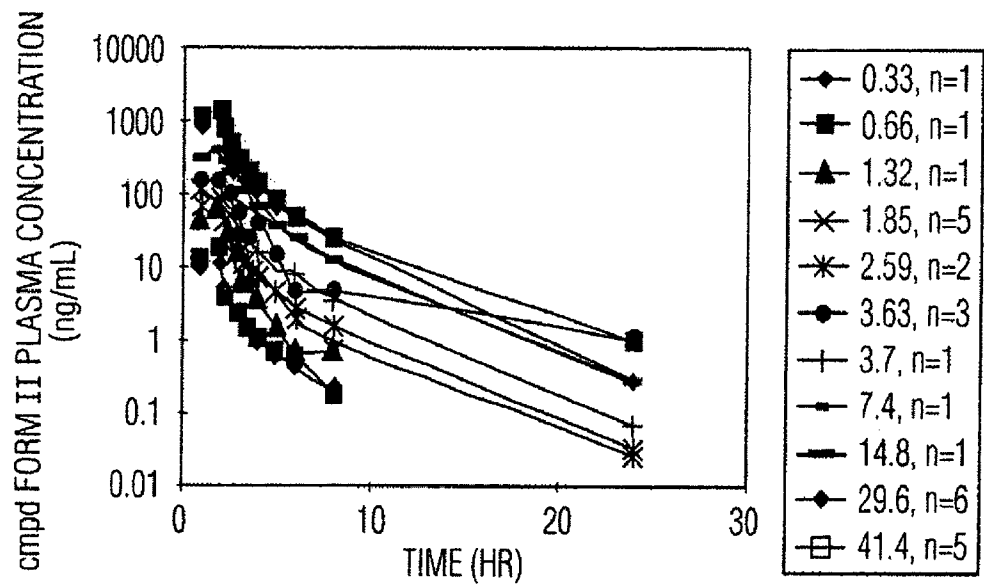


FIG. 2B

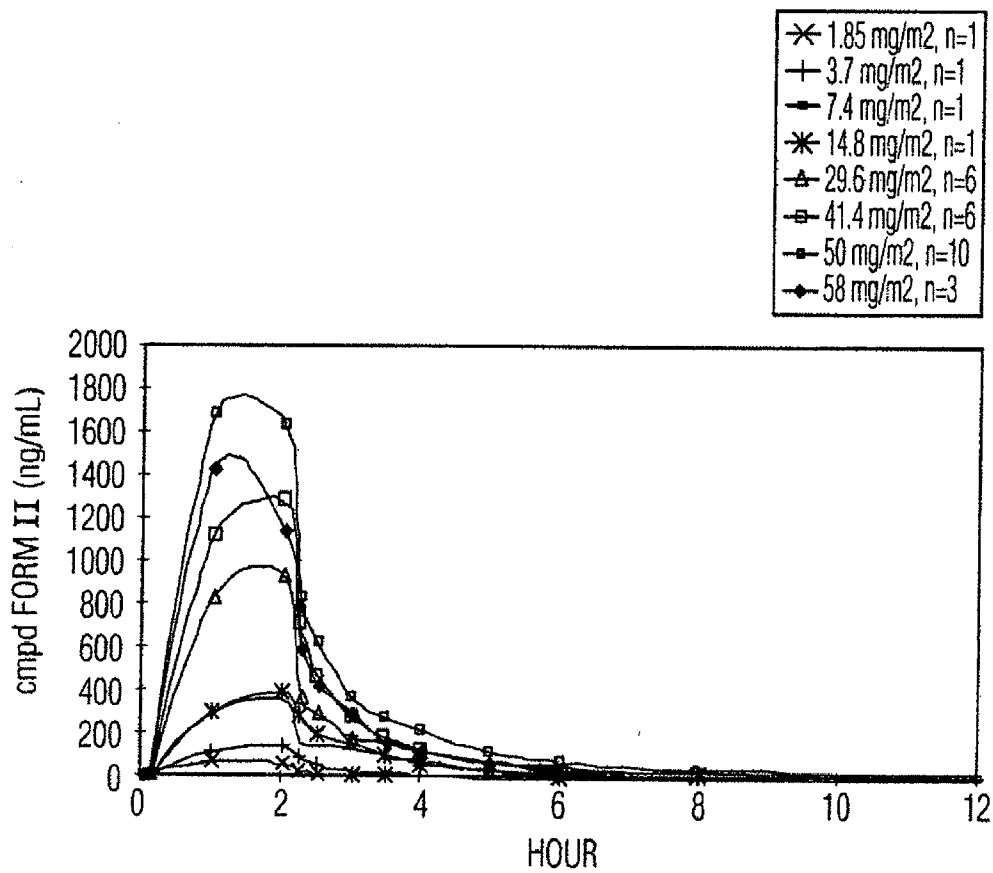
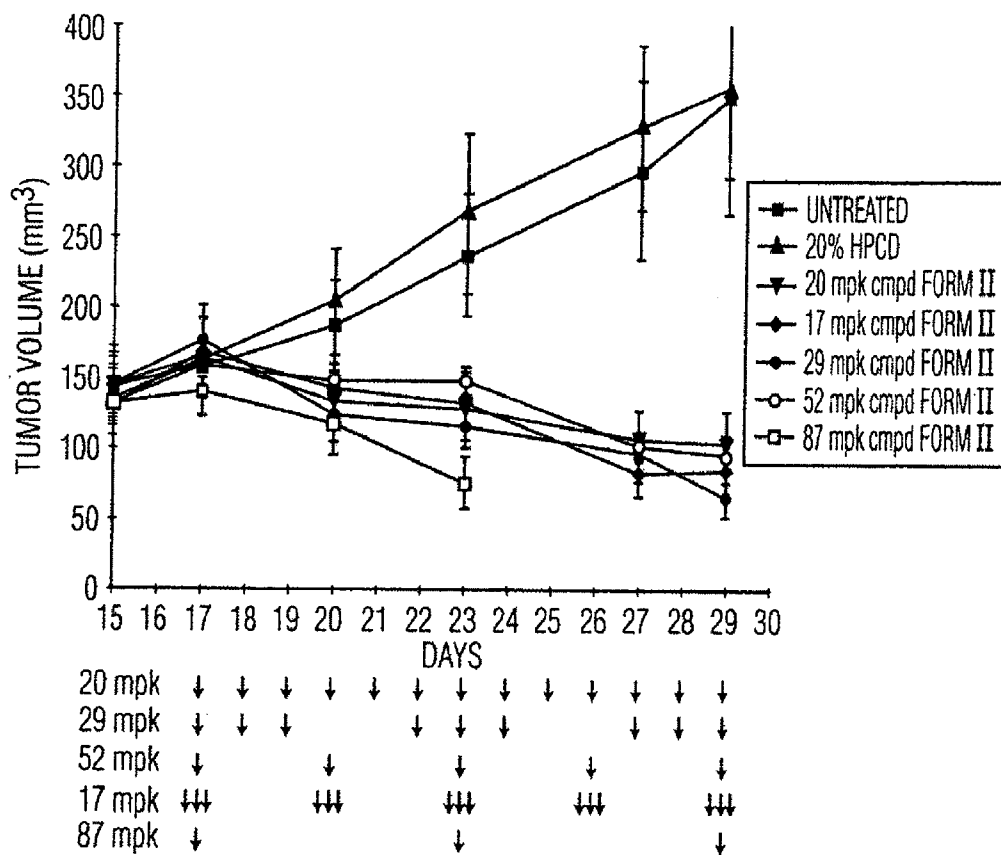
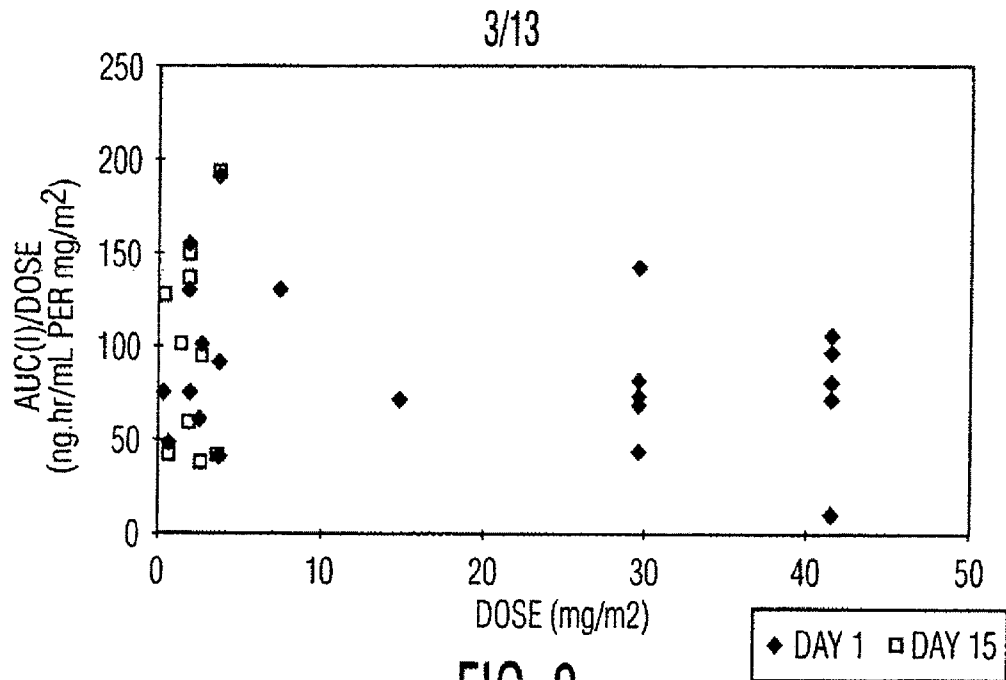


FIG. 2C



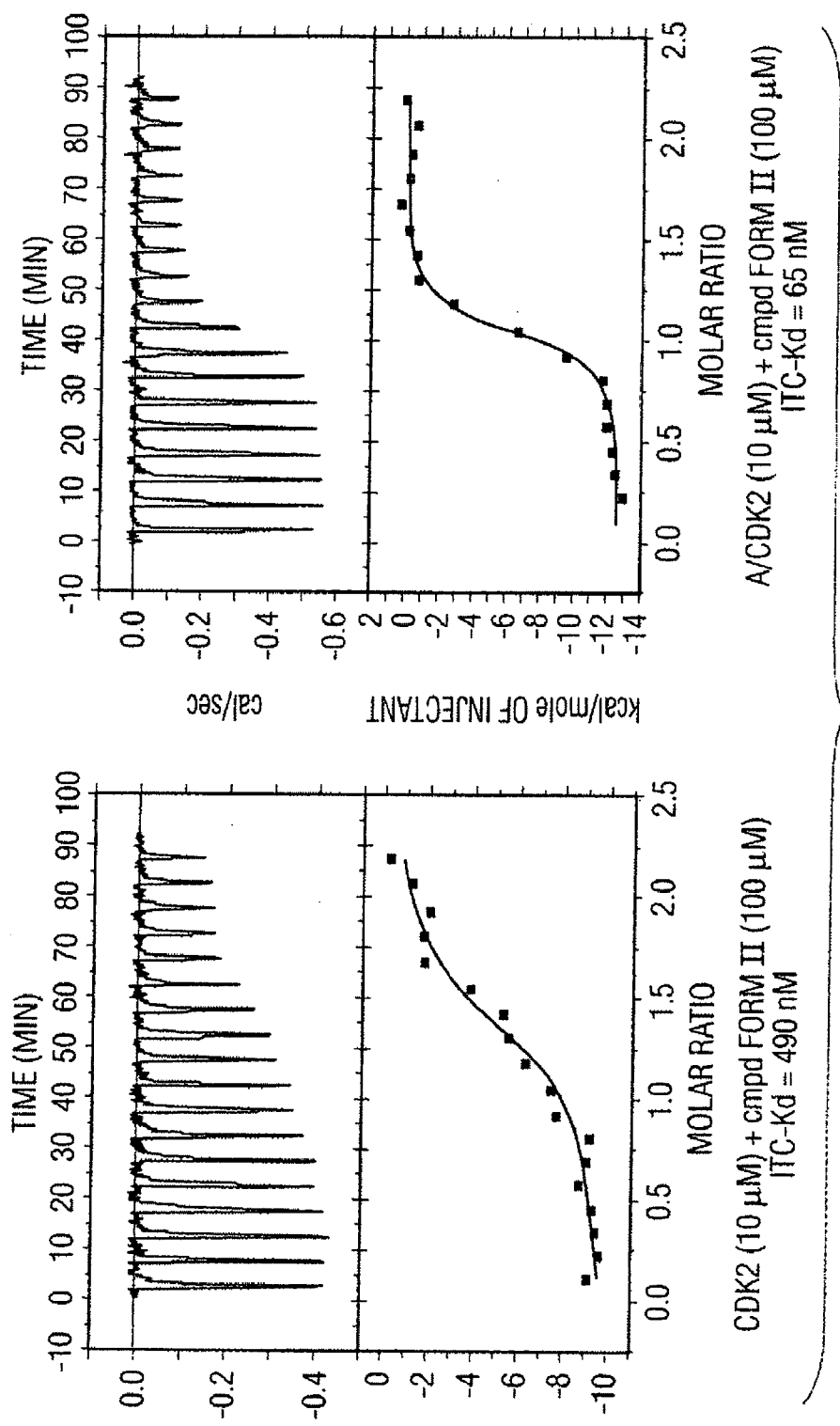


FIG. 5

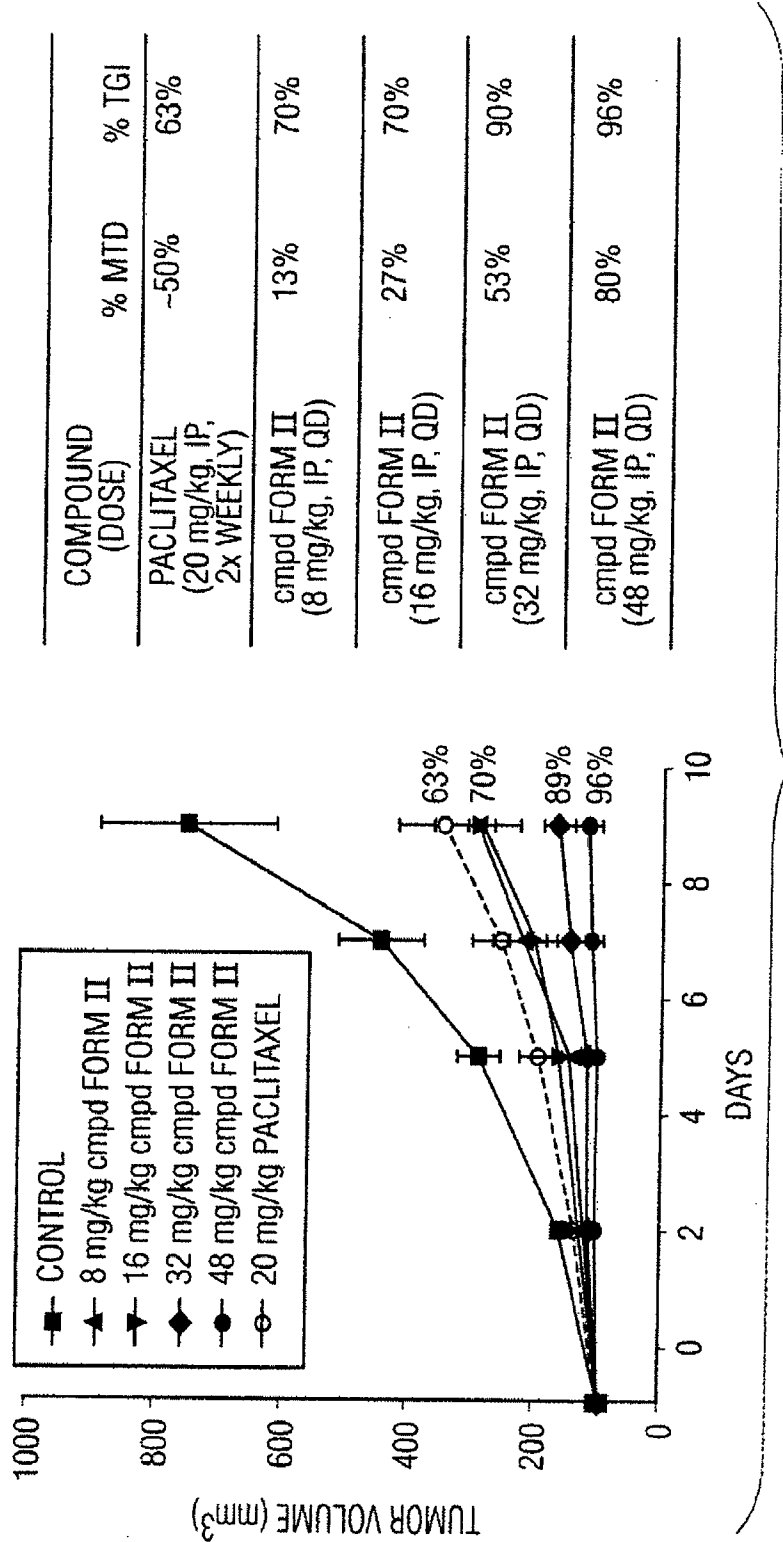


FIG. 6

COMPOUND (DOSE)	% MTD	% TGI
PACLITAXEL (20 mg/kg, IP, 2x WEEKLY)	~50%	63%
cmpd FORM II (8 mg/kg, IP, QD)	13%	70%
cmpd FORM II (16 mg/kg, IP, QD)	27%	70%
cmpd FORM II (32 mg/kg, IP, QD)	53%	90%
cmpd FORM II (48 mg/kg, IP, QD)	80%	96%

57

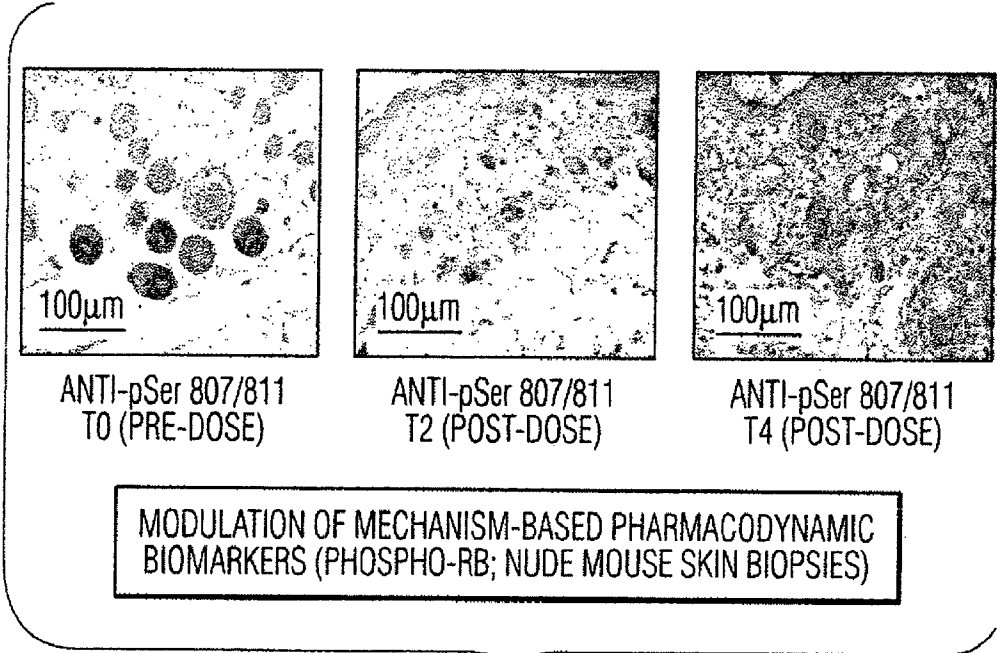


FIG. 7

52

7/13

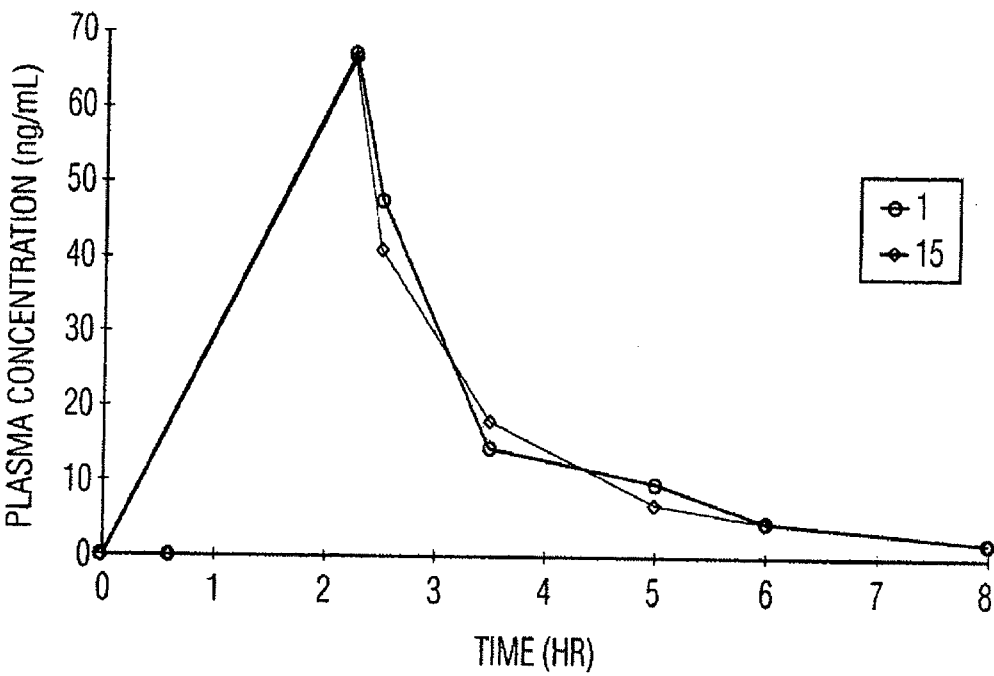


FIG. 8

8/13

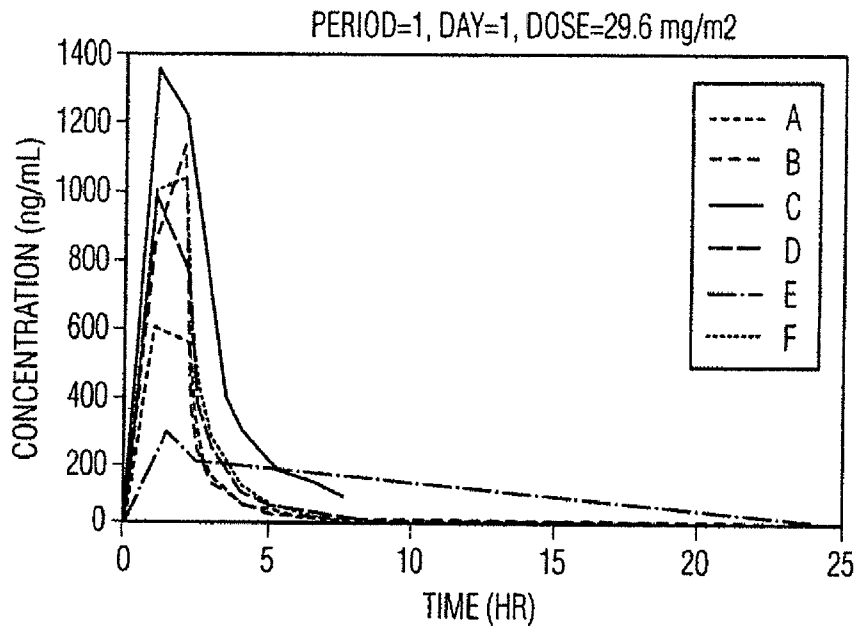


FIG. 9A

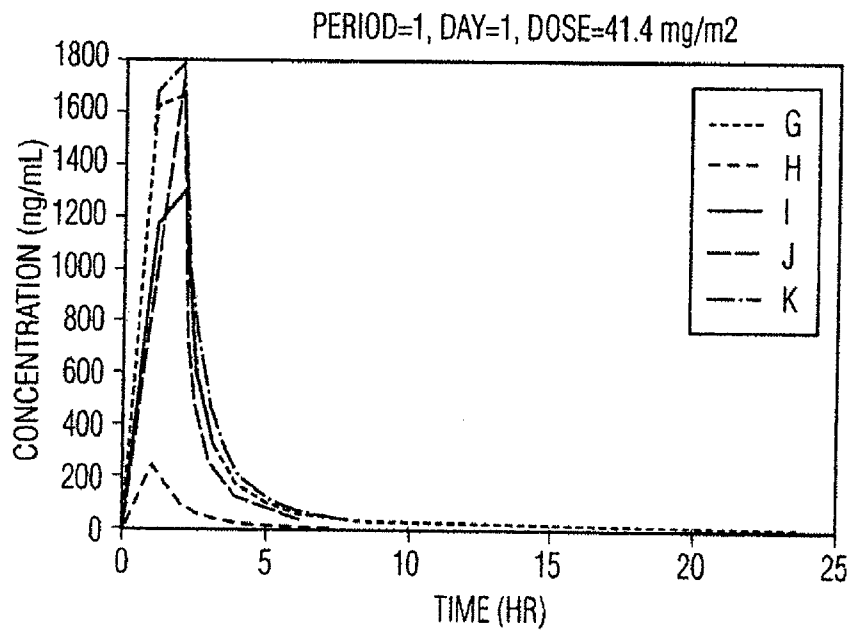


FIG. 9B

9/13

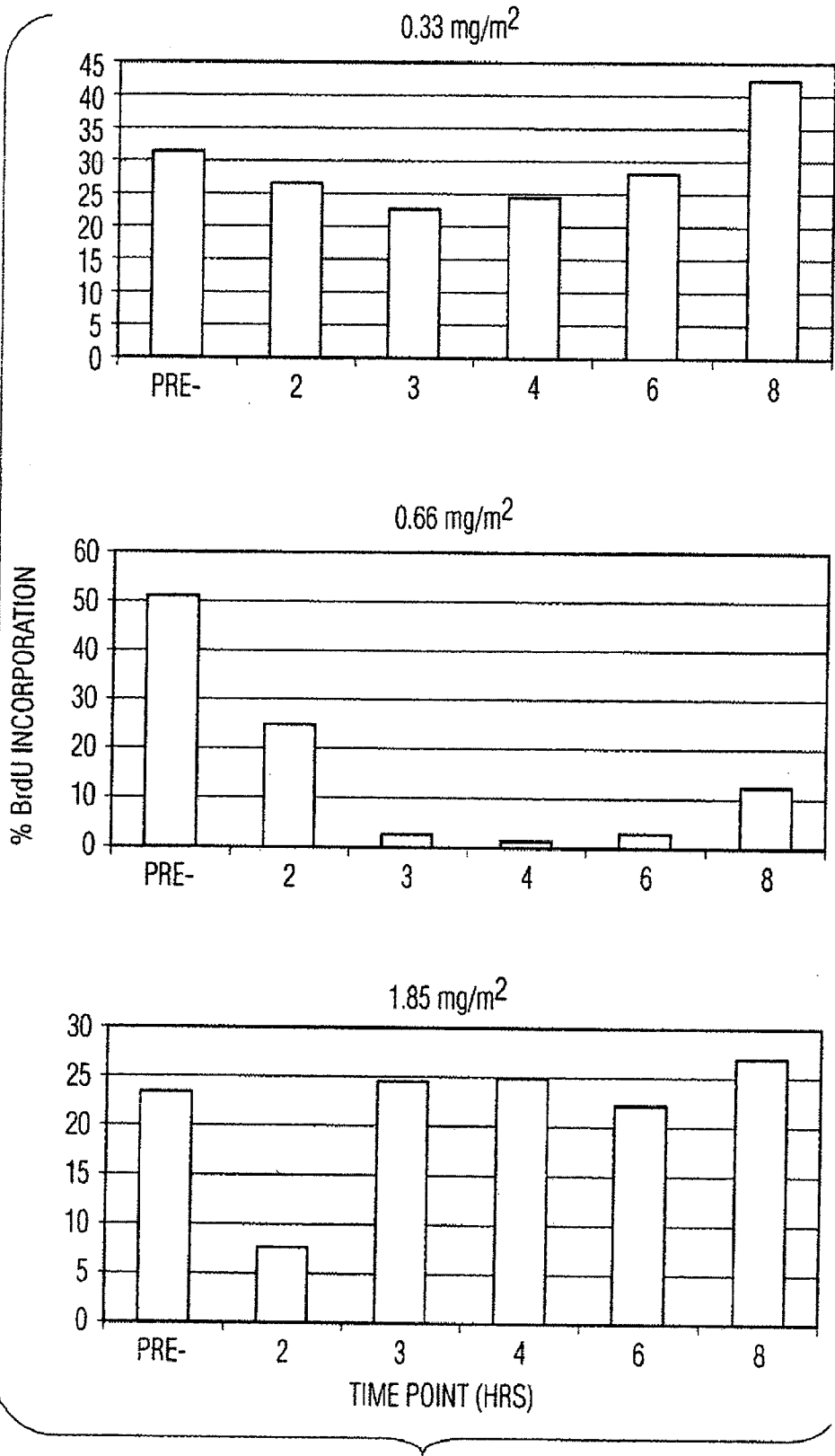


FIG. 10

61

10/13

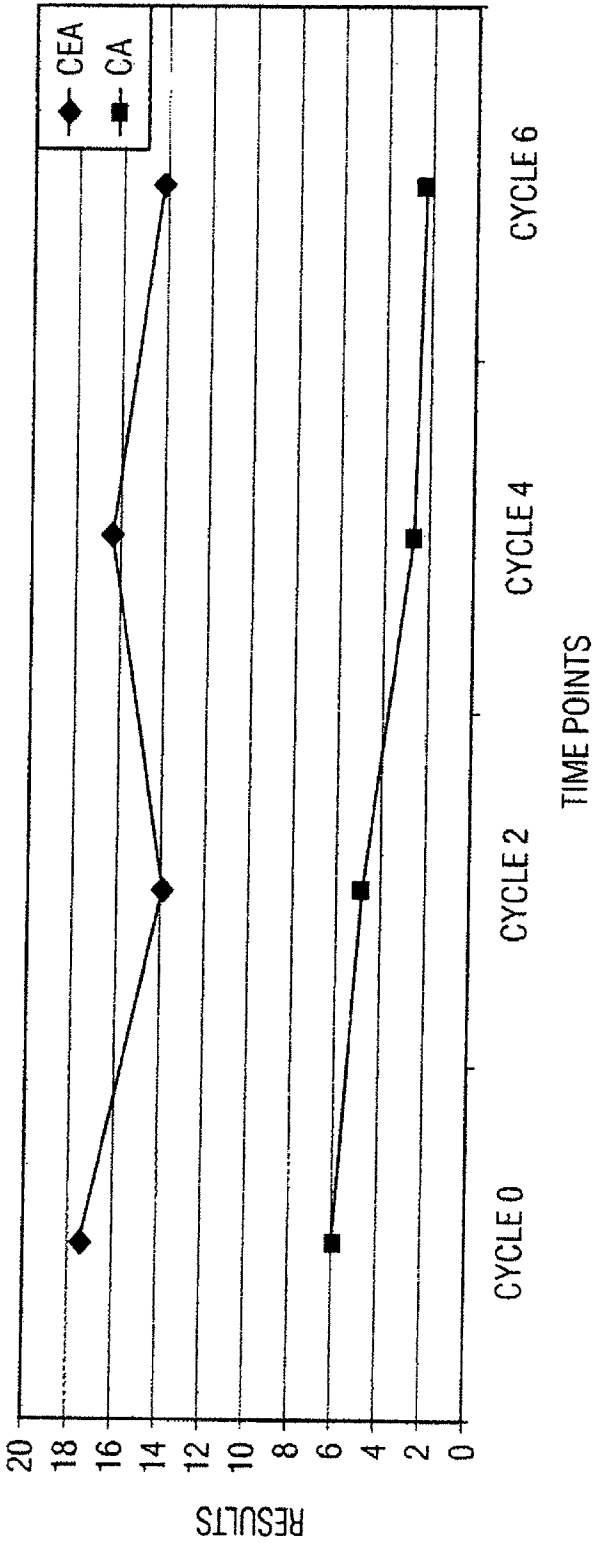


FIG. 11

62

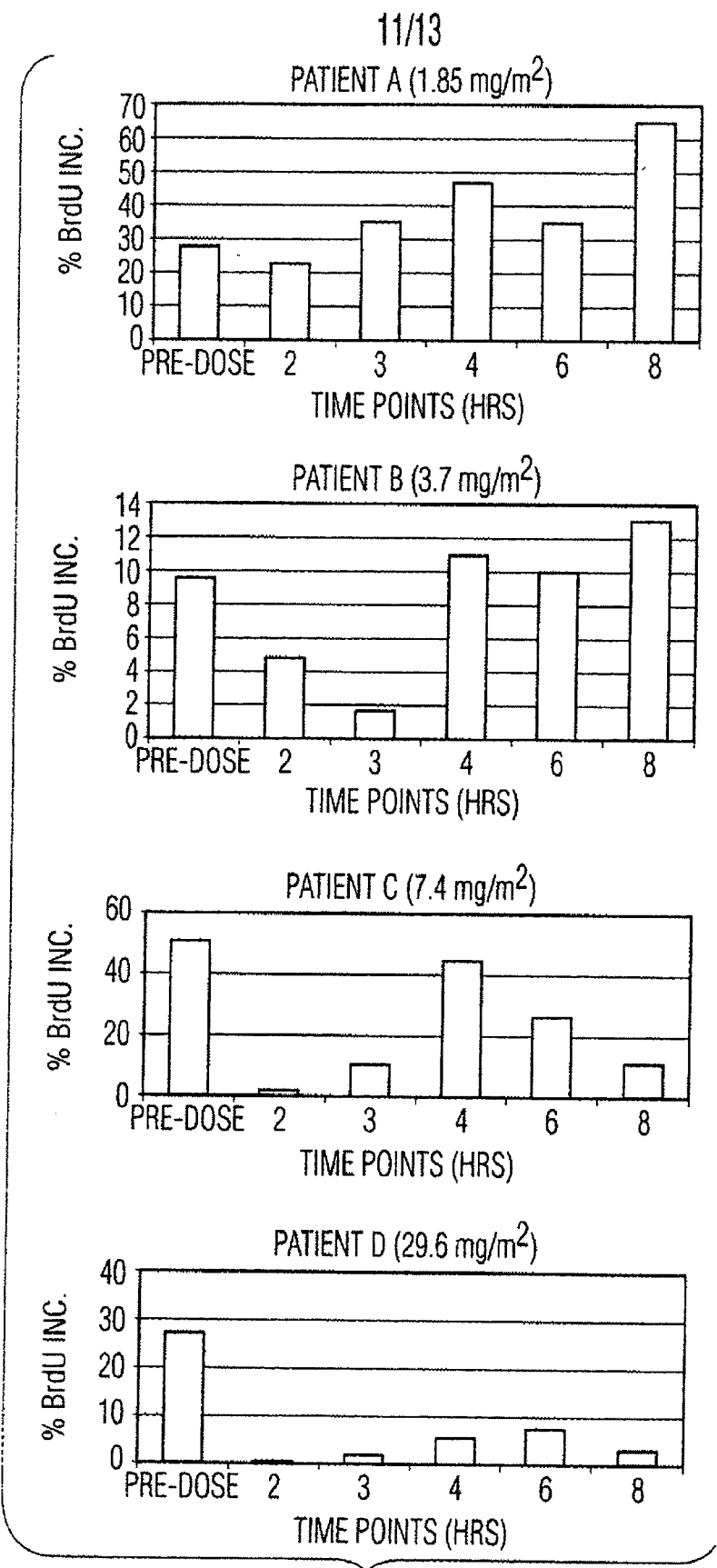


FIG. 12A

63

12/13

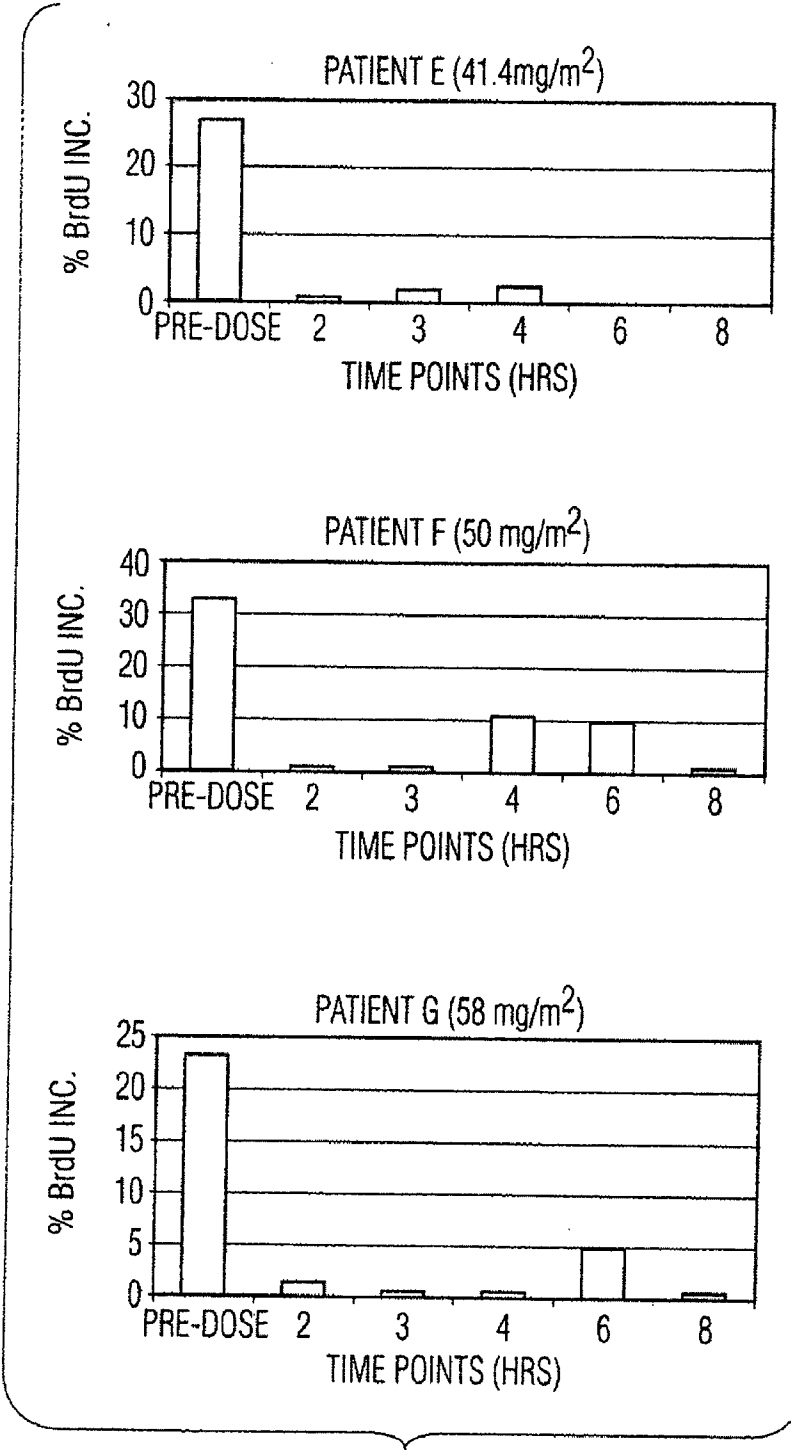


FIG. 12B

64

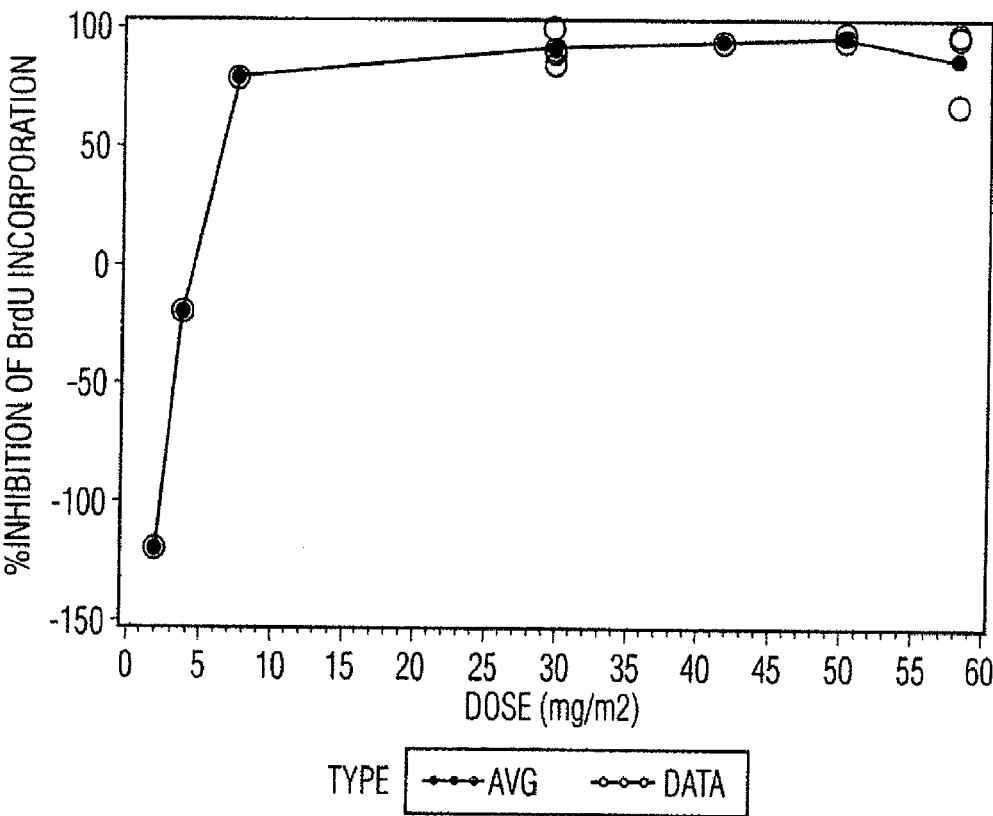


FIG. 13

65

FORMULACIÓN QUE CONTIENE UN COMPUESTO INHIBIDOR DE QUINASA
DEPENDIENTE DE CICLINA Y MÉTODO PARA TRATAR TUMORES
UTILIZANDO EL MISMO

5

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 USC 119(e) de las solicitudes de patentes provisionales U.S.S.N.: 60/994.185 presentada el 17 de septiembre de 2007, U.S.S.N.: 60/999.469 presentada el 17 de octubre de 2007 y U.S.S.N.: 61/053,784 presentada el 16 de mayo de 2008, las divulgaciones de éstas se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

10

Campo del Invento

15

Esta solicitud divulga una formulación novedosa que contiene un derivado de pirazol 3-amino- 4- sustituido la cual tiene propiedades inhibidoras de quinasa dependiente de ciclina, y a un método para tratar tumores utilizando la formulación novedosa.

Fundamento del Invento

20

La identificación de cualquier publicación en esta sección o cualquier sección de esta solicitud no es una admisión que tal publicación sea estado de la técnica anterior al presente invento.

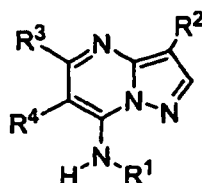
25

El ciclo celular mamífero es un proceso no redundante que integra señalización extracelular, síntesis de ADN, y mitosis. La no regulación del control del ciclo celular es un distintivo de todos los cánceres humanos y frecuentemente está asociada con activación/regulación aberrante de quinasas dependientes de ciclina, también conocidas en la presente por conveniencia, CDKs. Se cree que la falta de regulación del ciclo celular en células tumorales aumenta la predisposición de la apoptosis en células tumorales en comparación con tejido normal. Por consiguiente, los inhibidores CDK específicos pueden de manera preferencial eliminar células tumorales mientras inducen interrupciones en el ciclo celular solamente reversibles dentro de compartimientos normales de proliferación. La apoptosis de células tumorales se puede lograr sin efecto mutagénico al tejido normal. Por lo tanto, la identificación de aquellos compuestos que inhiben actividades esenciales y limitantes de tasas de las CDK2 y

30

CDK1 presenta una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento y manejo de indicaciones de oncología.

Los compuestos con propiedades inhibitoras de las quinasas dependientes de ciclina (inhibidores de CDK) y los cuales contienen una estructura derivativa de pirazol 3- amino- 4- sustituido se describen en la Patente U.S. No. 7,119,200 de Guzi (en la presente, "la patente '200" e incorporada en la presente como referencia en su totalidad) , publicada el 10 de octubre de 2006. Las síntesis eficientes de estos compuestos inhibidores de CDK, por ejemplo, los compuestos de la Fórmula I, se describen en la solicitud U.S. publicada No. 2006/0281756 (la publicación '756, incorporada en la presente como referencia en su totalidad) ,

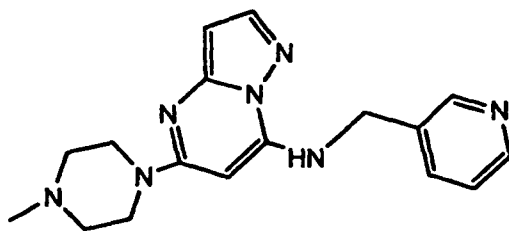


Fórmula I

en donde, R¹, R², R³, y R⁴ son como se definieron en la publicación 756, la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los compuestos de la Fórmula I son útiles en la terapia de enfermedades proliferativas, por ejemplo, tumores cancerígenos.

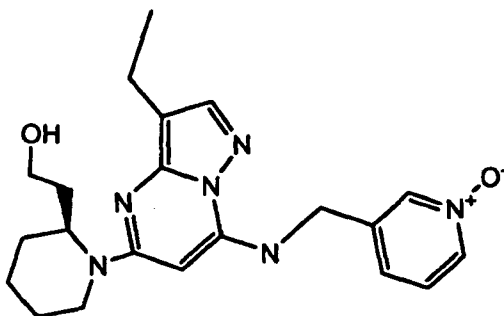
Como se describe en la patente '200, la cual se incorpora como referencia en la presente en su totalidad, se ha mostrado que los derivados de 2- (quinolin- 5- il) - azola- 4,5 disustituida de la Fórmula I tienen actividad inhibitoria de CDK con valores IC₅₀ deseables utilizando pruebas de inhibición CDK2 *in vitro* y cálculos de ajuste a la curva. Por ejemplo, el compuesto de Fórmula Ia, en donde, con referencia a la Fórmula I, R¹ es piridin- 3- il- metilamina, R² es hidrógeno, R³ es 1- metil- piperazina, y R⁴ es hidrógeno, ha sido mostrado por tener un valor IC₅₀ calculado de 5.6 micromolar para sitios receptores CDK (ver Tabla 87 en la patente '200 en Col. 706, Ejemplo 1) .



Fórmula Ia

6

Otros compuestos con la estructura de la Fórmula I, por ejemplo, el compuesto de Fórmula II, en donde, con referencia a la Fórmula I, R¹ es N-óxido de 3- metil- piridina, R² es etilo, R³ es 2- piperidin- 2- il- etanol, y R⁴ es hidrógeno (ver Ejemplo 1000 en la patente '200 comenzando en Col. 667) , también tienen actividad de inhibición CDK útil. El compuesto de la Fórmula II es útil para inhibir tumores, incluyendo, pero sin limitar a, proliferación, angiogénesis y/o metástasis.



Fórmula II,

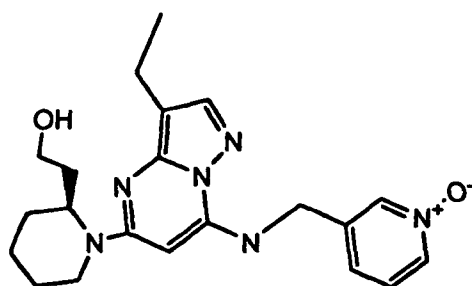
A manera de ejemplo, el compuesto de la Fórmula II puede ser útil en el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo (pero sin limitar a) los siguientes: carcinoma, incluyendo aquel de la vejiga, mama, por ejemplo cáncer de mama; colon, por ejemplo, cáncer colorectal, riñón, ducto biliar, hígado, pulmón, por ejemplo, cáncer pulmonar de células pequeñas y cáncer pulmonar de células no pequeñas, esófago, vesícula biliar, páncreas, estomago, cervix, tiroides, próstata, cáncer ovárico, cáncer vulvar, cáncer peritoneal, pseudomixoma peritoneal, y piel, por ejemplo, melanoma, y carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (CLL) , linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, Linfoma de no Hodgkins [ej., linfoma de células de manto (MCL)], linfoma de células capilares y Linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y neurofibromas; y otros tumores, incluyendo, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xerodermia pigmentosa, queratoacantoma, cáncer folicular tiroideo y Sarcoma de Kaposi.

Objetivos y Resumen del Invento

Lo necesario es una formulación farmacéutica mediante la cual los compuestos de la

Fórmula I con actividad de inhibición CDK útil se puedan administrar a un paciente en necesidad de un tratamiento terapéutico en el cual la administración de tales compuestos fuera benéfica en el manejo o tratamiento de un estado patológico, por ejemplo, el manejo o tratamiento de tumores. Estos y otros objetivos y/o ventajas son proporcionados por el presente invento.

- 5 Un aspecto preferido del presente invento es la provisión de una formulación farmacéutica concentrada conteniendo el compuesto de Fórmula II,



Fórmula II,

- la cual se puede adaptar para administración a un mamífero en necesidad de tratamiento con un tumor sensible al compuesto de la Fórmula II, la formulación comprendiendo el compuesto de la
- 10 Fórmula II, ácido cítrico, citrato de sodio y agua a un pH entre 2.5 y 7.0 aproximadamente. En una realización preferida, la solución amortiguada tiene un pH entre 3.4 y 5 aproximadamente. En algunas realizaciones se prefiere utilizar una relación molar del compuesto de Fórmula II:
- citrato de sodio : ácido cítrico de 1 mol del compuesto de la Fórmula II: 3.66 moles de citrato de sodio : 8.8 moles de ácido cítrico. En algunas realizaciones se prefiere que la Formulaci3n
- 15 comprenda una soluci3n acuosa conteniendo sobre una base de peso/volumen: (a) 5 mg/ml del compuesto de la Fórmula II; (b) 21.4 mg/ml de ácido cítrico; y (c) 11.4 mg/ml de dehidrato de citrato de sodio opcionalmente mezclado con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio suficiente para ajustar el pH del concentrado a un pH entre 2.5 y 7.0 aproximadamente, preferiblemente el
- pH es ajustado a un pH entre 3.0 y 4.0 aproximadamente, más preferiblemente el pH es ajustado
- 20 a un pH 3.5 aproximadamente.

- Otro aspecto preferido del invento es una formulaci3n Infundible por v3a intravenosa que comprende el compuesto de la Fórmula II en una soluci3n amortiguada con un pH entre 2.5 y 7.0 aproximadamente, la Formulaci3n proporciona al menos una conducta PK a una dosificaci3n
- indicada seg3n aquella mostrada en la Figura 2A y/o 2B y/o en la Tabla V, al infundirse en un
- 25 humano a los niveles de dosificaci3n indicados. En una realizaci3n preferida, la soluci3n amortiguada tiene un pH entre 3.4 y 5 aproximadamente. Preferiblemente, la formulaci3n

69

proporciona al menos una de las curvas AUC/dosis ilustradas en las Figuras 2A y/o 3 al infundirse al nivel de dosificación mostrado para cada curva en una infusión de 2 horas.

Otro aspecto preferido del invento es una formulación Infundible por vía intravenosa comprendiendo el compuesto de la Fórmula II en una solución amortiguada con un pH entre 2.5 y 7.0 aproximadamente, la formulación proporciona al menos una conducta PK a una dosificación indicada según aquellas mostradas en la Figure 2C y/o Tabla VI, al infundirse en un humano a los niveles de dosificación indicados. Preferiblemente, la formulación proporciona al menos una de las curvas AUC/dosis ilustradas en la Figura 2C cuando se proporcionan al nivel de dosificación mostrado para cada curva en una infusión de 2 horas. En una realización preferida, la solución amortiguada tiene un pH entre 3.4 y 5 aproximadamente.

Otro aspecto preferido del invento es la provisión de una formulación comprendiendo un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II el cual proporciona el perfil PK mostrado en la Figura 2A, 2B, y/o 2C ante infusión por vía intravenosa en un humano. Preferiblemente la fórmula comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico: sal conjugada de: 1 mol del compuesto : 8.8 moles de ácido orgánico : 3.7 moles de sal conjugada. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 1.85 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.15 horas aproximadamente, un C_{max} de 77 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 181 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 3.7 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.75 horas aproximadamente, un C_{max} de 136 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 336 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 7.4 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.86 horas aproximadamente, un C_{max} de 353 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 994 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 14.8 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.78 horas aproximadamente, un C_{max} de 396 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 1053 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 29.6 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.79 horas aproximadamente, un C_{max} de 1020 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 2531 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 41.4 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 2.8 horas aproximadamente, un C_{max} de 1343 ng/ml aproximadamente, y/o

un AUC de 3041 ng hr/mL aproximadamente. Más preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 50 mg/M² con un t_{1/2} de 2.9 horas aproximadamente, un C_{max} de 1820 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 4050 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 58 mg/M² con un t_{1/2} de 3.2 horas aproximadamente, un C_{max} de 1460 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 3290 ng hr/mL aproximadamente.

La Tabla VIII es una representación acumulativa de los datos en las Tablas V, VI y VII con una expansión en números de pacientes en ciertas dosis como se indica en la Tabla VIII.

Otra realización es la provisión de una formulación comprendiendo un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II el cual proporciona el perfil PK mostrado en la Figura 2A, 2B, y/o 2C ante infusión por vía intravenosa en un humano. Preferiblemente la fórmula comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico: sal conjugada de: 1 mol del compuesto : 8.8 moles de ácido orgánico : 3.7 moles de sal conjugada.

Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 1.85 mg/M² con un t_{1/2} de 2,29 horas aproximadamente, un C_{max} de 91 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 211 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 3.7 mg/M² con un t_{1/2} de 2.75 horas aproximadamente, un C_{max} de 136 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 336 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 7.4 mg/M² con un t_{1/2} de 2.86 horas aproximadamente, un C_{max} de 353 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 972 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 14.8 mg/M² con un t_{1/2} de 2.78 horas aproximadamente, un C_{max} de 396 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 1050 ng hr/mL aproximadamente.

Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 29.6 mg/M² con un t_{1/2} de 2.98 horas aproximadamente, un C_{max} de 890 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 2430 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 41.4 mg/M² con un t_{1/2} de 2.8 horas aproximadamente, un C_{max} de 1300 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 2890 ng hr/mL aproximadamente. Más preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 50 mg/M² con un t_{1/2} de 2.9

horas aproximadamente, un $C_{\max}$ de 1820 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 4090 ng hr/mL aproximadamente. Preferiblemente la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 58 mg/M² con un $t_{1/2}$ de 3.2 horas aproximadamente, un $C_{\max}$ de 1460 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 3300 ng hr/mL aproximadamente.

5 En algunas realizaciones se prefiere preparar el concentrado proporcionando una solución conteniendo un ácido orgánico y su sal conjugada, disolver la cantidad deseada del compuesto de la Fórmula II en el mismo, titular la solución resultante con ácido acuoso y base acuosa hasta que la solución conteniendo el compuesto de la Fórmula II logre el pH deseado, y opcionalmente diluir la solución amortiguada con agua o una solución acuosa, por ejemplo, una solución salina, para lograr la concentración deseada del compuesto de la Fórmula II. En una realización preferida, la solución amortiguada tiene un pH entre 3 y 5 aproximadamente. En algunas realizaciones se prefiere preparar la solución utilizada para preparar el concentrado a partir de un ácido orgánico y sal conjugada seleccionada a partir de ácido cítrico/citrato de sodio y ácido láctico/lactato de sodio.

15 En un aspecto el presente invento comprende tratar o manejar un estado patológico mediante la administración del concentrado, o una forma diluida del concentrado, a un mamífero en necesidad del mismo, preferiblemente mezclando el concentrado con el contenido de una bolsa de solución salina USP para uso intravenoso, preferiblemente una bolsa de solución salina estándar para uso intravenoso de 250 ml, para proporcionar un medicamento apropiado para infusión intravenosa. En algunas realizaciones se prefiere mezclar una cantidad suficiente del concentrado para proporcionar entre 0.92 microgramos del compuesto de la Fórmula II/ml de solución salina y 372 microgramos aproximadamente del compuesto de la Fórmula II /ml de solución salina.

25 En algunas realizaciones, una cantidad del concentrado diluido se administra a un mamífero en necesidad de tratamiento igual a entre 0.33 mg/m² y 58 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II, preferiblemente entre 0.33 mg/m² y 58 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II, más preferiblemente entre 50 mg/m² y 58 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II. En algunas realizaciones se prefiere administrar 50 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II. En algunas realizaciones se prefiere administrar el concentrado diluido mediante infusión por vía intravenosa.

72

En algunas realizaciones se prefiere administrar mediante infusión por vía intravenosa la cantidad de concentrado diluido necesario para proporcionar la cantidad deseada del compuesto de la Fórmula II durante un periodo de entre 1 hora y 24 horas. En algunas realizaciones se prefiere la administración de una infusión por vía intravenosa comprendiendo una dosis entre 0.33 mg/m² del compuesto de la Fórmula II y 58 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II para administrar la infusión durante un periodo de 2 horas aproximadamente. En algunas realizaciones se prefiere administrar a un mamífero en necesidad de terapia una cantidad de concentrado diluido necesario para proporcionar una dosis de 14.8 mg/m² del compuesto de la Fórmula II a una tasa de infusión que proporcione una concentración estable en plasma de 58 ng/ml aproximadamente, preferiblemente una tasa que libere el concentrado diluido durante un periodo de 24 horas.

En ciertas realizaciones preferidas, el compuesto de la Fórmula II se administra en uno o más ciclos a la densidad de dosis deseada. En una realización preferida, el compuesto de la Fórmula II se administra en un ciclo de 28 días comprendiendo administración de una vez por semana del compuesto de la Fórmula II durante tres semanas con una semana de descanso. En otra realización preferida, el compuesto de la Fórmula II se administra en un ciclo de 28 días comprendiendo administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 presenta una gráfica que estima el perfil de concentración (ng/ml) versus tiempo (horas) para una infusión de 24 horas de una solución comprendiendo 14.8 mg/m² del compuesto de la Fórmula II.

La Figura 2A presenta una gráfica que muestra C_{max} y perfiles medios de concentración/tiempo en pacientes humanos voluntarios recibiendo una de 9 dosis administradas de infusión por vía intravenosa de 2 horas de la presente formulación en una cantidad en el rango entre 0.33 mg/m² y 41.4.6 mg/m² del compuesto de la Fórmula II durante un periodo de tiempo de 12 horas.

La Figura 2B presenta una gráfica mostrando perfiles medios de concentración/tiempo en pacientes humanos voluntarios recibiendo una de 9 dosis administradas diferentes de infusión por vía intravenosa de 2 horas de la presente formulación en el rango entre 0.33 mg/m² y 41.4

mg/m² del compuesto de la Fórmula II durante un periodo de tiempo de 24 horas.

La Figura 2C presenta una gráfica mostrando perfiles medios de concentración/tiempo en pacientes humanos voluntarios recibiendo una de 8 dosis administradas de infusión por vía intravenosa de 2 horas de la presente formulación en una cantidad en el rango entre 1.85 mg/m² y

5 58 mg/m² del compuesto de la Fórmula II durante un periodo de tiempo de 12 horas.

La Figura 3 presenta una gráfica mostrando exposición en voluntarios humanos saludables para una serie de dosis de la presente formulación conteniendo una cantidad del compuesto de la Fórmula II en el rango entre 0.33 mg/m² y 41.4 mg/m² administrada mediante infusión por vía intravenosa de 2 horas.

10 La Figura 4 presenta una gráfica mostrando los efectos de varios regímenes de dosificación del compuesto de la Fórmula II sobre supresión de volumen tumoral en modelos de xenoinjerto en ratones NSCLC en A549.

La Figura 5 presenta una gráfica mostrando la afinidad de unión del compuesto de la Fórmula II con complejos de Ciclina A/CDK2.

15 La Figura 6 presenta una gráfica mostrando el efecto de inhibición del compuesto de la Fórmula II en modelo de xenoinjerto de cáncer ovárico murino con células A2780.

La Figura 7 presenta micrográficas de folículos pilosos típicos cosechados a partir de ratones desnudos expuestos a dosificaciones del compuesto de la Fórmula II, demostrando supresión de fosfo- Rb dentro de las células epiteliales proliferantes del epitelio basal y folículos pilosos.

20

La Figura 8 presenta una gráfica que muestra los perfiles de concentración/tiempo para un paciente a quien se administra mediante infusión por vía intravenosa de 2 horas una dosis del compuesto de la Fórmula II en la cantidad de 1.85 mg/m² como se observó en los días 1 y 15 de un ciclo de dosificación de 28 días.

25 Las Figuras 9A y 9B presentan perfiles PK de pacientes individuales durante 24 horas después de recibir Dosificaciones de infusión por vía intravenosa del compuesto de la Fórmula II en las cantidades de 29.8 mg/m² y 41.4 mg/m² respectivamente.

La Figura 10 presenta datos que muestran el efecto de varios niveles de dosificación del compuesto de la Fórmula II sobre incorporación BrdU en muestras de sangre *ex vivo*.

30 La Figura 11 presenta un cuadro que muestra los niveles descendentes de biomarcadores en un paciente diagnosticado con pseudomixoma peritoneal después de recibir 6 ciclos de

dosificaciones de infusión por vía intravenosa del compuesto de la Fórmula II.

Las Figuras 12A y 12B presentan datos que muestran el efecto de varios niveles de dosificación del compuesto de la Fórmula II sobre incorporación BrdU en muestras de sangre *ex vivo*.

5 La Figura 13 presenta datos que muestran el porcentaje de inhibición de incorporación BrdU en un punto de tiempo de 8 horas después de exposición a varios niveles de dosificación del compuesto de la Fórmula II en muestras de sangre *ex vivo*.

Descripción Detallada del Invento

10 Como se mencionó anteriormente, los compuestos de la Fórmula II (definidos en la presente) tienen actividad como compuestos farmacéuticos útiles con propiedades inhibitoras de la quinasa dependiente de ciclina. En particular, los inventores sorprendentemente han encontrado que el compuesto de la Fórmula II, cuando se administra como una formulación por vía intravenosa es proporcionado en niveles terapéuticos. Los cálculos *in vitro* indican que el

15 compuesto de la Fórmula II inhibe las quinasas CDK1 dependientes de ciclina con una afinidad farmacológica calculada (IC_{50}) de 4 nM, CDK2 con afinidad farmacológica calculada (IC_{50}) de 1 nM, CDK5 con una afinidad farmacológica calculada (IC_{50}) de 1 nM, y CDK9 con una afinidad farmacológica calculada (IC_{50}) de 4nM. Además, los inventores sorprendentemente han encontrado inhibición de CDK2/CDK1 en células tumorales conduciendo a interrupción en el

20 ciclo celular y apoptosis en más de 100 líneas celulares tumorales incluyendo el panel NCI estándar. Adicionalmente, los inventores sorprendentemente han encontrado que la exposición de modelos de xenoinjerto a plasma a través de concentraciones menores de 25 nM del compuesto de la Fórmula II durante menos de 2 horas resulta en inhibición o regresión de crecimiento tumoral. Los inventores sorprendentemente han encontrado que una formulación conteniendo el

25 compuesto de la Fórmula II apropiada para administración por vía intravenosa a humanos para lograr niveles benéficos de plasma para el tratamiento o manejo de trastornos proliferativos se puede preparar de manera que comprenda una solución acuosa amortiguada del compuesto de la Fórmula II. Las formulaciones comprendiendo el compuesto de la Fórmula II, métodos de tratar estados patológicos benignos y proliferativos utilizando las formulaciones del invento

30 conteniendo el compuesto de la Fórmula II, y ejemplos se describen a continuación con mayor detalle.

Preparación de una Formulación por vía intravenosa Comprendiendo el Compuesto de la
Fórmula II

Un aspecto del presente invento es una formulación comprendiendo el compuesto de la
5 Fórmula II apropiada para administración intravenosa (IV) . El compuesto de la Fórmula II es
soluble en medios ácidos, pero apenas soluble en medios neutrales y alcalinos. Los inventores
sorprendentemente han encontrado que una formulación apropiada se puede preparar al disolver
el compuesto de la Fórmula II en una solución ácida hecha al disolver en agua un ácido orgánico
apropiado para incorporación en un sistema amortiguado, y luego titular la solución del
10 compuesto de la Fórmula II y ácido orgánico disuelto a un pH final deseado utilizando una base
apropiada y un ácido apropiado según lo necesario para ajustar el pH.

Los ácidos apropiados son los orgánicos los cuales pueden proporcionar una solución
acuosa con un pH más ácido que pH 7.0 aproximadamente, preferiblemente un pH al menos tan
ácido como pH 3.5, y al titularse con una base apropiada pueden proporcionar una solución
15 amortiguada con un pH en el rango el cual incluye entre pH 7 y pH 2.5, y preferiblemente
pueden proporcionar una solución amortiguada con un pH de 3.5 aproximadamente.
Preferiblemente, el ácido orgánico seleccionado es libremente soluble en agua, por ejemplo,
ácido láctico o cítrico, más preferible, el ácido orgánico elegido tiene más de un protón ácido,
por ejemplo, ácido cítrico.

20 El compuesto de la Fórmula II, apenas soluble en agua neutral, es fácilmente soluble en
soluciones ácidas acuosas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, en la preparación de la
formulación del invento se prefiere inicialmente preparar una solución acuosa ácida,
preferiblemente una solución ácida comprendiendo al menos aproximadamente 0.111 M del
ácido seleccionado, disolver en el mismo una sal conjugada, por ejemplo, citrato de sodio y
25 lactato de sodio, y luego disolver en la solución amortiguada resultante una alícuota del
compuesto de la Fórmula II. Después de terminar la disolución la solución resultante es titulada
para lograr el pH deseado utilizando un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, y base, por
ejemplo, hidróxido de sodio, en las cantidades necesarias para llevar la solución al pH deseado o
dentro del rango de pH deseado. Preferiblemente la solución es más ácida que pH 2.5
30 aproximadamente, más preferida es una solución con un pH entre pH 3 y pH 5. En una
realización preferida, la solución tiene un pH entre pH 3.0 y pH 4.2, más preferiblemente entre

pH 3.4 y pH 3.6. Una vez el pH deseado es alcanzado, el volumen de la solución ácida amortiguada conteniendo el API es ajustado con una o más alícuotas de agua para llevar la solución a un volumen que rinda una solución proporcionando 5 mg/ml aproximadamente del API. Se apreciará que soluciones apropiadas se pueden preparar bajo condiciones de fabricación
5 asépticas o esterilizadas después de la fabricación. Se apreciará que la formulación del invento se puede preparar utilizando otros procesos produciendo una solución acuosa ácida amortiguada con la concentración deseada de API y un pH entre 2.5 y 7.0 aproximadamente, preferiblemente entre pH 3 y pH 5, más preferiblemente entre pH 3.0 y pH 4.2, sin apartarse de la formulación del invento.

10

Método de Uso

En una realización, la formulación del invento es una formulación concentrada diseñada para ser diluida según necesidad mediante adición del concentrado en una bolsa estándar para uso intravenoso conteniendo 250 ml de solución salina al 0.9% en una cantidad que proporciona
15 el número deseado de miligramos de API para realizar tratamiento. Está dentro del alcance del invento ajustar la concentración de la formulación según lo necesario para proporcionar una formulación suficientemente concentrada en API para acomodar en el espacio muerto de una bolsa de solución salina de 250 ml una cantidad del concentrado proporcionando el número deseado de mg de API. Sin embargo, preferiblemente el concentrado contiene 5 mg/ml

20

aproximadamente y cuando se necesita en una cantidad en exceso de aquella la cual se puede acomodar dentro del espacio muerto de una bolsa de solución salina de 250 ml, la cantidad de concentrado necesario se divide en alícuotas las cuales se agregan a múltiples bolsas de solución salina para administración al paciente. Como se apreciará a medida que mayores o menores cantidades de la solución concentrada son introducidas en la bolsa de solución salina el pH será
25 alterado. Preferiblemente, el pH de la solución infundible está entre pH 3.4 y pH 7, más preferiblemente entre pH 3.4 y pH 5 aproximadamente. Se pueden obtener soluciones levemente más ácidas a mayores niveles de dilución del concentrado, como se apreciará, debido a la disminuida capacidad de amortiguación del concentrado con dilución creciente. Se apreciará que cualquier valor pH compatible con la fisiología del paciente se puede utilizar siempre y cuando
30 el tiempo de infusión sea ajustado para prevenir o minimizar daño en la vena en la cual la composición es infundida.

En otra realización, la formulación del invento es una alícuota de una cantidad suficiente del concentrado anteriormente descrito diluido en una cantidad de una solución salina para proporcionar una solución infundible por vía intravenosa conteniendo una cantidad suficiente del compuesto de la Fórmula II para proporcionar un nivel terapéutico del compuesto de la Fórmula II a un paciente cuando se proporciona al paciente.

Sin desear ser limitado por la teoría, se cree que hasta típicamente 58 mg/m^2 del compuesto de la Fórmula II se administra a un paciente en necesidad de terapia, aunque cantidades mayores y cantidades menores se pueden administrar según se desee. Preferiblemente, entre 50 mg/m^2 y 58 mg/m^2 del compuesto de la Fórmula II se administra a un paciente en necesidad de terapia. En una realización preferida, 50 mg/m^2 aproximadamente se administra a un paciente en necesidad de terapia.

La cantidad total de concentrado diluido en solución salina es infundido a un paciente durante un periodo de tiempo, típicamente un periodo entre 2 horas y 24 horas. En algunas realizaciones se prefiere infundir la cantidad total de la formulación a un paciente durante un periodo de 2 horas. En otras realizaciones se prefiere infundir la cantidad total de la formulación a un paciente durante un periodo de 8 horas. En aún otras realizaciones, para permitir un nivel de plasma estable mayor del API, se prefiere infundir la cantidad total de la formulación a un paciente durante un periodo de 24 horas. En algunas realizaciones se prefiere administrar una densidad de dosificación de 50 mg/m^2 / 3 semanas aproximadamente. En algunas realizaciones se prefiere infundir esta densidad de dosificación en un ciclo de 28 días, es decir, como una dosis de 16.7 mg/m^2 una vez por semana durante 3 semanas seguido por una semana de descanso. En algunas realizaciones se prefiere administrar esta densidad de dosificación en un ciclo de 28 días, es decir, como una dosis única de 50 mg/m^2 cada 3 semanas (es decir, administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso). En otras realizaciones, se prefiere administrar una densidad de dosificación de 58 mg/m^2 / 3 semanas aproximadamente. En algunas realizaciones, se prefiere administrar esta densidad de dosificación en un ciclo de 28 días, es decir, como una dosis de 19.3 mg/m^2 una vez por semana durante 3 semanas seguido por una semana de descanso. En algunas realizaciones, se prefiere administrar esta densidad de dosificación en un ciclo de 28 días, es decir, como a una única dosis de 58 mg/m^2 cada 3 semanas (es decir, administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso). Se pueden utilizar cantidades mayores o menores. Para proporcionar la densidad de dosis deseada, se pueden utilizar ciclos de administración que

proporcionen dosis regulares, por ejemplo, un ciclo de 28 días comprendiendo administración de una vez por semana durante tres semanas con una semana de descanso, o un ciclo de 28 días comprendiendo administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso.

Debido al papel clave de las CDKs en la regulación de proliferación celular en general, se cree que las formulaciones novedosa(s) conteniendo un inhibidor CDK de la Fórmula II actúan como agentes citostáticos reversibles útiles en el tratamiento de cualquier proceso patológico que se caracterice por proliferación celular anormal, por ejemplo crecimiento tumoral, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer, incluyendo tumores sólidos tales como cáncer de piel, por ejemplo, melanoma, mama, por ejemplo cáncer de mama, cerebro, colon y cáncer colorectal, cáncer de próstata, por ejemplo, cáncer de próstata, vesícula biliar, tiroides, carcinomas cervicales, carcinomas testiculares, cáncer vulvar, pseudomixoma peritoneal, cáncer peritoneal, cáncer ovárico, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) , etc. Más particularmente, cánceres que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y métodos del invento incluyen, pero no están limitados a: Cardiacos: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma) , mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmonares: carcinoma broncogénico (adenocarcinoma de células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas) , carcinoma alveolar (bronquiolar) , adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinales: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, linfoma) , estomago (carcinoma, linfoma, leiomiosarcoma) , páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma) , intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, Sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma) , intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma) ; Tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, Tumor de Wilm (nefroblastoma) , linfoma, leucemia) , vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma) , próstata (adenocarcinoma, sarcoma) , testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrional, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma) ; Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular) , colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma) , fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, Sarcoma de Ewing, linfoma maligno

(microglioma) , mieloma múltiple, cordoma por tumor maligno de células gigantes, osteocronoma (exostosis osteocartilaginosas) , condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; Sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformans) , meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis) , cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma,ependimoma, germinoma (pinealoma) , glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, neurofibroma, retinoblastoma, tumores congénitos) , neurofibroma de médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma) ; Ginecológicos: útero (carcinoma endometrial) , cervix (carcinoma cervical, displasia cervical pre- tumoral) , ovarios (carcinoma ovárico (cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado) , tumores de teca- granulosa, tumores de células Sertoli- Leydig, disgerminoma, teratoma maligna) , vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma) , vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rabdomyosarcoma embrionario) , trompas de Falopio (carcinoma) ; Hematológicos: sangre (leucemia mieloide (aguda y crónica) , leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda y crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico) , Enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma de células de manto) , linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de células pilosas, linfoma de Burkett, leucemia promielocítica; Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, Sarcoma de Kaposi, nevus displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; Glándulas adrenales: neuroblastoma; y Otros tumores por ejemplo: xerodermia pigmentosa, queratoacantoma y cáncer folicular tiroideo.

En algunas realizaciones una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II es utilizado para tratar cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) , cáncer de mama, cáncer ovárico, leucemias agudas [ej., leucemia mielogena aguda (AML) o leucemia linfocítica aguda (ALL)], leucemias crónicas (ej., CLL) , linfoma no Hodgkin (ej., MGL) , melanoma, y mieloma múltiple.

En una realización, una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II se administra a un paciente durante un periodo de 8 horas. A manera de ejemplo, y no limitación, los rangos de dosificación de una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II para un periodo de infusión de 8 horas pueden estar entre 1.85

80

mg/m² y 70 mg/m² y entre 15 mg/m² y 30 mg/m². En algunas realizaciones esta dosificación se administra como un ciclo de 21 días (administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso) .

En otra realización, una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II se administra a un paciente durante un periodo de 24 horas. A manera de ejemplo, y no limitación, rangos de dosificaciones para un periodo de 24 horas pueden estar entre 1.85 mg/m² y 100 mg/m², entre 50 mg/m² y 80 mg/m² y entre 30 mg/m² y 70.0 mg/m². En algunas realizaciones esta dosificación se administra como un ciclo de 21 días (administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso) .

En otra realización, los tumores sólidos (ej., mama, melanoma, ovario) son tratados mediante los métodos descritos en la presente. A manera de ejemplo, y no limitación, en esta realización una dosificación de una formulación comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II entre 1.85 mg/m² y 58 mg/m² (ej., 20 mg/m², 30 mg/m², 40 mg/m², 50 mg/m²) se administra sobre un ciclo de 21 días (es decir, administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso) . La dosificación puede ser infundida sobre un periodo de tiempo de 2 horas, 8 horas o 24 horas.

En una realización alternativa, los tumores sólidos (ej., mama, melanoma, ovario) son tratados mediante los métodos descritos en la presente en conjunción con factores de crecimiento (ej., GCSF y GMCSF) . A manera de ejemplo, y no limitación, los rangos de dosificación de una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II pueden estar entre 0.33 mg/m² y 100 mg/m² en un esquema de 21 días (administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso) . La dosificación puede ser infundida durante un periodo de tiempo de 2 horas, 8 horas o 24 horas.

En otra realización, una dosificación de una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II entre 1.85 mg/m² y 100 mg/m² y entre 40 mg/m² y 70 mg/m² se administra en un ciclo de 21 días (es decir, administración el Día 1 seguido por 20 días de descanso) . La dosificación puede ser infundida durante un periodo de tiempo de 2 horas, 8 horas o 24 horas.

En aún otra realización, una dosificación de una formulación del invento comprendiendo un inhibidor CDK de la Fórmula II entre 0.33 mg/m² y 30 mg/m², entre 0.33 mg/m² y 14 mg/m² o entre 7 mg/m² y 12 mg/m² se administra en un ciclo de 28 días (es decir, dosificación una vez por semana durante tres semanas seguido por una semana de descanso) . La dosificación puede

8

ser infundida durante un periodo de tiempo de 2 horas, 8 horas o 24 horas. En algunas realizaciones se tratan los cánceres hematológicos. En otras realizaciones se tratan los tumores sólidos.

5 Como se utiliza en la presente, el tratamiento de cáncer incluye tratamiento de células cancerígenas, incluyendo células afligidas por cualquiera de las condiciones anteriormente identificadas.

10 Las formulaciones del presente invento también pueden ser útiles en la quimioprevención del cáncer. La quimioprevención es definida como la inhibición del desarrollo de cáncer invasivo ya sea bloqueando la iniciación del evento mutagénico o bloqueando la progresión de células pre- malignas que ya han sufrido un ataque o inhibición reincidencia de tumor. Las formulaciones del presente invento también pueden ser útiles en la inhibición de angiogenesis y metástasis tumoral.

EJEMPLOS

15 A continuación se describen varios ejemplos que ilustran la formulación y método de tratamiento del invento. Todos los experimentos animales se realizaron según buenas prácticas de laboratorio según los estándares de la industria farmacéutica. Todos los reactivos utilizados en la preparación de las formulaciones fueron de Grado Alimenticio o USP.

20 **Ejemplo 1: Preparación de una formulación Conteniendo el compuesto de la Fórmula II**

25 En un recipiente de acero inoxidable de 500 L equipado con una paleta de agitación se colocó 400 kg de agua a temperatura ambiente (entre 20 y 30 °C) . Se disolvió ácido cítrico (10.682 g) en el mismo, con agitación. El recipiente se agitó durante 10 minutos manteniendo la temperatura ambiente y el equipo de adición fue enjuagado con 0.2 kg de agua adicional, la cual se agregó a la solución. Cuando la disolución de ácido cítrico estuvo completa, la agitación continuó y se agregó 5.710 g de citrato de sodio a la solución con agitación hasta disolver, manteniendo la temperatura ambiente. El equipo de adición fue enjuagado con 0.2 kg de agua adicional la cual se agregó a la solución de ácido cítrico/citrato de sodio. La temperatura de la solución fue ajustada y mantenida a una temperatura entre 20 °C y 30 °C. A la solución se
30 agregó, con agitación, 2,585 g del compuesto de la Fórmula II (96.7 % activo, API, compuesto de la Fórmula II preparado según los métodos descritos en la publicación '756 antes citada) . La

agitación continuó hasta que todo el API agregado se disolvió en la solución de ácido cítrico/citrato de sodio. El equipo de adición fue enjuagado en la solución con 1.2 kg de agua adicional. Cuando la disolución terminó, el volumen de la solución resultante fue ajustado a 490 kg mediante adición de agua, y el pH fue ajustado mediante titulación con 1 M solución de hidróxido de sodio, y solución de 0.1 M HCl para rendir un pH final de pH 3.5. El volumen de la solución amortiguada se ajustó a 507 kg mediante adición de agua.

Ejemplo 2: Estudios de Tumores de Modelos de Xenoinjertos en Ratones desnudos

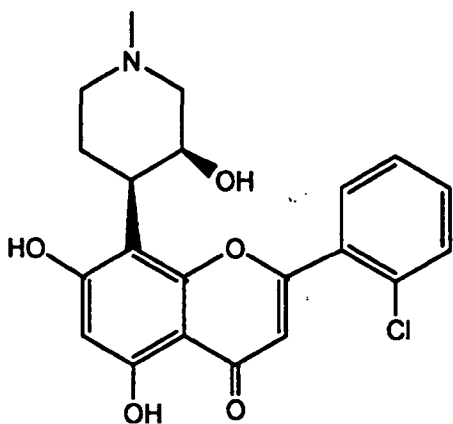
La eficacia de la formulación comprendiendo el compuesto de la Fórmula II preparada en Ejemplo 1 fue examinada en el modelo de xenoinjerto de cáncer ovárico A2780. Para todos los modelos experimentales, la dosis máxima tolerada fue definida como aquella dosis, sobre la duración del esquema dado, que resultó en una pérdida de peso del 20% en dichos ratones.

Al realizar este estudio, las células A2780 fueron inoculadas en ratones desnudos subcutáneamente y los tumores se dejaron crecer hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 100 mm³ (aproximadamente 7 días). Grupos de diez de estos animales de prueba fueron inyectados IP con la formulación preparada en Ejemplo I a niveles de dosificación de: 8 mg/kg (dosis máxima tolerada (MTD) al 13%); 16 mg/kg (27% MTD); 32 mg/kg (53% MTD); y 48 mg/kg (80% MTD), diariamente durante 10 días. Una solución de paclitaxel fue inyectada IP en un grupo de control a un nivel de dosificación de 20 mg/kg dos veces por semana (50% MTD) junto con los grupos de control inyectados con la formulación que no incluyó API. Los resultados de inhibición de crecimiento tumoral son mostrados en la Figura 6. La Figura 6 muestra que los grupos de control tuvieron crecimiento tumoral a un volumen de 800 mm³ aproximadamente durante el periodo de diez días, mientras los animales dosificados con paclitaxel tuvieron crecimiento tumoral inhibido en 63%. Los grupos de ratones recibiendo la formulación comprendiendo el compuesto de la Fórmula II exhibieron inhibición de crecimiento tumoral de 70% (ambos niveles de dosificación 8 mg/kg y 16 mg/kg), 90% (nivel de dosificación de 32 mg/kg), y 96% (nivel de dosificación de 48 mg/kg). Estos datos muestran que el nivel de inhibición del 50% (el cual en este modelo define la dosis mínima efectiva) es aparentemente menor de 8 mg/kg. Además, se encontró que los animales expuestos al nivel máximo de dosificación del compuesto de la Fórmula II mostraron pérdida de peso corporal

durante el curso del experimento de 5% aproximadamente, demostrando que la formulación es bien tolerada.

La formulación se administró a ratones BALB/c a un nivel de dosificación de 40 mg/kg una vez por día durante cinco días. Las muestras de sangre se obtuvieron los días 1 y 7; después de la última dosis y se analizaron en un analizador de hematología Advia 120 inmediatamente después de dilución 1:5 en PBS. Se realizó un diferencial sanguíneo, incluyendo análisis de glóbulos rojos (incluyendo análisis de reticulocitos, conteo variante y de hemoglobina) , análisis de glóbulos blancos (incluyendo conteos diferenciales de linaje y teñido con peroxidasa) y un análisis de trombopoyesis. No se observó efecto sobre las plaquetas o glóbulos rojos.

En un estudio relacionado, dosis con incrementos de la formulación preparada en Ejemplo 1 y una formulación conteniendo el compuesto de la Fórmula III,



Fórmula III

(Flavopiridol) fueron administradas a ratones desnudos con xenoinjertos de carcinoma ovárico A2780 sobre un esquema de dosificación de una vez por día durante 7 días. Para este estudio, la dosis máxima tolerada fue considerada aquel nivel de dosificación induciendo una pérdida del 20% de peso corporal durante el transcurso del experimento y la dosis mínima efectiva (MED) fue definida como aquel nivel de dosificación induciendo al menos una inhibición de crecimiento tumoral del 50%. Los resultados son mostrados en Tabla I, la cual reporta varios índices terapéuticos para cada compuesto. Los datos en Tabla I indican que el compuesto de la Fórmula III fue pobremente tolerado produciendo un índice terapéutico nominal (MTD/MED) menor de 1, mientras el compuesto de la Fórmula II fue bien tolerado y efectivo a una dosis significativamente menor que el MTD, el compuesto de la Fórmula II produciendo un índice terapéutico nominal de mayor de 10.

TABLA I

Compuesto	A/CDK2 IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ intracelular (Timidina; uM)	MTD* (mg/kg)	MED* (mg/kg)	Índice terapéutico (MTD/MED)
Fórmula III	0.012	0.07	<10	10	<1
Fórmula II	0.001	0.004	60	5	12
*Dosificación basada en el régimen de dosificación de una vez por día, intraperitoneal (IP) .					

Con referencia a la Figura 4, los ratones desnudos con xenoinjertos NSCLC en A549, establecidos a un volumen mayor de 100 mm³, fueron inyectados con una dosificación equivalente a 260 mg/kg del compuesto de la Fórmula II utilizando la formulación preparada en el Ejemplo I sobre 5 esquemas diferentes mostrados: (a) 20 mg/kg una vez a día durante 13 días; (b) 29 mg/kg durante 3 días, seguido por 2 días de descanso durante tres ciclos; (c) 52 mg/kg en los días 1, 4, 7, 10, y 13; (d) 17 mg/kg dos veces por día (equivalente a 52 mg/kg en 24 horas) en los días 1, 4, 7,10, y 13; y (e) 87 mg/kg los días 1, 7, y 13. Como se muestra en la Figura 4, se observó regresión en volumen y masa tumoral en todos los esquemas de dosificación. Estudios similares fueron realizados utilizando ratones con xenoinjertos para modelos tipo tumor de RPMI 8226, A549 NSCLC, NCI H460, PC3 (próstata) , H82 (SCLC) , SW527 (mama) , y MDA MB231 (mama) . Los resultados, en comparación con los agentes citotóxicos de referencias anotados, se presentan en la Tabla II, a continuación.

TABLA II

Modelo tumoral	% inhibición observado a dosificación de 5 mg/kg de la Fórmula II	% inhibición observado a dosificación de 5 mg/kg de la Fórmula II	% inhibición observado con agente citotóxico de referencia
RPMI 8226	135 (regresión)	150 (regresión)	62 (bortezomib)
A549 NSCLC	73	160 (regresión)	0 (paclitaxel)

NCI H460	45	90	5 (paclitaxel)
PC3 (próstata)	93	95 (regresión)	65 (paclitaxel)
H82 (SCLC)	56	65	40 (carboplatin)
SW527 (mama)	12	82	31 (paclitaxel)
MDA MB231 (mama)	52	70	68 (paclitaxel)

A ratones desnudos se administró una única dosis intraperitoneal de la formulación preparada en el Ejemplo I equivalente a 40 mg/kg. Muestras de piel fueron cosechadas a varios intervalos después de la dosificación y comparadas con biopsias cosechadas antes de la dosificación (TO) . Las muestras provenientes de biopsias fueron fijadas durante la noche en formalina al 10%. Luego las muestras se colocaron en alcohol al 70% para almacenamiento antes de ser fijadas en bloques de parafina, seccionadas y teñidas con antisuero fosfo- Rb Ser 807/811-específico.

Como se muestra en la Figura 7, la cual ilustra muestras típicas tomadas a intervalos durante varias horas (T2 pos- dosis) y (T4 pos- dosis) , las muestras tomadas después de administración de la formulación indican que la formulación indujo supresión rápida y sostenida de fosfo- Rb dentro de las células epiteliales proliferantes del epitelio basal y folículos pilosos.

Con referencia a la Figura 4, los ratones desnudos con xenoinjertos también fueron dosificados a la tasa de 87 mg/kg una vez cada seis días, con el esquema de dosificación dividido para dosis diaria única (20 mg/kg) , dosis diaria única durante 3 días seguido por un periodo de descanso de 2 días (dosis única de 29 mg/kg) , dosis única cada tres días (52 mg/kg, dosis única) , tres dosis de 17 mg/kg en una día, repetidas cada tres días, y una dosis de 87 mg/kg dada cada 6 días. La regresión tumoral fue observada en animales tratados con el compuesto de la Fórmula II en comparación con un control. El grado de regresión tumoral fue similar para todos los esquemas de dosificación examinados.

Ejemplo 3: Inhibición de Incorporación de Timidina o Viabilidad de Azul Alamar en una variedad de Líneas Celulares Tumorales Humanas y Confirmación de Apoptosis Celular después de Exposición Corta al Compuesto de la Fórmula II

Con referencia a la Tabla 4, varias líneas celulares tumorales humanas fueron expuestas a

26

concentraciones crecientes del compuesto de la Fórmula II durante 24 horas y luego evaluadas mediante inhibición de incorporación de timidina (células adherentes) o ensayo de viabilidad por la técnica de Azul Alamar (líneas celulares de suspensión) . El nivel de activación de apoptosis también fue evaluado determinando los niveles de caspasa activada en cada línea celular. En cada experimento, las células fueron expuestas a concentración creciente del compuesto de la Fórmula II en medio celular durante dos horas haciendo múltiples lotes del medio conteniendo cantidades diferentes del compuesto de la Fórmula II y exponiendo diferentes lotes de células al medio conteniendo el compuesto de la Fórmula II a cada concentración particular. El medio fue retirado y las células fueron re- alimentadas el medio completo sin el compuesto de la Fórmula II presente. Las células fueron evaluadas fluorométricamente para niveles de caspasa activada seis horas después de lavado. Muestras de cada línea celular también fueron sometidas a SDS- PAGE y subsiguientemente inmunoteñidos para encontrar producto de escisión de p85 PARP con caspasa. Se consideró un resultado de apoptosis positiva si la activación detectable de caspasas y acumulación de p85 PARP fue observada después una exposición de dos horas de una línea celular a concentraciones menores de 0.1 micromolar del compuesto de la Fórmula II.

Estos datos se presentan en Tabla III. Los valores IC₅₀ fueron calculados utilizando el procedimiento descrito en patente ‘200 antes citada (Tabla 87 en el mismo) . Los datos en Tabla III indican que todos los tipos tumorales experimentaron interrupción en el ciclo celular en al menos una porción de las diferentes líneas celulares probadas. Además, ningún tipo tumoral probado exhibió sensibilidad o resistencia particular al compuesto de la Fórmula II. Adicionalmente, estos datos muestran que la activación de caspasa y apoptosis fueron detectadas en más de 85% de las líneas celulares probadas después de una única exposición al compuesto de la Fórmula II. Se debe mencionar que aproximadamente 50% del set de clasificación (*screening*) es positivo para la expresión génica del MDR1 (gel 1 de múltiple resistencia farmacológica).

TABLA III - Inhibición en una Variedad de Líneas celulares

Tipo tumoral	IC ₅₀ intracelular medio (nanomolar)	Activación de Caspasa (número de líneas celulares sensibles del total probado / exposición simple)

Próstata	12	4 de 5
Mama	8	6 de 7
Colon	17	5 de 9
NSCLC	14	8 de 9
SCLC	6	2 de 6
Ovárico	14	5 de 7
Pancreático	15	11 de 15
Melanoma	9	9 de 9
Leucemia	6	5 de 6
Vejiga	10	1 de 2
Hígado	8	2 de 2
Célula de Manto	7	3 de 4
linfoma		
Linfoma (NHL)	7	8 de 8

La activación de apoptosis después de tiempos cortos de exposición de células A2780 al compuesto de la Fórmula II fue confirmada mediante exposición de cultivos de células de cáncer ovárico A2780 a concentraciones crecientes del compuesto de la Fórmula II disuelto en medio de crecimiento durante un periodo de dos horas luego retirando las células y re- alimentándolas el medio completo sin el compuesto de la Fórmula II presente durante seis horas (periodo de lavado) . Después del periodo de 6 horas de lavado, los extractos celulares fueron preparados y evaluados mediante ensayo fluorométrico para caspasas activadas (RFLU) . En este estudio se observó que la actividad de caspasa fue detectada de manera reproducible después de 2 horas de exposición al compuesto de la Fórmula II presente en concentración tal pequeña como 0.05 micromolar. Al comparar con células tratadas con concentraciones mayores del compuesto de la Fórmula II (hasta 5.0 micromolar) se encontró que la actividad de caspasa no aumentó. Estos datos indican que la actividad de caspasa es máxima a niveles de exposición de 0.05 micromolar.

Para confirmar que un perfil de exposición de dos horas fue suficiente para inducir efectos durables sobre distribución de ciclo celular, células A2780 creciendo asincrónicamente

fueron expuestas a concentraciones del compuesto de la Fórmula II disuelto en medio de crecimiento durante dos horas en el rango entre 0.001 y 30 micromolar en 16 lotes, cada uno doblando aproximadamente la concentración del compuesto de la Fórmula II sobre la concentración del lote anterior. En cada experimento, después de exposición, las células fueron lavadas y re- alimentadas con medio de crecimiento sin el compuesto de la Fórmula II presente durante 24 horas, luego pulsadas durante 30 minutos con BrdU para establecer el porcentaje de células experimentando replicación activa de ADN. Luego las células fueron fijadas, teñidas con un anticuerpo monoclonal anti- BrdU, FITC- conjugado y yoduro de propidio. Las células así preparadas fueron analizadas utilizando citometría de flujo de 2 colores con discriminación de dobletes. Este estudio mostró que a exposiciones mayores de 0.5 micromolar, el compuesto de la Fórmula II suprimió completamente la síntesis de ADN 24 horas después de la exposición. Las muestras expuestas a concentraciones mayores de 0.5 micromolar también mostraron acumulación de subG1 (asociada con células apoptóticas) . El aumento de exposición por encima de 0.5 micromolar, hasta concentraciones de 30 micromolar no aumentó el fenotipo apoptótico.

La evaluación de los efectos mecánicos de exposiciones cortas del compuesto de la Fórmula II se realizó mediante exposición de células A2780 creciendo asincrónicamente a medio de crecimiento conteniendo 0.1 mM del compuesto de la Fórmula II durante dos horas, lavando las células y re- alimentando las células el medio que no incluyó el compuesto de la Fórmula II. Después del lavado, los lisados fueron preparados a partir de células para evaluar la duración de los efectos de exposición. Las muestras fueron separadas sobre SDS- PAGE y fueron inmunoteñidas con antisueros específicos para proteína retinoblastoma hipo- fosforilada y p85 PARP para evaluar inhibición de CDK's y activación de apoptosis. Se encontró que una exposición de 2 horas de las células a 0.1 mM del compuesto de la Fórmula II fue suficiente para inducir supresión de fosforilación RB y activación de caspasa durante un periodo de más de 6 horas después del periodo de lavado.

Las células A2780 con crecimiento asincrónico fueron expuestas a concentraciones crecientes del compuesto de la Fórmula II o el compuesto de la Fórmula III durante 16 horas. Los lisados celulares fueron separados sobre SDS- Page e inmunoteñidos con un antisuero policlonal de conejo específico para un sitio de fosforilación CDK (Ser 07/811) sobre la proteína retinoblastoma supresora de tumores (RB, un sustrato CDK conocido) . La acumulación del producto p85 PARP también fue monitoreada para evaluar la activación de caspasas y

correlacionar inhibición de CDKs con el comienzo de apoptosis. Consistente con el estudio descrito anteriormente en datos celulares evaluando inhibición de incorporación de timidina (IC₅₀ de 4nM) , la formulación comprendiendo el compuesto de la Fórmula II suprimió fosfo-Ser 807/811 después de la exposición. Fosfo- Ser 807/811 fue indetectable en lisados expuestos a concentraciones mayores de 6.25 nM en el compuesto de la Fórmula II, y se observó que la supresión completa de fosforilación detectable RB fue requerida para el comienzo de apoptosis, indicada por el p85 PARP detectable. En comparación, la exposición al compuesto de la Fórmula III (flavopiridol) no indujo supresión significativa de fosforilación RB, requiriendo concentraciones de 1 micromolar aproximadamente para inducir efectos detectables sobre niveles de fosfo- Ser 807/811. A niveles de concentración por debajo de aquellos necesarios para observar inhibición de fosforilación RB, se observó activación de apoptosis. También se observó que hubo correlación pobre entre IC₅₀/EC₅₀ para el compuesto de la Fórmula III en varios ensayos intra- celulares de incorporación de timidina y biomarcadores basados en mecanismos, por ejemplo, fosfo- RB.

La Tabla IV indica que el compuesto de la Fórmula II es selectivo para la familia CDK de quinasas Ser/Thr, como se determinó mediante la contra- clasificación (counter- screening) usando el Upstate kinase Profiler, mientras el compuesto de la Fórmula III tiene más actividad general, incluyendo la inhibición de tirosina quinasa c- Src.

TABLA IV

Quinasa	Comp. Form. II a 1 μM*	Comp. Form. II a 10μ*	Comp. Form. III a 1 μM*	Comp. Form. III a 10 μM*
AMPK	94	82	67	20
Blk	69	100	73	26
CaMKII	1.02	91	44	30
CDK6/ciclinaD3	12	3	25	6
CDK7/ciclinaH/MA T1	7	4	18	6
cSRC	117	111	3	4
Fes	87	91	44	13
Lyn	108	110	73	18

~~90~~
90

MSK1	94	97	74	37
PKCα	96	94	66	20
PKCβII	110	113	75	26
PKCe	93	88	45	9
PKCθ	95	95	23	5
Rsk2	104	76	65	18
YES	92	98	68	40

* % actividad restante

La Figura 5 también muestra que el compuesto de la Fórmula II se fija con alta afinidad a complejos de ciclina A/CDK2.

5

Ejemplo 4: Estudios en Voluntarios Humanos

La formulación preparada en el Ejemplo 1 fue infundida en pacientes humanos voluntarios con cáncer después de diluirla en una bolsa de solución salina para uso intravenoso de 250 ml estándar al 0.9 %. El contenido de la bolsa para uso intravenoso fue infundido durante un periodo de dos horas. Las dosificaciones fueron preparadas utilizando una cantidad de la formulación proporcionando dosis de 0.33 mg/m², 0.66 mg/m², 1.32 mg/m², 1.85 mg/m², 2.59 mg/m², 3.63 mg/m²-, 5.08 mg/m², 7.11 mg/m², 10.00 mg/m², 12.00 mg/m² y 14.00 mg/m² del compuesto de la Fórmula II para el paciente infundido. Cada paciente fue dosificado sobre un ciclo de 28 días, comprendiendo una infusión una vez por semana durante las tres primeras semanas del ciclo los días 1, 8, y 15 de cada ciclo, sin administrar dosis en la semana después de la tercera dosis. Se recolectaron muestras de plasma antes del comienzo de una infusión, y en 1, 2 (terminación de la infusión) , 2.25, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.4, 6.0, 8.0, y 24 horas después del comienzo de la infusión. Los pacientes humanos voluntarios con cáncer también fueron dosificados una vez cada tres semanas (*es decir*, sobre un ciclo de 28 días) *vía* a infusión por vía intravenosa de 2 horas con 1.85 mg/m², 3.7 mg/m², 7.4 mg/m², 14.8 mg/m², 29.6 mg/m², 41.4 mg/m², 50 mg/m², y 58 mg/m². Los resultados de PK y AUC obtenidos fueron similares entre el esquema de dosificación de 21- días y el esquema de dosificación comparable de 28 días descrito anteriormente.

Con referencia a las Figuras 2A, 2B, y 2C, las cuales muestran la concentración en

plasma en ng/ml del compuesto de la Fórmula II después del comienzo de una infusión de dos horas para los diferentes niveles de dosificación indicados, para cada infusión, $C_{\max}$ se alcanza entre 1 y 2 horas después de comenzar la infusión. Cuando la infusión es terminada se puede observar que en cada caso el compuesto de la Fórmula II es rápidamente eliminado desde el plasma, con $T_{1/2}$ en el rango entre 1.4 y 3.3 horas dependiendo de la dosificación.

Con referencia a la Figura 3, la cual presenta AUC (ng'hr/ml) /dosis (mg/m²) para las diferentes dosis administradas el día 1 (diamantes) y día 15 (cuadrados) de un ciclo de dosificación de 28 días, parece que los aumentos proporcionales a dosis en exposición son observados para dosificaciones entre 0.33 mg/m² y 41.4 mg/m², y que depuración es independiente de dosificación. La Figura 2B también muestra que niveles de plasma de 25 nM (conseguidos a concentraciones de plasma de 10 ng/mL) son disponibles a partir de infusiones de 2 horas a dosificaciones mayores de 1.32 mg/m².

Con referencia a la Figura 8, la cual muestra datos AUC promedio para un paciente dosificado a 1.85 mg/m² los días 1 y 15 de un esquema de dosificación de 28 días, los datos AUC para cada dosis en un ciclo son similares. La proporción AUC, expresada como AUC- 15 días/AUC- 1 día fue 1.09. Las concentraciones de plasma al final de cada infusión en los días 1, 8, y 15 del ciclo 1, y el día 1 de ciclo 2 también se encontraron como similares, indicando exposición consistente para el régimen de dosificación. Esto también indica que la acumulación farmacológica no es evidente utilizando este régimen.

Con referencia a la Figura 1, la cual presenta un estimado de un perfil concentración/tiempo para una infusión de 24 horas de una dosis de 14.8 mg/m² del compuesto de la Fórmula II, se pronosticó que al extender los tiempos de infusión hasta 24 horas, se puede establecer una concentración estable en plasma a las 2 horas de comenzar la infusión y se puede extender a través de la duración de la infusión. Por consiguiente, al cambiar el tiempo de infusión por vía intravenosa, el perfil PK del compuesto de la Fórmula II en la presente formulación se puede alterar. En este caso manteniendo un nivel de plasma terapéuticamente efectivo durante un periodo de tiempo extendido.

Los parámetros PK observados en estos estudios se resumen en la Tabla V, Tabla VI, y Tabla VII. Específicamente, los datos mostrados gráficamente en las Figuras 2A y 2B corresponden a la Tabla V y los datos mostrados gráficamente en la Figura 2C corresponden a las Tablas VI y VII. Estos datos indicaron que PK exhibió variabilidad moderada entre sujetos

(C_{max} y AUC) y variabilidad entre baja y moderada entre un mismo sujeto (aproximadamente 30%) a dosificaciones de entre 0.33 mg/m² y 58 mg/m² aproximadamente. El t_{1/2} observado fue entre 1.4 horas y 3.3 horas aproximadamente.

La Tabla VIII es una representación acumulativa de los datos en Tablas V, VI y VII con una expansión en números de pacientes en ciertas dosis como se indica en Tabla VIII.

TABLA V

Dosificación (mg/M ²)	t _{1/2} (horas)	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng hr/mL)	CL (L/(hr m ²))
0.33	2.01	11.1	25.2	13.1
0.66	1.48	18.6	32.1	20.6
1.32	NA	63.8	NA	NA
1.85	2.29 (45)	95.7 (26)	201.2 (38)	10.2 (36)
2.59	3.0 d)	109 (11)	213 (35)	12.9 (35)
3.63	2.56 (38)	163 (63)	423 (91)	14.7 (91)
3.7	2.75	136	336	11.0
7.4	2.86	353	972	7.62
14.8	2.78	396	1053	14.1
29.6	2.98 (11)	890 (44)	2434 (45)	14.0 (40)
41.4	2.80 (29)	1343 (48)	3041 (51)	28.3 (133)

TABLA VI

		C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC(tf) (hr*ng/mL)	tf (hr)
--	--	-----------------------------	--------------------------	-----------------------	---------

92

Dosis (mg/m ²)	N	Promedio	CV%	Mediana	Promedio	CV%	Mediana	Rango
1.85	1	62.5	NA	1	134	NA	8	8- 8
3.7	1	136	NA	2	336	NA	24	24- 24
7.4	1	353	NA	2	970	NA	24	24- 24
14.8	1	396	NA	2	1050	NA	24	24- 24
29.6	6	890	44	1	2040	57	24	2.25- 24
41.4,	6	1300	45	2	2870	50	24	6- 24
50	10	1820	49	1.5	4050	63	24	8- 24
58	3	1460	20	1	3290	36	24	24 - 24

NA: no aplicable

TABLA VII

Dosis (mg/m ²)	N	AUC(I) (hr*ng/mL)		t _{1/2} (hr)		CL (L/hr/m ²)	
		Promedio	CV%	Promedio	CV%	Promedio	CV%
1.85	1	136	NA	1.42	NA	13.6	NA
3.7	1	336	NA	2.75	NA	11.0	NA
7.4	1	972	NA	2.86	NA	7.62	NA
14.8	1	1050	NA	2.78	NA	14.1	NA
29.6	5 ^a	2430	45	2.98	11	14.0	40
41.4	6	2890	50	2.84	26	26.8	126
50	10	4090	64	2.90	29	16.3	50
58	3	3300	37	3.15	15	19.7	44

NA: no aplicable;

5 a: n= 4 para t_{1/2} como valor no determinable para un paciente

TABLA VIII

Parámetros Farmacocinéticos Preliminares Promedio (CV%) el Día 1 Después de una Infusión Intravenosa de 2 horas con base en datos acumulativos

Dosis (mg/m ²)	N	Cmax (ng/mL)		Tmax (hr)	AUC(I) (hr*ng/mL)		VA (hr)		CL (L/hr/m ²)	
		Promedio	CV%	Mediana	Promedio	CV%	Promedio	CV%	Promedio	CV%
0.33	1	11.1	NA	1	25.2	NA	2.01	NA	13.1	NA
0.66	1	18.6	NA	2	32.1	NA	1.48	NA	20.6	NA
1.32	1	63.8	NA	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1.85	5 ^a	91.0	26	2	201	38	2.29	45	10.2	36
2.59	3 ^b	124	22	1	213	NA	3.02	NA	12.9	NA
3.63	7 ^{c,d}	195	43	1	446	52	2.63	20	11.3	69
3.7	1	136	NA	2	336	NA	2.75	NA	11.0	NA
5.08	3	173	39	2	327	21	3.19	7	15.9	19
7.11	1	347	NA	1	588	NA	3.16	NA	12.1	NA
7.4	1	353	NA	2	972	NA	2.86	NA	7.62	NA
14.8	1	396	NA	2	1050	NA	2.78	NA	14.1	NA
29.6	6 ^e	890	44	1	2430	45	2.98	11	14.0	40
41.4	6	1300	45	2	2890	50	2.84	26	26.8	126
50	10	1820	49	1.5	4090	64	2.90	29	16.3	50
58	3	1460	20	1	3300	37	3.15	15	19.7	44

Abreviaturas: AUC(I) = área bajo la curva concentración en plasma- tiempo desde tiempo cero hasta infinito;

CL = depuración; Cmax = concentración en plasma máxima observada ; CV% = coeficiente de variación, expresado en porcentaje; t_{1/2} = vida media de fase terminal; Tmax = tiempo para concentración en plasma máxima observada; NA = no aplicable

- 5

a:

N = 4: AUC(I) , 04, y CL; t_{1/2} no fueron determinables para un paciente
- b:

N = 2: AUC(I) , 04, y CL; t_{1/2} no fueron determinables para un paciente
- c:

N = 6: AUC(I) , 04, y CL; t_{1/2} no fueron determinables para un paciente
- d:

Los datos desde un paciente no fueron incluidos en las estadísticas descriptivas, el paciente recibió una infusión < 1 hora y dosis < 3.63 mg/m²
- 10

e:

N = 5: AUC(I) , t_{1/2}, y CL; t_{1/2} no fueron determinables para un paciente

Se recolectaron muestras de sangre a 2, 3, 4, 6, y 8 horas después de iniciación de infusión desde pacientes infundidos (2 hrs) con niveles de dosificación del compuesto de la Fórmula II en cantidades iguales a 0.33 mg/m^2 ; 0.66 mg/m^2 ; y 1.85 mg/m^2 . Las muestras fueron recolectadas en tubos conteniendo heparina y enviadas a un laboratorio central para evaluación. Sangre entera de cada muestra fue diluida 1:5 en medio RPMI completo y se agregaron alícuotas de 200 microlitros a pozos de una placa de 96 pozos. Las muestras desde cada punto de tiempo fueron o estimuladas con PHA (0.01 mg/ml de concentración final), o no estimuladas. Las placas de pozos de muestras fueron incubadas durante 48 horas a 37°C bajo 5% CO_2 y se agregó BrdU (10 micromolar) a cada pozo. Las placas fueron incubadas durante 24 horas más. Las muestras fueron teñidas con anticuerpo anti- CD45 FITC conjugado. Los RBC's (eritrocitos) fueron sometidos a lisis y las células restantes fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con DNasa. Luego las muestras fueron incubadas con un anticuerpo anti- BrdU. Las células lavadas fueron re- suspendidas y las poblaciones CD45 y BrdU positivas y negativas fueron detectadas por FACS. Las Figuras 10, 12A, y 12B muestran el porcentaje de incorporación BrdU para muestras tomadas para varias dosis.

Con referencia a la Figura 10, no se observó inhibición de incorporación BrdU a una dosis de 0.33 mg/m^2 , sino a una dosis de 0.66 mg/m^2 , la inhibición de incorporación BrdU es observada hasta ocho horas después de la infusión. La inhibición de incorporación BrdU es observada a dos horas después de infusión a una dosis de 1.85 mg/m^2 . Estos datos indican que el compuesto de la Fórmula II interactúa con rutas mecánicas celulares en una forma probablemente para alterar las células tumorales.

Con referencia a la Figura 12A, se observó inhibición leve de Incorporación BrdU dos horas después de la infusión a una dosis de 1.85 mg/m^2 . En contraste, como se muestra en las Figuras 12A y 12B, se observó inhibición de incorporación BrdU hasta 3 horas después de infusión a una dosis de 3.7 mg/m^2 y 7.4 mg/m^2 y hasta ocho horas después de infusión a una dosis de 29.6 mg/m^2 , 41.4 mg/m^2 , 50 mg/m^2 , y 58 mg/m^2 . El efecto del compuesto de la Fórmula II sobre la inhibición de incorporación BrdU observado a una dosis de 1.85 mg/m^2 (ver Figura 12A) en comparación con aquel observado en la Figura 10 se puede atribuir a variabilidad entre sujetos.

Con referencia a la Figura 13 y la Tabla IXI, el porcentaje de inhibición de incorporación

BrdU a 8 horas después de la infusión generalmente aumentó en el rango entre 1.85 y 58 mg/m². En realidad, el porcentaje de inhibición de incorporación BrdU ya aumentó más del 75% a una dosis de 7.4 mg/m². Estos datos reflejan que la inhibición de proliferación de linfocitos como se midió mediante incorporación BrdU se relaciona con el nivel de dosificación del compuesto de la

5 Fórmula II a la cual se expuso la muestra de sangre.

TABLA IX

Paciente	Dosis (mg/M2)	% BrdU Incorporado antes de la Dosis	% BrdU incorporado 8 hrs pos- infusión	% Inhibición de incorporación de BrdU 8 horas pos- infusión
A	1.85	28	65	- 133
B	3.7	10	13	- 25
C	7.4	51	11	79
D	29.6	29	3	92
E	41.4	27	2*	97*
F	50	33	1	98
G	58	23	0.7	98
H	41.4	41	45	- 10
* Valores 14 hr pos infusion				

10

Pacientes con una diagnosis de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) , cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer vulvar, pseudomixoma peritoneal, cáncer peritoneal, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos suaves, cáncer gástrico, tumor estromal gastrointestinal (GIST) , cáncer esofágico, carcinoma adenoide cístico, tumor neuroendocrino o carcinoma hepatocelular han sido administrados con varias dosificaciones del compuesto de la Fórmula II mediante infusión por vía intravenosa de 2 horas sobre un ciclo de dosificación de 28 días. Cada ciclo de dosificación de 28 días comprendiendo administración de una vez por semana durante tres semanas con una semana de descanso. Se han observado respuestas no completas o parciales mediante criterios

15

RECIST en la población(ver, *ej.*, Therasse, *J Natl Cancer Inst*, 92(3) :205- 216 (2000)) . Sin embargo, un paciente diagnosticado con NSCLC tiene enfermedad estable después de tratamiento de 6 ciclos de 28 días a 0.66 mg/m² y un paciente diagnosticado con pseudomixoma peritoneal tiene marcadores tumorales descendentes, como se muestra en Figura 1- 1, después de tratamiento de 6 ciclos de 28 día a 2.59 mg/m², y continuó en tratamiento para un total de 9 ciclos Por claridad, el marcador tumoral indicado como "CA" es CA125. Adicionalmente, un paciente con cáncer de próstata recibió un régimen de dosificación de 4 ciclos de 28- días con dosificación a 3.63 mg/m². Un paciente con melanoma fue tratado a 3.63 mg/m² durante 9 ciclos hasta progresión patológica. Un paciente con sarcoma de tejidos suaves recibiendo 6 ciclos a 7.11 mg/m² continúa para tener enfermedad estable igual que un paciente con GIST recibiendo 5 ciclos a 7.11 mg/m². Un paciente con cáncer esofágico recibiendo 5 ciclos a 7.11 mg/m² tiene enfermedad estable. Un paciente con carcinoma adenoide cístico recibió 5 ciclos a 7.11mg/m² hasta progresión patológica.

Igualmente, pacientes con una diagnosis de un carcinoide, cáncer tímico, leiomiomasarcoma, NSCLC, cáncer colorectal, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) , adenocarcinoma de melanoma primario desconocido, cáncer ovárico, linfoma no Hodgkin, tumor neuroendocrino, cáncer testicular, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de tiroides, liposarcoma, colangiocarcinoma, pseudomixoma peritoneal, cordoma, o carcinoma sarcomatoide fueron administrados con varias dosificaciones del compuesto de la Fórmula II mediante infusión por vía intravenosa de 2 horas sobre un ciclo de dosificación de 21 días. Pacientes con una diagnosis de liposarcoma, cáncer colorectal, tumor neuroendocrino, NSCLC, y cáncer esofágico fueron administrados con varias dosificaciones del compuesto de la Fórmula II mediante infusión por vía intravenosa de 8 horas sobre un ciclo de dosificación de 21 días. Cada ciclo de dosificación de 21 días comprendiendo administración de la dosis el Día 1 de un periodo de 21 días. Aunque no se observaron respuestas completas o parciales mediante criterios RECIST en la población, la enfermedad estable fue lograda en algunos de los tipos tumorales antes mencionados después de 4 o más ciclos de dosificación de 21- días. Específicamente, dos pacientes carcinoides lograron un estado patológico estable durante 4 ciclos a una dosis de 29.6 mg/m² y 41.4 mg/m². De manera similar, un paciente con cáncer tímico logró un estado patológico estable durante 4 ciclos a una dosis de 50 mg/m². Un paciente con cáncer anal logró enfermedad estable durante 6 ciclos a una dosis de

50 mg/m². Adicionalmente, un paciente con leiomiosarcoma logró un estado patológico estable durante 8 ciclos a una dosis de 41.4 mg/m². Un paciente con NSCLC logró un estado patológico estable durante 12 ciclos a una dosis de 50 mg/m². Un paciente con cordoma logró enfermedad estable durante 8 ciclos a una dosis de 58 mg/m² y un paciente con cáncer de próstata logró enfermedad estable durante 7 ciclos a una dosis de 50 mg/m².

TABLA X

Esquema de 4 semanas			
Tumor	Dosis mg/m ²	Ciclo no.	Estado
NSCLC	0.66	6	fuera del estudio con enfermedad estable
pseudomixoma	2.59	9	fuera del estudio con enfermedad estable
próstata	3.63	4	progresión patológica
melanoma	3.63	9	progresión patológica
sarcoma de tejidos suaves	7.11	6	en tratamiento
GIST	7.11	5	en tratamiento
esofágico	7.11	5	en tratamiento
adenoide cístico	7.11	5	progresión patológica

TABLA XI

Esquema de 21 días			
Tumor	Dosis mg/m ²	Ciclo no.	Estado
Carcinoide	29.6	4	progresión patológica
Carcinoide	41.4	4	progresión patológica
leiomiosarcoma	41.4	8	progresión patológica
tímico	50	4	progresión patológica
NSCLC	50	12	en tratamiento

98

cordoma	58	8	en tratamiento
cáncer anal	50	6	progresión patológica
próstata	50	7	En tratamiento

La anterior descripción del invento pretende ser ilustrativa y no limitante. Varios cambios o modificaciones en las realizaciones descritas en la presente pueden ocurrir por aquellos con experiencia en el estado de la técnica. Estos cambios pueden realizarse sin apartarse del alcance o espíritu del invento.

5

REIVINDICACIONES:

1. Una formulación infundible por vía intravenosa que comprende el compuesto de la Fórmula II en una solución amortiguada con un pH entre pH 3.4 y pH 5, la formulación proporcionando al menos una conducta PK y/o AUC según aquella mostrada en cualquiera de las Figuras 2A, 2B, o 2C cuando se administra en un humano en al menos uno de los niveles de dosificación indicados.
2. La formulación de reivindicación 1 la cual proporciona las curvas AUC/dosis ilustradas en Figura 3 al infundirse en una infusión de dos horas en una cantidad proporcionando al menos un nivel de dosificación mostrado.
3. La formulación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la solución amortiguada es una solución amortiguada acuosa comprendiendo un ácido y su sal de sodio conjugada en donde el ácido es ácido cítrico o ácido láctico.
4. La formulación de la reivindicación 1 en donde la solución amortiguada comprende ácido cítrico y citrato de sodio.
5. La formulación de la reivindicación 4 en donde la proporción de ácido cítrico:citrato de sodio en la solución amortiguada es 1 mol de citrato de sodio a 2.4 moles de ácido cítrico aproximadamente.
6. La formulación de la reivindicación 5 en donde la solución adicionalmente comprende un diluyente de solución de cloruro de sodio.
7. Un método de tratar una condición de tumor tratable mediante la administración del compuesto de la Fórmula II comprendiendo infundir una solución comprendiendo el compuesto de la Fórmula II en un paciente en necesidad de tratamiento durante un periodo entre 1 hora y 24 horas en cada de los días 1, 8, y 15 de un ciclo de 28 días, en una cantidad efectiva para tratar la condición tumoral.

8. El método de la reivindicación 7 en donde el ciclo es repetido hasta observar inhibición tumoral o remisión completa.

5 9. El método de la reivindicación 7 o 8 en donde la cantidad de la solución infundida proporciona un nivel de plasma de al menos aproximadamente 10 ng/mL.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en donde la solución administrada comprende la solución de la reivindicación 5.

10

11. Un proceso para preparar un concentrado comprendiendo preparar una solución amortiguada de un ácido orgánico y su sal conjugada, disolviendo el compuesto de la Fórmula II en la solución amortiguada y ajustando el pH de la solución resultante a un pH entre pH 3 y pH 5.1.

15

12. El proceso de la reivindicación 11 el cual además incluye el paso de mezclar el concentrado con el contenido de una bolsa de solución salina estándar para uso intravenoso, proporcionando así una formulación infundible.

20

13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 en donde el ácido orgánico es ácido cítrico y la sal conjugada es citrato de sodio.

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en donde la proporción de ácido orgánico, sal conjugada y el compuesto de la Fórmula II es 1 mol del compuesto de la Fórmula II : 3.66 moles sal conjugada: 8.8 moles ácido orgánico.

25

15. El proceso de la reivindicación 11 en donde el compuesto de la Fórmula II está presente en el concentrado al nivel de 5 mg/mL.

30

16. Una formulación que comprende un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II el cual proporciona el perfil PK mostrado en Figura 2 A ante

infusión por vía intravenosa en un humano.

17. Una formulación que comprende un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II la cual proporciona al menos uno de los perfiles PK mostrados en la Tabla V ante infusión por vía intravenosa en un humano en una cantidad proporcionando al menos una de las dosificaciones indicadas.

18. La formulación de la reivindicación 17 que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol : 8.8 moles : 3.7 moles.

19. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol del compuesto de la Fórmula II: 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 1.85 mg/M² con un t_{1/2} de 2.15 horas aproximadamente, un C_{max} de 77 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 181 ng hr/mL aproximadamente.

20. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II: 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 3.7 mg/M² con un t_{1/2} de 2.75 horas aproximadamente, un C_{max} de 136 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 336 ng hr/mL aproximadamente.

21. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II : 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 7.4 mg/M² con un t_{1/2} de 2.86 horas aproximadamente, un C_{max} de 353 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 994 ng hr/mL aproximadamente.

22. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II : ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II : 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 14.8 mg/M² con un t_{1/2} de 2.78 horas aproximadamente, un C_{max} de 396 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 1053 ng hr/mL aproximadamente.

23. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II: 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 29.6 mg/M² con un t_{1/2} de 2.79 horas aproximadamente, un C_{max} de 1020 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 2531 ng hr/mL aproximadamente.

24. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II: 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 41.4 mg/M² con un t_{1/2} en el rango entre 2 y 2.8 horas aproximadamente, un C_{max} en el rango entre 1020 ng/ml y 1343 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC en el rango entre 2531 ng hr/mL y 3041 ng hr/mL aproximadamente.

25. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II: 8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 50 mg/M² con un t-_{1/2} de 1.5 horas aproximadamente, un C_{max} de 1820 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 3290 ng hr/mL aproximadamente.

26. Una formulación que comprende una relación molar del compuesto de la Fórmula II: ácido orgánico : sal conjugada de 1 mol aproximadamente del compuesto de la Fórmula II:

8.8 moles aproximadamente de ácido orgánico: 3.7 moles aproximadamente de sal conjugada, en donde, la formulación proporciona un PK para una infusión de dos horas de una dosis comprendiendo 58 mg/M^2 con un $t_{1/2}$ de 1 horas aproximadamente, un C_{max} de 1460 ng/ml aproximadamente, y/o un AUC de 3290 ng hr/mL aproximadamente.

5

27. Una formulación que comprende el compuesto de la Fórmula II exhibiendo los valores PK y valor C_{max} mostrados en la Tabla V cuando se administra mediante una infusión por vía intravenosa en una cantidad proporcionando la dosis correspondiente indicada en la Tabla V.

10

28. Una formulación que comprende el compuesto de la Fórmula II exhibiendo los valores PK y valor C_{max} mostrado en Tabla VI cuando se administra mediante una infusión por vía intravenosa en una cantidad proporcionando la dosis correspondiente indicada en Tabla VI.

15

29. Un método de tratar una condición de tumor tratable mediante la administración del compuesto de la Fórmula II comprendiendo infundir una solución comprendiendo el compuesto de la Fórmula II en un paciente en necesidad de tratamiento durante un periodo entre 1 hora y 24 horas en donde el compuesto se administra el Día 1 seguido por 20 días de descanso (ciclo de 21 días), en una cantidad efectiva para tratar la condición tumoral.

20

30. El método de la reivindicación 29 en donde el ciclo es repetido hasta observar inhibición tumoral o remisión completa.

25

31. El método de la reivindicación 29 o 30 en donde la cantidad de la solución infundidos proporciona un nivel de plasma de al menos aproximadamente 10 ng/mL.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31 en donde la solución administrada comprende la solución de la reivindicación 5.

30

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y 29 a 32 en donde la cantidad de solución infundida proporciona hasta 58 mg/m^2 aproximadamente del compuesto de la Fórmula II.

104

34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y 29 a 32 en donde la cantidad de solución infundida proporciona 50 mg/m² aproximadamente del compuesto de la Fórmula II.

5

35. El método de la reivindicación 29 en donde el tumor es seleccionado a partir del grupo que consta de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) , cáncer de mama, cáncer ovárico, leucemias agudas [ej., leucemia mielogena aguda (AML) o leucemia linfocítica aguda (ALL)], leucemias crónicas (ej., CLL) , linfoma no Hodgkin (ej., MCL) , melanoma, y mieloma múltiple.

10

36. El método de la reivindicación 29 en donde el periodo de tiempo para la infusión es seleccionado a partir del grupo que consta 2 horas, 8 horas y 24 horas.

37. El método de la reivindicación 29, en donde la cantidad de compuesto de la Fórmula II administrado está entre 0.33 mg/m² y 20 mg/m² aproximadamente, entre 0.33 mg/m² y 14 mg/m² aproximadamente o entre 7 mg/m² y 12 mg/m² aproximadamente.

15

38. Un método de tratar una condición de tumor tratable mediante la administración del compuesto de la Fórmula II comprendiendo infundir una solución comprendiendo el compuesto de la Fórmula II en un paciente en necesidad de tratamiento durante un periodo entre 1 hora y 24 horas en donde el compuesto se administra sobre cada uno de los días 1, 8, y 15 de un ciclo de 28 días, en una cantidad efectiva para tratar la condición tumoral.

20

39. El método de la reivindicación 29 en donde el tumor es seleccionado a partir del grupo que consta de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) , cáncer de mama, cáncer ovárico, leucemias agudas [ej., leucemia mielogena aguda (AML) o leucemia linfocítica aguda (ALL)], leucemias crónicas (ej., CLL) , linfoma no Hodgkin (ej., MCL) , melanoma, y mieloma múltiple.

25

40. El método de la reivindicación 38 en donde el periodo de tiempo para la infusión es seleccionado a partir del grupo que consta 2 horas, 8 horas y 24 horas.

30

105

41. El método de la reivindicación 40 en donde el periodo de tiempo para la infusión es 8 horas.

5 42. El método de la reivindicación 41, en donde la cantidad de compuesto de la Fórmula II administrado está entre 1.85 mg/m^2 y 70 mg/m^2 aproximadamente o entre 15 mg/m^2 y 30 mg/m^2 aproximadamente.

10 43. El método de la reivindicación 40 en donde el periodo de tiempo para la infusión es 24 horas.

44. El método de la reivindicación 43, en donde la cantidad de compuesto de la Fórmula II administrado está entre 1.85 mg/m^2 y 100 mg/m^2 aproximadamente, entre 50 mg/m^2 y 80 mg/m^2 aproximadamente o entre 30 mg/m^2 y 70.0 mg/m^2 aproximadamente.

15 45. El método de la reivindicación 38, en donde tumores sólidos son tratados.

46. El método de la reivindicación 45, en donde los tumores sólidos son seleccionados a partir del grupo que consta de cáncer de mama, melanoma y cáncer ovárico.

20 47. El método de la reivindicación 45, en donde la cantidad de solución infundida proporciona entre 1.8 mg/m^2 y 58 mg/m^2 .

48. El método de la reivindicación 45 o reivindicación 46 que además comprende la administración de factores de crecimiento.

25

49. El método de la reivindicación 48 en donde los factores de crecimiento son seleccionados a partir del grupo que consta de GCSF y GMCSF.

30 50. El método de la reivindicación 48 o reivindicación 49 en donde la cantidad de solución infundida proporciona entre 0.33 mg/m^2 y 100 mg/m^2 aproximadamente en un esquema de 21 días.

106

51. Una formulación que comprende un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II el cual proporciona el perfil RK mostrado en la Figura 2B ante infusión por vía intravenosa a un humano.

5

52. Una formulación que comprende un ácido orgánico acuoso, su sal conjugada, y el compuesto de la Fórmula II la cual proporciona el perfil PK mostrado en Figura 2C ante infusión por vía intravenosa a un humano.

107

1/13

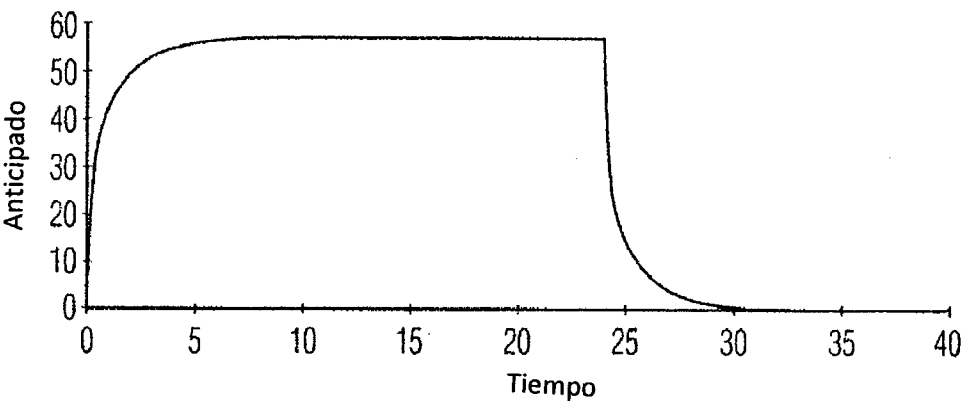


FIG. 1

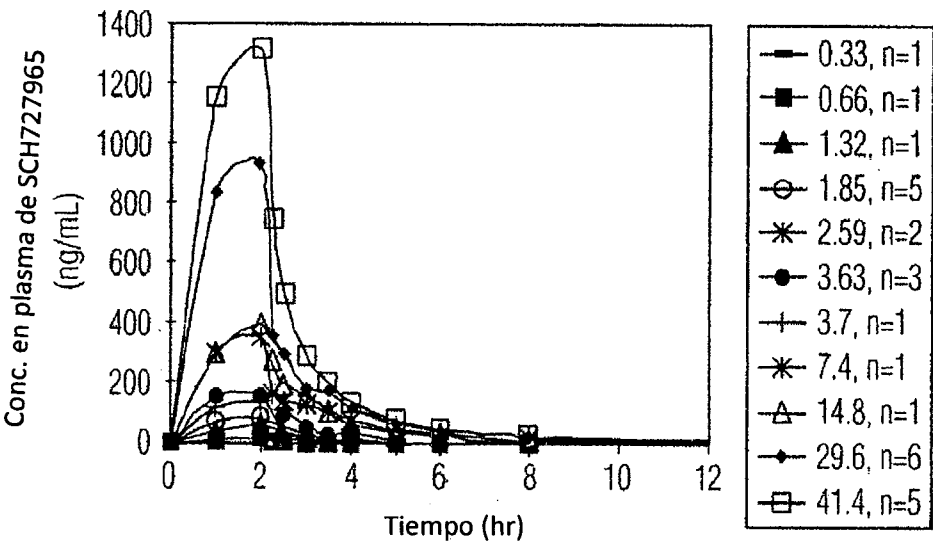


FIG. 2A

108

2/13

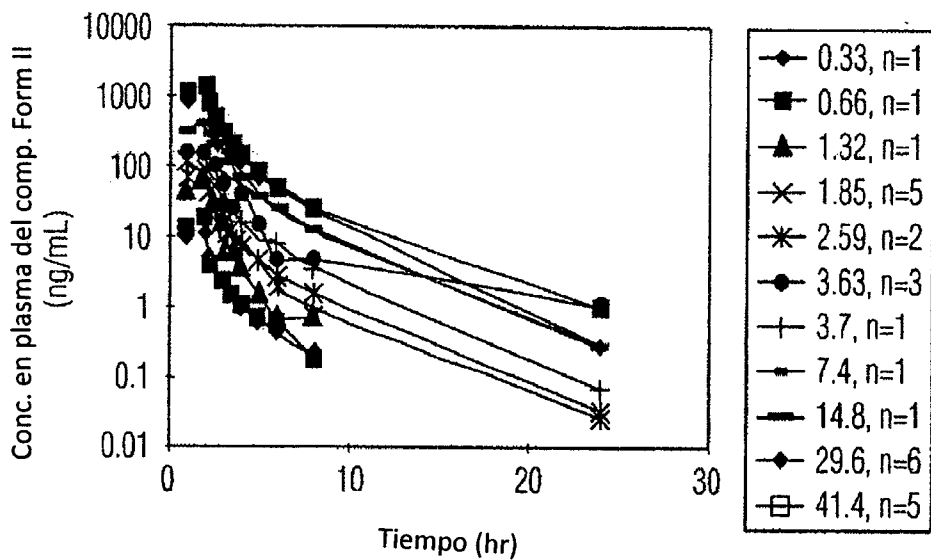


FIG. 2B

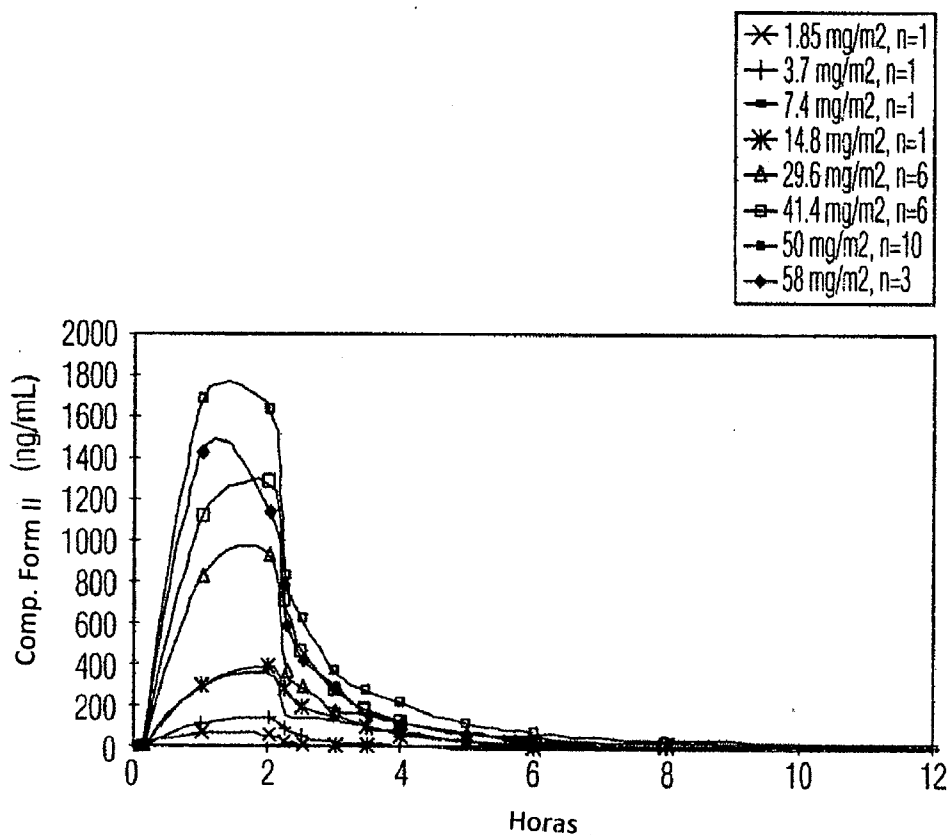


FIG. 2C

109

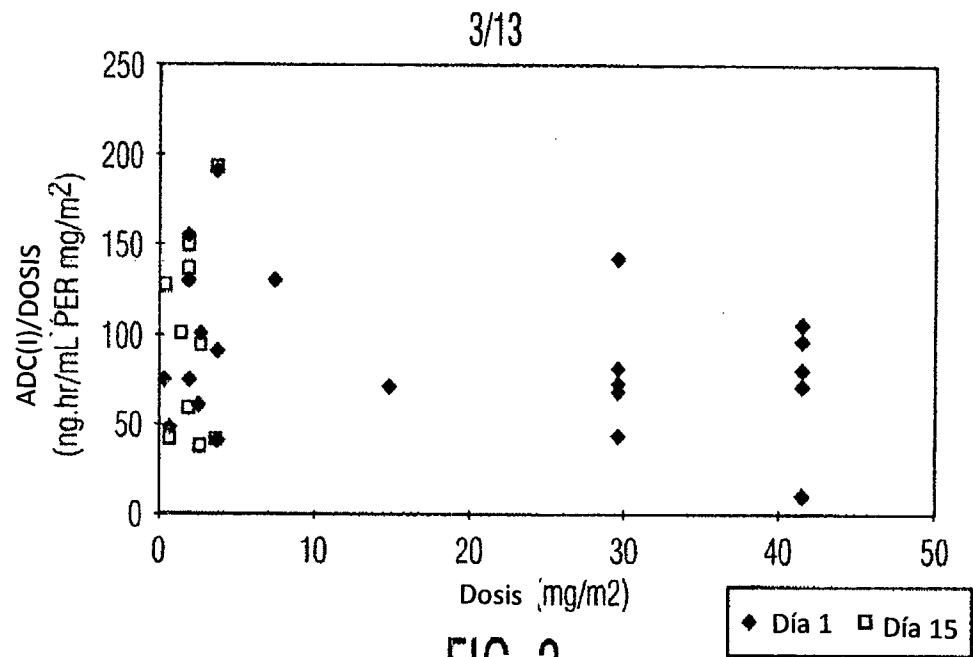


FIG. 3

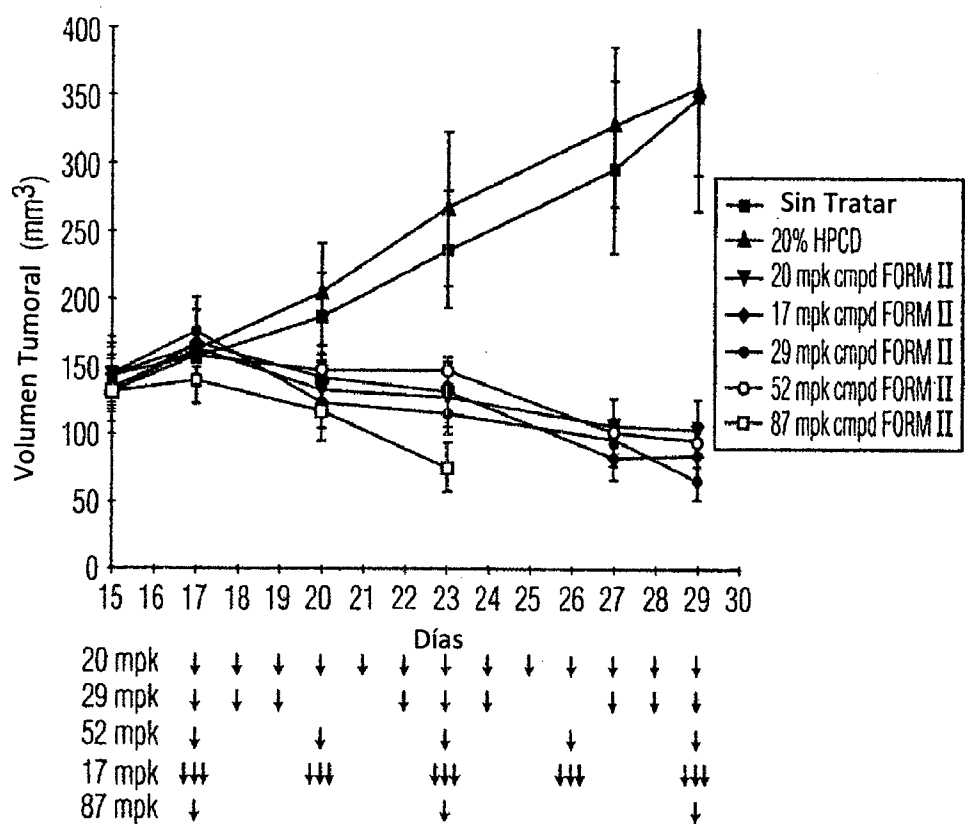


FIG. 4

120

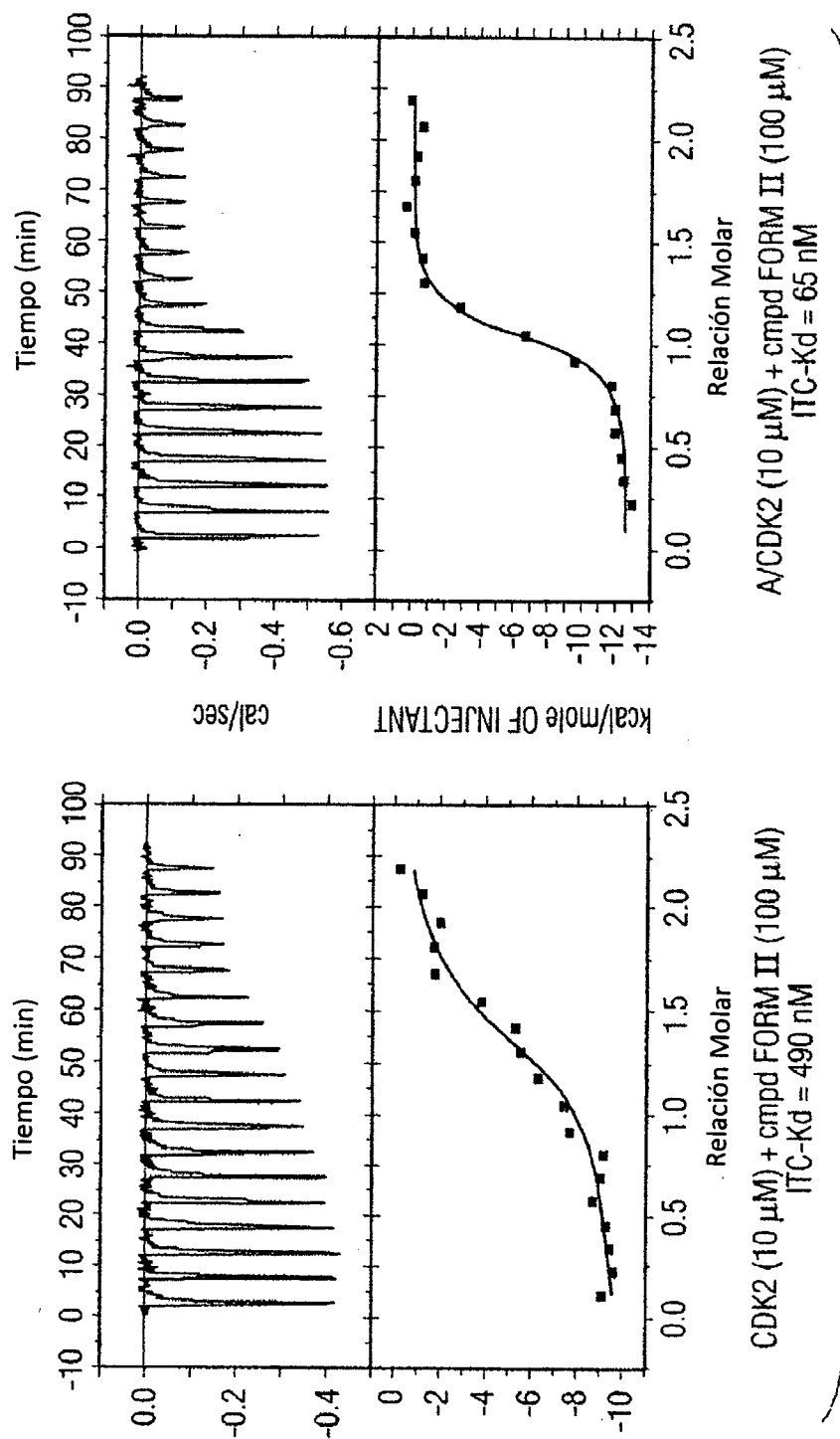


FIG. 5

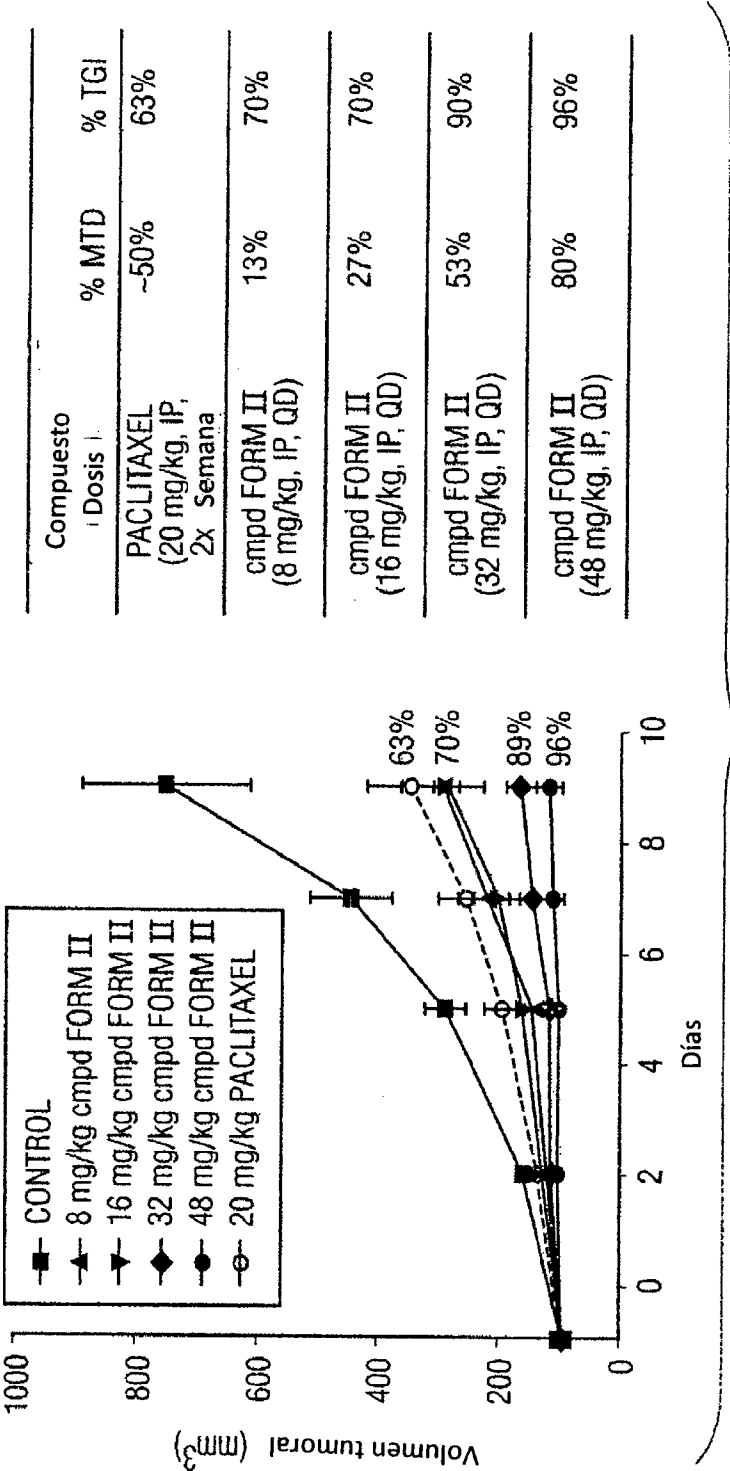
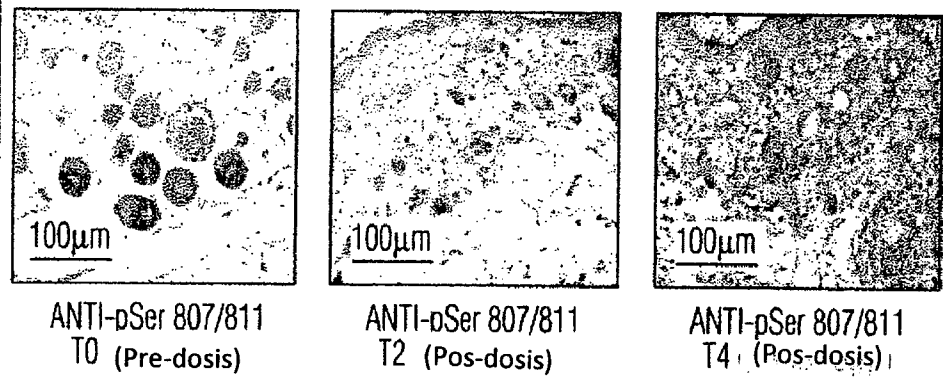


FIG. 6

112



Modulación de los Biomarcadores Farmacodinámicos Basados en Mecanismos (fosfo-Rb; Biopsias de Piel de Ratones Desnudos)

FIG. 7

113

7/13

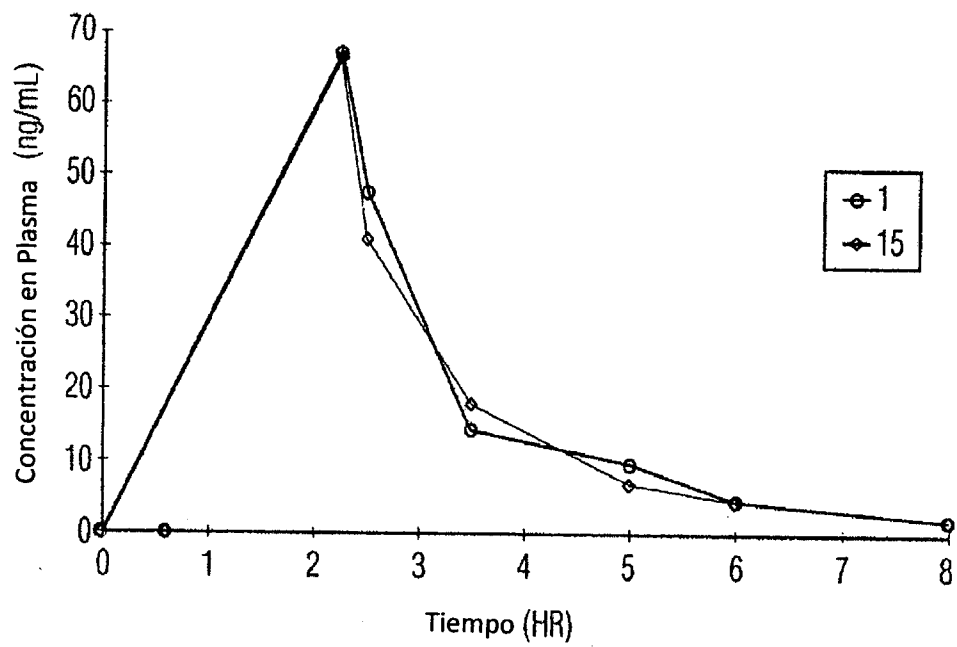


FIG. 8

174

8/13

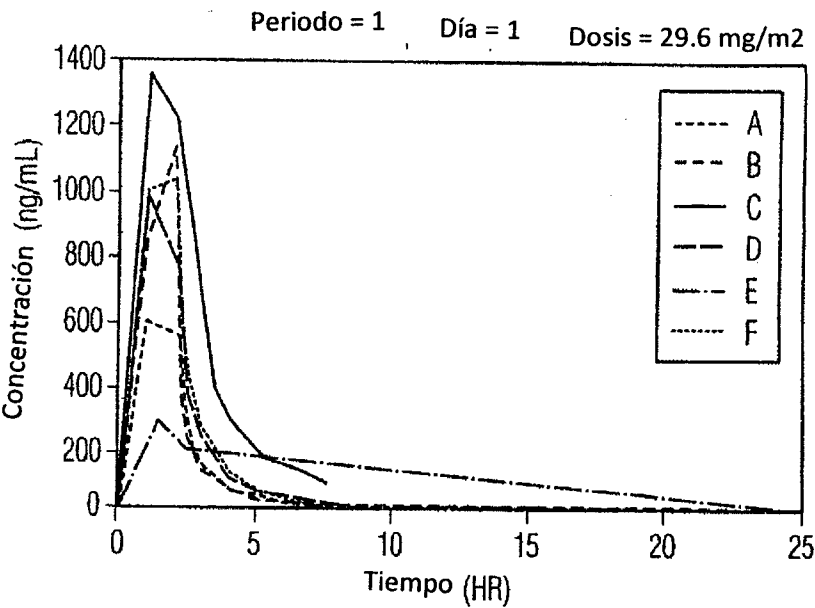


FIG. 9A

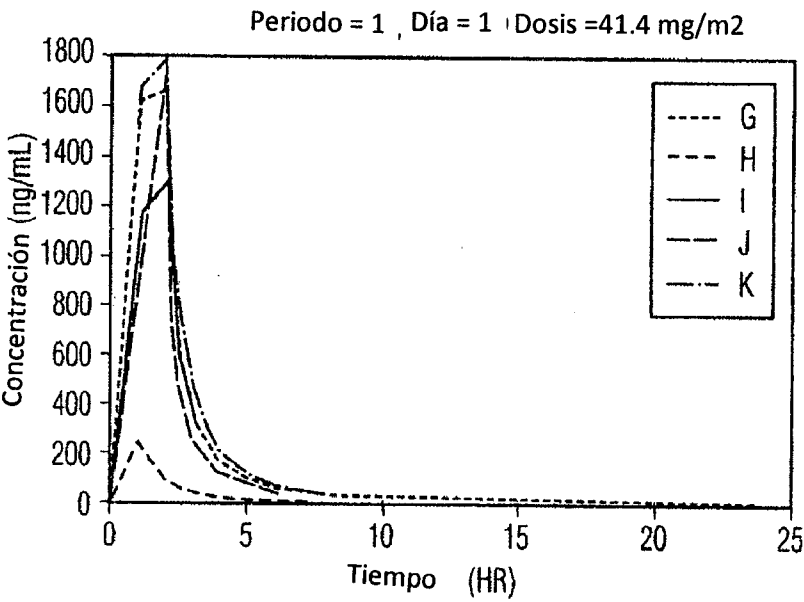


FIG. 9B

115

9/13

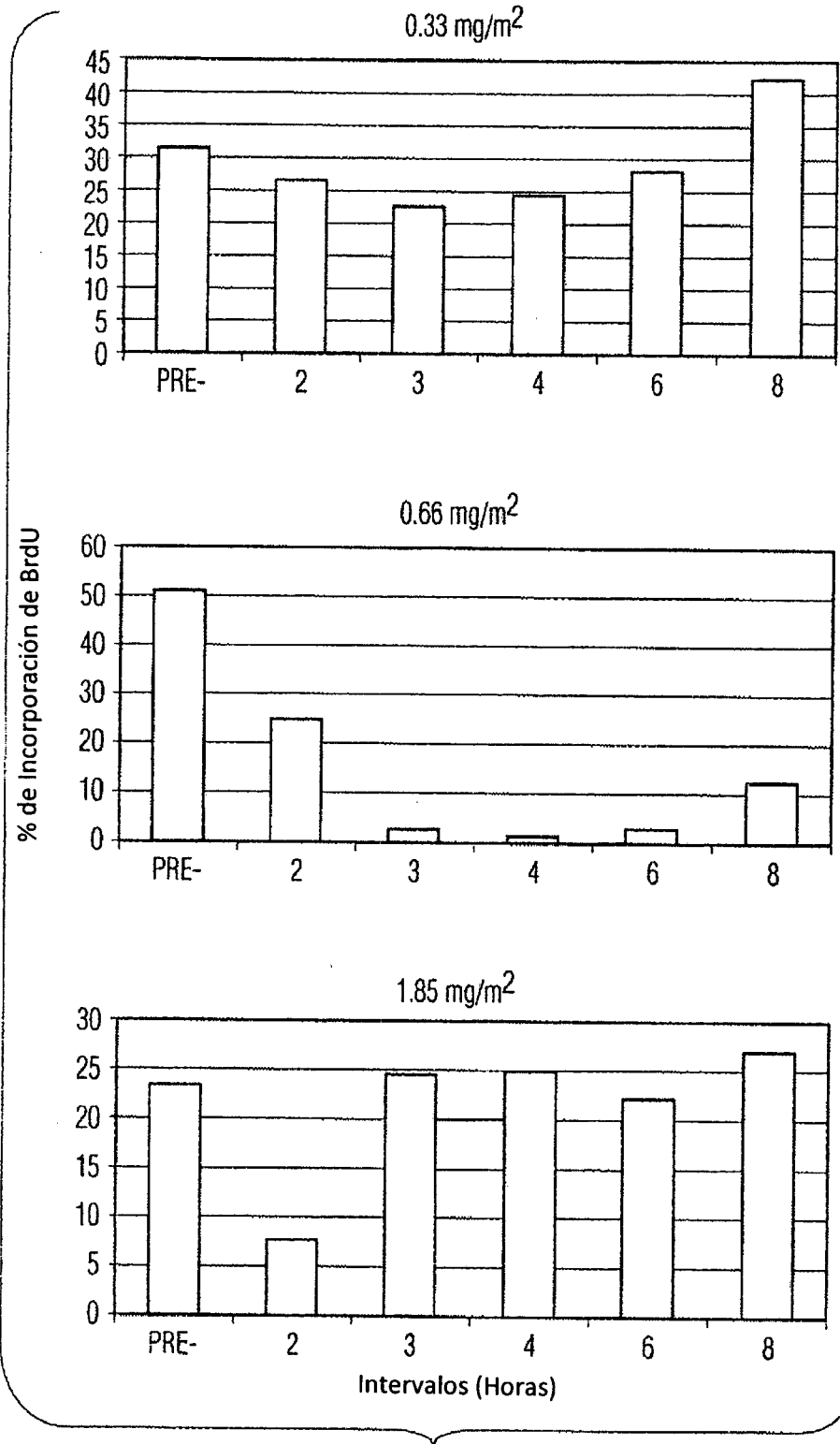


FIG. 10

176

10/13

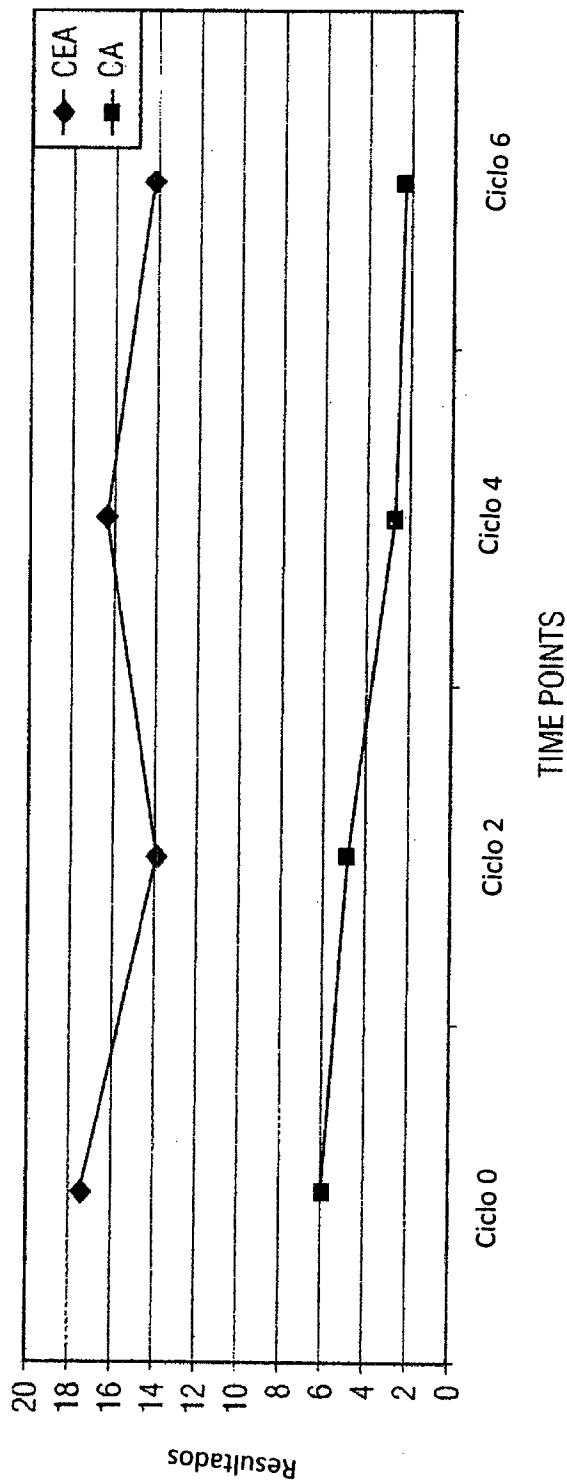


FIG. 11

117

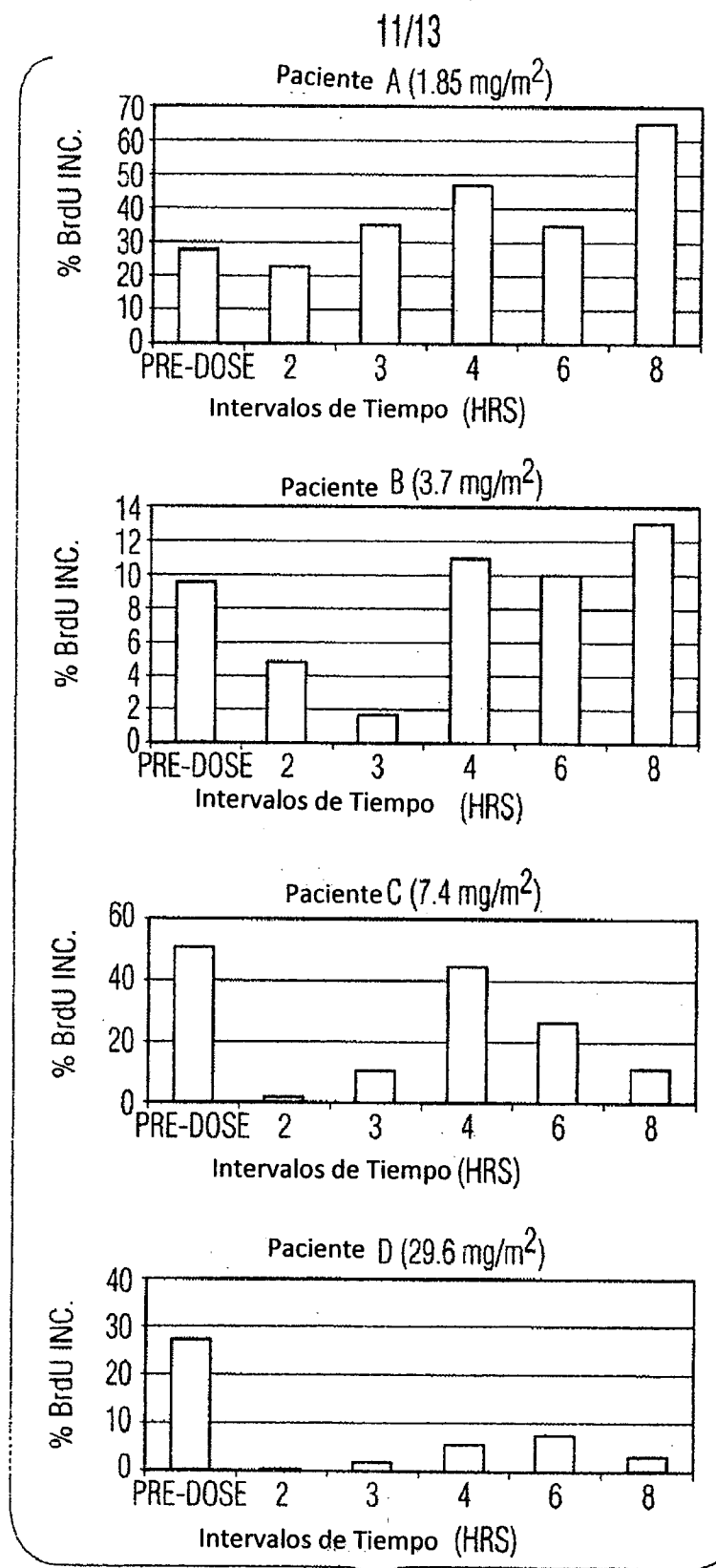


FIG. 12A

118

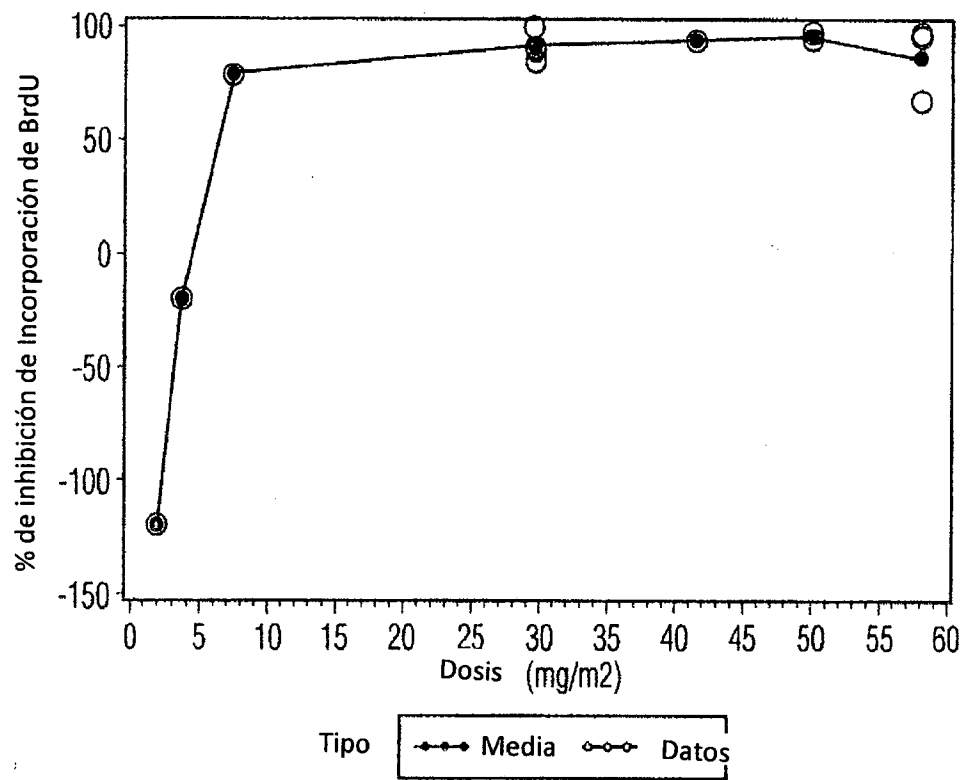


FIG. 13

119

12/13

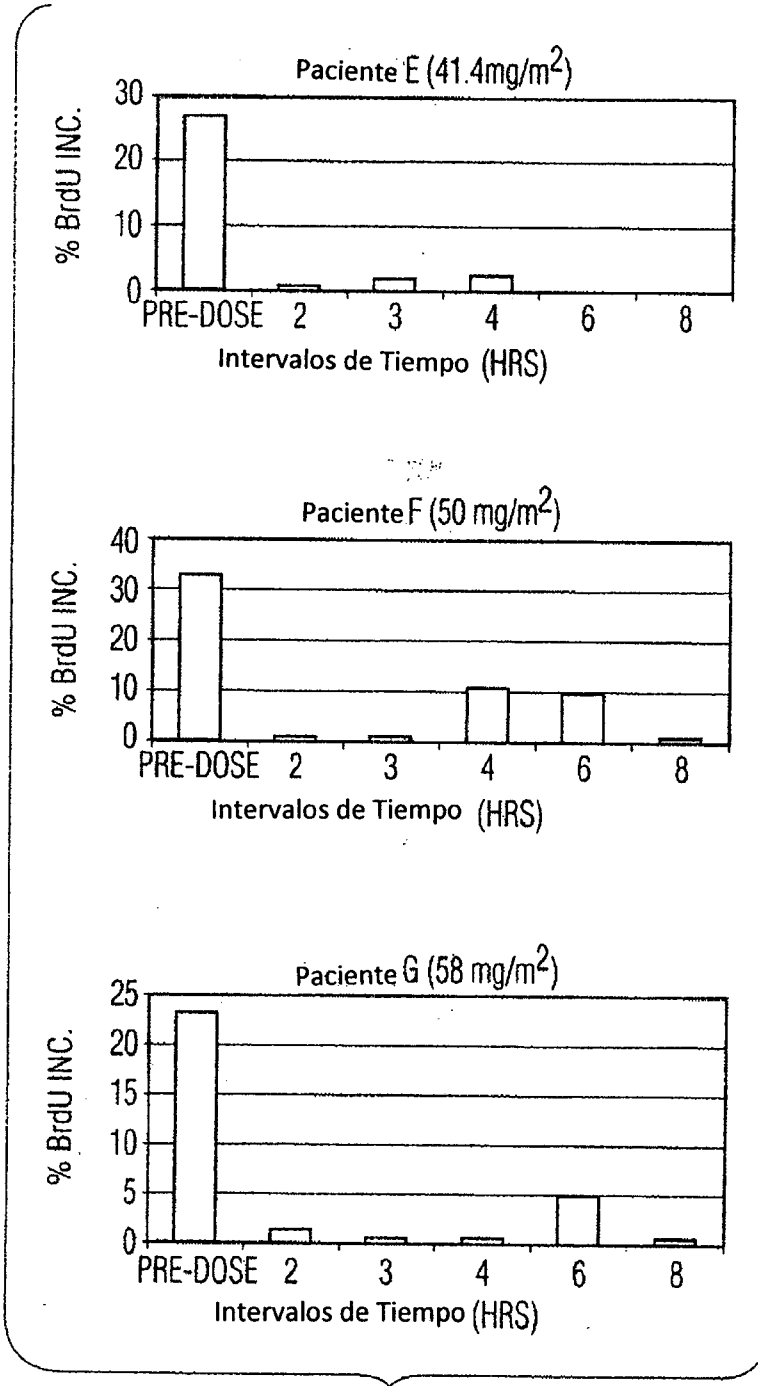


FIG. 12B

- (51) International Patent Classification:
A61K 9/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2008/010778
- (22) International Filing Date:
16 September 2008 (16.09.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/994,185 17 September 2007 (17.09.2007) US
60/999,469 17 October 2007 (17.10.2007) US
61/053,784 16 May 2008 (16.05.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
SCHERING CORPORATION [US/US]; 2000 Gallop-
ing Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): ANTOCHSHUK,
Valentyn [UA/US]; 207 Rankin Avenue, Cranford, New
Jersey 07016 (US). BANNERJI, Rajat [US/US]; 185
Lake Road, Morristown, New Jersey 07960 (US). DAB-
BARA, Anita [US/US]; 23 East Kincaid Court, Princeton
Junction, New Jersey 08550 (US). KIRSCHMEIER,
Paul [US/US]; 106 Culberson Road, Basking Ridge, New
Jersey 07920 (US). PARRY, David, A. [GB/US]; 1759
Begen Avenue, Mountain View, California 94040 (US).
SHAMEEM, Mohammed [US/US]; 4 Surim Court,
Nanuet, New York 10954 (US). STATKEVICH, Paul
[US/US]; 16 Barbieri Court, Raritan, New Jersey 08869
(US). YAO, Siu-Long [US/US]; 14 Marian Drive, West
Windsor, New Jersey 08550 (US).
- (74) Agent: GRUPPI, Carol, M.; Schering Corporation, 2000
Galloping Hill Road, Patent Dept. K-6-1 1990, Kenil-
worth, New Jersey 07033 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of
the earlier application (Rule 4.17(iii))
- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

[Continued on next page]

(54) Title: FORMULATION CONTAINING CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITING COMPOUND AND METHOD OF TREATING TUMORS USING THE SAME

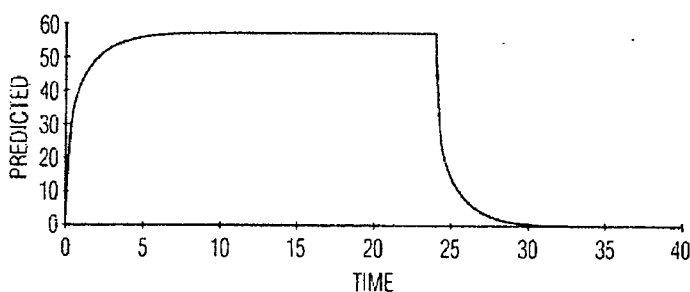


FIG. 1

(57) Abstract: This application discloses a novel formulation containing a 3-amino-4-substituted pyrazole derivative which has cyclin-dependent kinase inhibiting properties, and a method of treating tumors using the novel formulation.

WO 2009/038701 A3



21

(88) Date of publication of the international search report:
11 September 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/010778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K9/08 A61K31/519 A61P35/00
ADD. A61K47/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/209878 A1 (GUZI TIMOTHY J [US] ET AL) 21 October 2004 (2004-10-21) cited in the application paragraph [0009] - paragraph [0031] paragraph [0101] - paragraph [0107] paragraph [0112] paragraph [0116] - paragraph [0117] paragraph [0122] - paragraph [0133] example 1000 claims 1,32,33,37,46	1-6, 11-28, 51,52
P, X	US 2008/050384 A1 (GUZI TIMOTHY J [US] ET AL) 28 February 2008 (2008-02-28) paragraph [0002] - paragraph [0026] paragraph [0095] - paragraph [0109] paragraph [0125] - paragraph [0139] claims 1,2,5,9,11,17,18,22-39 ----- -/--	27,28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 April 2009

Date of mailing of the international search report

30/07/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marchand, Petra

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/010778

123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2008/130570 A (SCHERING CORP [US]; PHARMACOEPIA INC [US]; GUZI TIMOTHY J [US]; PARUCH) 30 October 2008 (2008-10-30) page 1, line 1 - page 7, line 25 page 41, line 14 - page 43, line 6 page 44, line 21 - line 29 page 48, line 7 - page 50, line 5 claims 1-39 -----	27, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/010778

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6, 11-28, 51, 52

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6,11-28,51,52

Formulations comprising the compound of formula II in buffered solution having a pH from 3.4 to 5. A process for making concentrates comprising preparing a buffered solution of an organic acid and its conjugate salt, dissolving the compound of formula II in the buffered solution and adjusting the pH of the resulting solution to a pH of from pH 3 to pH 5.1. Formulations comprising the compound of formula II, an aqueous organic acid and its conjugate salt.

2. claims: 7-10,29-50

Methods of treating a tumor condition treatable by the administration of the compound of formula II comprising infusing a solution comprising the compound of formula II into a patient in need of treatment over a period of from 1 hour to about 24 hours either a) on each of days 1, 8, and 15 of a 28 day cycle, or b) on day 1 followed by 20 days off (21 day cycle), in an amount effective to treat the tumor condition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/010778

26

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2004209878	A1	21-10-2004	US	2007054906 A1	08-03-2007
			US	7161003 B1	09-01-2007
US 2008050384	A1	28-02-2008	WO	2008130570 A1	30-10-2008
WO 2008130570	A	30-10-2008	US	2008050384 A1	28-02-2008



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-035469- -00000-0000

Fecha: 2010-03-25 17:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 126

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	10 35469
	Solicitud internacional	PCT/US2008/010778
	Fecha inicio fase nacional	17/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

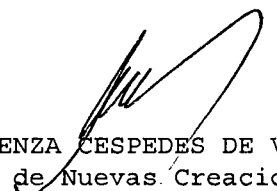
05254

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 23 ABR. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

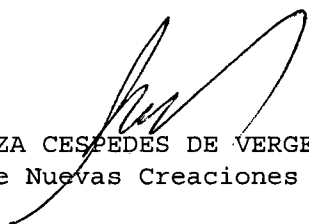
REFERENCIA	Radicación No.	10 35469
	Solicitud internacional	PCT/US2008/010778
	Fecha inicio fase nacional	17/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

NO 05255

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall **23 ABR. 2010**