

101

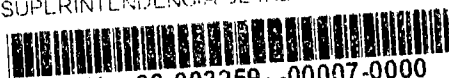
Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACION

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003259- -00007-0000

Fecha: 2008-02-22 16:48:01 Dep. 2020 NULCRACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Lve. 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTARLOQUE Folios 19

Re: P1.-PHARMACIA ITALIA S.p.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "TERAPIA COMBINADA CONTRA TUMORES QUE COMPRENDE DERIVADOS SUSTITUIDOS DEL ACRILOIL DISTAMICINA Y AGENTES ALQUILANTES".-Clase A61K 45/06.- Expediente número 03-003.259.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista el 12 de Octubre de 2007 y a mi memorial de plazo de 8 de Enero de 2008.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones presentadas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1779** bajo los acápites de claridad de la solicitud y nivel inventivo, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. Claridad

3.1. Descripción. El señor Examinador objeta la claridad de la descripción de la presente solicitud, argumentando que *"en ninguna parte de la misma presenta de manera inequívoca ningún estudio ni Tabla comparativa que permita ver su eficacia y baja toxicidad apoyándose en el efecto sinérgico que acusa tener..."*. Además, el señor Examinador manifiesta *"Dentro de la descripción no hay información que permita concluir que los compuestos reivindicados solucionan el problema técnico planteado"*.

Con respecto a este particular me permito llamar la atención de ese Despacho al hecho que la descripción efectivamente enseña resultados que demuestran de forma contundente la utilidad de la composición materia

de la presente solicitud y el efecto sinérgico que se manifiesta cuando se realiza el uso combinado de los compuestos presentes en dicha composición.

Dichos resultados se encuentran consignados en las Tablas 1, 2 y 3 de la descripción (páginas 11 a 14), en las que se muestra como el derivado de acrilóil distamicina representativo de la invención (PNU 166196) en una dosis de 0.26 mg/Kg/día no muestra toxicidad, pero presenta un incremento muy bajo en la esperanza de vida (ISL% = 33) de los ratones diseminados con células de leucemia L1210. De igual forma, la misma Tabla enseña que al administrar un agente alquilante solo, como es el cisplatino, se requiere una dosis relativamente alta (5,9 mg/Kg/día) para aumentar la esperanza de vida hasta un valor de ISL% = 67. Sin embargo, al realizar un tratamiento que contiene ambos agentes (PNU 166196 y cisplatino) se obtiene muy baja toxicidad y se incrementa significativamente la esperanza de vida de las ratas en estudio llegando a un valor de ISL% = 120.

Me permito resaltar además que la combinación de los dos compuestos (PNU 166196 y cisplatino) no produjo un aumento solamente aditivo en el incremento de la esperanza de vida, si no que dicho aumento fue muy superior. **Esto muestra de manera incontrovertible el efecto sinérgico que presenta la combinación de un derivado de acrilóil distamicina, como el revelado en la presente invención, y un agente alquilante; dicho efecto sinérgico, además, se constituye por sí solo en un resultado inesperado y sorprendente.**

Adicionalmente, me permito resaltar que los agentes alquilantes son ampliamente conocidos como medicamentos antineoplásicos, como claramente lo expresa la descripción (página 3), por lo que **las mencionadas Tablas 1 a 3 de igual forma estarían mostrando la ventaja comparativa que presenta la composición que reclama la presente solicitud, frente a los agentes antineoplásicos conocidos.**

De este modo, el uso conjunto de un derivado de acrilóil distamicina, como los considerados en la presente invención, y un agente alquilante para el tratamiento antineoplásico, muestra un efecto sinérgico y no reporta muertes tóxicas, siendo así una solución para el problema técnico planteado en la solicitud en estudio, que consistía en proveer nuevas composiciones antineoplásicas con alta efectividad y baja toxicidad.

Dicha utilidad y efecto mejorado es igualmente apreciable en la Tabla 2 (páginas 12 y 13 de la descripción), en donde se observa un efecto sinérgico al emplear el mismo compuesto representativo (PNU 166196) mezclado con un agente alquilante como el carboplatin. Dicha combinación aumenta significativamente el ILS% de ratas diseminadas con leucemia murine L1210, de manera superior a la suma de los resultados obtenidos con cada uno de los compuestos por separado.

Por su parte, la Tabla 3 (páginas 12 y 14 de la descripción) consigna el efecto antitumoral sobre el carcinoma de colon humano (HCT-116) implantado subcutáneo en ratas. Los resultados muestran un retraso significativo en el crecimiento tumoral al recibir el tratamiento en el cual se incluye la mezcla del derivado de acrilóil distamicina PNU 166196 y cisplatín, **el cual es mucho mayor al que se obtiene con la administración de cada uno de los componentes por separado**. (Solo PNU 166196 T/C % = 61, solo cisplatín T/C % = 92, PNU 166196+ cisplatín T/C % = 36, $T/C\% = 100 \times (RTV \text{ medio del grupo tratado}) / (RTV \text{ medio del grupo control})$, $RTV = TV_n / TV_0$, TV_n = volumen del tumor en el día n, TV_0 = volumen del tumor en el día 0).

Sumado a todo lo anteriormente expuesto, me permito referirme a los resultados consignados en el documento *Clin. Cancer Res.*, **2003**,9, 5402-5408, de publicación posterior a la presente solicitud, y en donde se muestran estudios de tratamiento en ratas empleando el derivado de acrilóil distamicina PNU 166196 (denominado en el artículo Brostalicina, página 5402) con cisplatín (denominado en el artículo cDDP, página 5402). En la Tabla 1 del mencionado documento (página 5404) se muestra el efecto sinérgico que se obtiene al realizar la administración combinada del PNU 166196 y cisplatín frente a los injertos de carcinoma de colon humano HCT-116 en ratones atímicos con tumores de 0,2 g.

Table 1 Combination effects of brostallicin plus cDDP against HCT-116 human colon carcinoma xenograft (sequential treatment)
Tumors were implanted s.c. in nude mice; when tumors reached 0.2 g, animals were divided into test groups (day 0). Drug was administered v. from day 0.

Treatment schedule ^a	Dose (mg/kg/injection)		T/C (%) ^b	FTV ^c	LCK ^d	T-C (days) ^e	Toxic deaths	Weight loss % (days of nadir) ^f
	cDDP	Brostallicin						
(A)	1	0	99	—	0	0	0/8	<5 (4)
	2	0	88	—	0.3	5	1/16	<5-13 (1)
	4	0	76	—	0.3	5	1/8	26 (1)
	0	0.2	73	—	0.2	3	0/8	8 (4)
	0	0.4	58 ^g	—	0.6	11	0/16	12 (4)
	0	0.8	53	—	1.2	23	2/8	15 (6)
	1	0.2	71	1	0.2	4	0/8	<5 (4)
	1	0.4	48 ^h	1	0.6	11	0/8	6 (4)
	2	0.2	46	1.2	0.8	14	0/8	<5 (4)
	2	0.4	40 ^{g,h,i}	2.6	1.5	27	0/16	12 (4)
	2	0.8	40 ^h	1.5	1.6	31	0/8	13 (6)
	4	0.4	52 ^j	1.1	0.9	18	2/8	22 (4)
	4	0.8	32 ^h	1.4	1.6	31	6/8	30 (4)
(B)	2	0	96	—	0.2	4	0/16	5 (7)
	4	0	78	—	0.4	10	1/16	4-13 (7)
	0	0.4	43	—	0.6	14	0/8	<5 (6)
	0	0.8	31	—	0.4	13	2/8	9 (8)
	2	0.4	61	0.7	0.4	10	0/8	9 (6)
	2	0.8	45	0.9	0.4	12	1/8	9 (8)
	4	0.4	39	0.8	0.8	19	1/8	19 (6)
	4	0.8	25 ^h	1.0	0.6	19	3/8	9 (1)

^a Administration schedules were: A, cDDP on day 0, 7, 14 and brostallicin on day 2, 9, 16; B, brostallicin on day 0, 7, 14, and cDDP on day 9, 16.

^b Tumor regression (T/C%) on day 7 after the last treatment.

^c Fractional tumor volume relative to controls was calculated as described in "Materials and Methods."

^d Log cell kill.

^e T-C, tumor growth delay.

^f Days after the last treatment.

^g One of 8 mice tumor-free survivor.

^h $P < 0.01$ versus cDDP alone.

ⁱ $P < 0.01$ versus brostallicin alone.

^j $P < 0.05$ versus cDDP alone.

En dicha Tabla 1 se observa claramente que la administración de 2 mg/Kg/inyección de cisplatín conjunta con 0,8 mg/Kg/inyección de PNU 166196 (línea 10) tiene un alto porcentaje de regresión del crecimiento del tumor (TC% 40), la cual es muy superior a la obtenida con la misma dosis de PNU 166196 solo (TC% 53, línea 6) o cisplatín solo (TC% 88, línea 2), demostrando el efecto sinérgico que tiene la combinación de ambos compuestos. Cabe anotar, además, que el empleo conjunto de estas cantidades de PNU 166196 y cisplatín no produjo muertes por toxicidad, demostrando la seguridad del uso conjunto de estos compuestos.

Otro parámetro estadístico que muestra el efecto sinérgico de la combinación es el FTV, volumen fraccional de tumor relativo con respecto a los controles (quinta columna en la Tabla 1, página 5403); cuando dicho FTV es mayor que 1 indica que la combinación empleada produce un efecto final que es más que aditivo. Para el caso en el cual se combinan 2 mg/Kg/inyección de cisplatín con 0,8 mg/Kg/inyección de PNU 166196 se obtiene un FTV de 2.6, por lo cual el efecto obtenido con esta combinación es más que aditivo, es decir, se confirma de este modo **el efecto sinérgico** presentado por la combinación de los dos principios activos.

Finalmente, me permito resaltar que los resultados anteriormente discutidos prueban de manera contundente que **la combinación de un derivado de acrilol distamicina (como el PNU 166196) y un agente alquilante, presentan una acción mejorada para el tratamiento antineoplásico, mostrando un sinergismo sorprendente en su acción conjunta y una baja toxicidad, teniendo de esta forma ventaja sobre los compuestos ya conocidos en el estado del arte (como lo son los agentes alquilantes), y siendo una solución para el problema planteado en la presente solicitud.**

En consecuencia, el capítulo descriptivo es claro y suficiente para enseñar el objeto de la presente invención, desvirtuando de esta forma la objeción que sobre el particular presentó el señor Examinador.

3.2. Reivindicaciones. El señor Examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio de la presente solicitud, señalando que en varias reivindicaciones se incluyen términos muy amplios que no permiten establecer el alcance de la invención. El señor Examinador resalta, además, que *"una vez que se procede a realizar las sustituciones respectivas de los radicales R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , X, Y, m, n, r, G, B, Q, W, en la fórmula (I), se observa que los compuestos resultantes de la fórmula (I) abarcan desde la química alifática, aromática, hasta la heterocíclica con y sin sustituciones una o más veces y amplía de manera inaceptable el número de compuestos posibles, reclamados bajo la característica esencial de la fórmula (I)".*

Sumado a lo anterior, El señor Examinador objeta puntualmente las reivindicaciones 1 y 7, 2 y 8, y 3 y 9, por considerar que reclaman la misma materia; las reivindicaciones 18 y 19 por corresponder a métodos de tratamiento y las reivindicaciones 11 a 17 por referirse a usos.

Acatando todas las objeciones expuestas anteriormente, y con el fin de presentar de manera clara la materia a reclamar, es deseo del solicitante presentar un **nuevo capítulo reivindicatorio**, que reemplaza al anterior. Dicho nuevo capítulo reivindicatorio consta de 5 reivindicaciones, en las cuales se muestra claramente el objeto de la invención, y no se incluyen usos ni métodos terapéuticos. Adicionalmente, **se limita el número de compuestos reclamados a uno solo**, el compuesto representativo PNU 166196. Las nuevas reivindicaciones presentadas tienen pleno sustento en la descripción como me permito mostrar a continuación:

- Reivindicación 1. La nueva reivindicación 1 define una composición farmacéutica que incluye el derivado de acrilóil distamicina PNU 166196, o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un agente alquilante. De esta forma la reivindicación 1 se lee como sigue:

"Una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables, y como ingrediente activo, un derivado acrilóil distamicina que es N-(5-[[[5-[[[5-[[[2-[[amino(imino)metil]amino] etil) amino]carbonil]-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil]-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil]-1-metil-1H-pirrol-3-il)-4-[(2-bromoacrilóil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (PNU 166196); o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y un agente alquilante".

Dicho compuesto PNU 166196 es revelado en la descripción como un compuesto representativo de la invención y es el compuesto empleado en los estudios *in vivo* revelados en la presente solicitud y ya discutidos previamente en este memorial (páginas 11 a 14). Por otra parte, dado el demostrado efecto sinérgico que tiene la combinación del PNU 166196 con diferentes tipos de agentes alquilantes, tal como se mostró anteriormente, el término **"agente alquilante"** queda completamente sustentado en la descripción (páginas 11 a 14) y resulta, de este modo, claro. Sumado a este hecho, la persona versada en la materia reconoce específicamente los agentes alquilantes como el tipo de compuestos que actúan como agentes neoplásicos al entrecruzar el DNA de doble hebra evitando la replicación separada de dichas hebras¹. Por lo tanto, la inclusión del término **"agente alquilante"** en esta reivindicación no afecta su claridad.

- Reivindicación 2. Esta reivindicación muestra el grupo del cual puede seleccionarse el agente alquilante incluido en la composición de la reivindicación 1. Dicho grupo de agentes alquilantes es referenciado completamente en la descripción (página 3 y 10). Adicionalmente, la persona versada en la materia claramente reconoce que el término **"mostazas"** se refiere a los compuestos clasificados como mostazas nitrogenadas, ampliamente conocidos, que son útiles en el tratamiento

¹ Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000. Págs. 1477-1504.

antineoplásico; por tanto, el uso de dicho término en la presente reivindicación no afecta su claridad.

- Reivindicación 3. Define un producto que comprende el derivado de acrilol distamicina PNU 166196, y un agente alquilante. Dicho producto considera que la administración del PNU 166196 y dicho agente alquilante sea simultánea, separada o secuencial.
- Reivindicación 4. Muestra el grupo del cual puede seleccionarse el agente alquilante del producto definido en la reivindicación 3.
- Reivindicación 5. Considera una composición farmacéutica como la de la reivindicación 1, en el caso en el que el agente alquilante es un derivado de platino.

Me permito resaltar que **este nuevo capítulo reivindicatorio no amplía de manera alguna el alcance de la invención toda vez que las nuevas reivindicaciones limitan la materia reclamada a uno solo de los posibles derivados de acrilol distamicina** revelados en la descripción.

Finalmente, me permito señalar que el nuevo capítulo reivindicatorio es suficientemente claro para revelar la materia de la presente invención, superando por tanto la objeción que a ese respecto presentó el señor Examinador.

4. Nivel Inventivo. El señor Examinador objeta el nivel inventivo de la presente solicitud con respecto a la existencia de los documentos **WO9804524 (D1)** y **WO9950266 (D2)**. Sobre este particular el señor Examinador resalta "*...el problema planteado en la solicitud, sería solucionado fácilmente por el experto en la materia con base en los compuestos divulgados en D1 y D2; toda vez que para un experto en la materia se deriva de manera evidente del estado de la técnica, porque los conocimientos integrales del estado de la técnica, anteriores a la fecha de la solicitud de la patente, definitivamente conducen a la invención propuesta...*".

A este respecto me permito manifestar que aunque los citados documentos (**D1** y **D2**) presentan similitudes con la materia de la presente invención, **ninguno de los dos sugiere de manera específica las características principales reveladas en la solicitud en estudio**, como se muestra a continuación:

4.1. **Documento WO9804524 (D1)**. Este documento revela compuestos derivados de acrilol distamicina, indicando de dichos compuesto son útiles como agentes antineoplásicos y antivirales. Sobre el citado documento **D1** el señor Examinador afirma que la única diferencia entre dicho documento y la presente solicitud es que **D1** menciona de manera específica un agente alquilante, resaltando la página 20 de dicho documento.

Con respecto a este particular me permito señalar que, si bien el documento **D1** se refiere a la utilidad de compuestos derivados de acrilol distamicina como agentes antineoplásicos, **dicho documento no se refiere específicamente, ni sugiere una composición farmacéutica que contenga dichos derivados de distamicina y un agente alquilante.**

Así, el documento **D1** revela y reclama ciertos compuestos derivados de acrilol distamicina útiles como agentes antineoplásicos o antivirales, o composiciones que los contengan como único principio activo en compañía de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables (**reivindicación 10** del documento **D1**, página 52), pero **no muestra, ni sugiere que una combinación de un derivado de acrilol distamicina y un agente alquilante, puedan tener un efecto mejorado en el tratamiento de tumores, presentando sinergismo y baja toxicidad.**

En la página 20 del documento **D1**, señalada por el señor Examinador, se muestra que, **de forma opcional**, los derivados de acrilol distamicina allí revelados pueden estar acompañados en su formulación por otro agente antineoplásico. Me permito resaltar que **dicho documento no manifiesta que el segundo agente antineoplásico sea específicamente un agente alquilante**, sino que considera una amplia variedad de clases de agentes antineoplásicos, como son ^{2,3}:

² Documento **D1** página 6.

³ PubChem Compound de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

- Antimetabolitos: fluorouracil
- Inhibidores mitóticos: vinblastin
- Antibióticos antitumorales: doxorubicin, epirubicin, daunomycin, bleomycin
- Inhibidores de topoisomerasa: etoposide, 4-demethoxydanourubicin.

Me permito señalar que la adición de otro agente antineoplásico considerada en el documento **D1** se constituye sólo en una característica suplementaria, como claramente lo demuestra el hecho de que dicha composición no es reclamada en las reivindicaciones del citado documento. De este modo, el documento **D1** no enseña ni sugiere el hecho de que pueda esperarse ningún efecto sorprendente al combinar un derivado de acrilóil distamicina con un agente alquilante, como claramente lo revela la presente solicitud.

Consecuentemente, la persona versada en la materia, enfrentada al problema de proporcionar una composición que tenga una alta actividad como antineoplásico pero que presente una baja toxicidad, no tendría motivación alguna para realizar, ni llegaría de forma evidente a la composición revelada en la presente solicitud a partir del documento D1, toda vez que en dicho documento no se revela, ni se sugiere de ninguna forma, que al combinar un derivado de acrilóil distamicina con un agente alquilante se obtendría un efecto sinérgico.

Debe tener en cuenta el señor Examinador que el Manual Andino para el Examen de patentes respecto al análisis de nivel inventivo de una solicitud frente a las anterioridades:

*"Una información técnica tiene siempre que ser considerada en su contexto, **no debe interpretarse ni extraerse fuera de éste. Es decir, que la característica técnica que se está analizando debe buscarse en el mismo campo técnico o en uno que la persona versada en el oficio consideraría de todos modos**"*⁴. (Resaltado fuera de texto).

De este modo, me permito señalar que la persona versada en la materia no consideraría las enseñanzas del citado documento D1 para resolver el

⁴ Manual para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina, Edición 2004, Quito Ecuador, Página 78.

problema planteado en la presente solicitud, y por tanto, dicho documento **no puede afectar el nivel inventivo de la solicitud en estudio**.

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, me permito manifestar que **la presente solicitud tiene nivel inventivo frente a las enseñanzas del documento D1**.

4.2. **Documento WO9950266 (D2)**. Por otro lado, el documento **D2** muestra derivados benzoheterocíclicos de distamicina, y revela su uso como agentes antitumorales.

Con respecto a este documento el señor Examinador, nuevamente declara que la única diferencia con la presente solicitud es el hecho que el documento **D2** cita específicamente que tipo de agente alquilante que se emplea en la "composición".

Sobre este particular, me permito resaltar que, al igual que en el documento **D1**, **el documento D2 no presenta explícitamente una composición en la cual se combinen un derivado de distamicina y un agente alquilante**. Como se expuso anteriormente con respecto al documento **D1**, la consideración hecha en la descripción sobre una posible mezcla del derivado de distamicina es **opcional**, como claramente lo muestran las reivindicaciones de dicho documento que no reclaman ninguna composición en la cual se combine más de un principio activo, solo se reclama una composición que contiene como único principio activo el derivado benzoheterocíclico de distamicina y, adicionalmente, vehículos y/o diluyentes (reivindicación **6**, documento **D2** página 47).

Adicionalmente, y de igual forma que en **D1**, los agentes neoplásicos considerados para una posible mezcla **no son específicamente agentes alquilantes** (página 19 del documento **D2**) sino corresponden nuevamente a una amplia gama de compuestos así ⁵:

- **Antimetabolitos: fluorouracil**
- **Inhibidores mitóticos: vinblastin**
- **Antibióticos antitumorales: doxorubicin, epirubicin, daunomycin, bleomycin**
- **Inhibidores de topoisomerasa: etoposide, 4-demethoxydanourubicin.**

⁵ Página 9.

MM

Consecuentemente, las consideraciones antes expuestas con respecto al documento **D1** son igualmente válidas para el documento **D2**. Así, la persona versada en la materia no estaría motivada, ni llegaría de manera obvia a la materia reclamada en la presente solicitud, a partir de las enseñanzas del documento **D2**, ya que dicho documento **no revela o sugiere de forma alguna que una combinación de un derivado de distamicina y un agente alquilante produzcan un efecto sinérgico sorprendente manteniendo una baja toxicidad.**

En ese sentido me permito señalar nuevamente la consideración que hace el Manual Andino para el Examen de patentes respecto al análisis de nivel inventivo de una solicitud frente a las anterioridades:

*"Una información técnica tiene siempre que ser considerada en su contexto, **no debe interpretarse ni extraerse fuera de éste.** Es decir, que la característica técnica que se está analizando **debe buscarse en el mismo campo técnico o en uno que la persona versada en el oficio consideraría de todos modos**". (Resaltado fuera de texto).*

De este modo, me permito señalar que **la persona versada en la materia no consideraría las enseñanzas del citado documento D2 para resolver el problema planteado en la presente solicitud,** y por tanto, dicho documento **no puede afectar el nivel inventivo de la solicitud en estudio.**

Finalmente, me permito manifestar que, dados los argumentos anteriormente expuestos, la combinación del derivado de distamicina PNU 166196 y un agente alquilante, reclamada en la presente solicitud, **no sería obvia** para la persona versada en la materia, a partir de las enseñanzas del arte más próximo, toda vez que dicho estado del arte no muestra ni sugiere las posibles ventajas de realizar dicha combinación; de tal modo que, la presente solicitud tiene nivel inventivo frente al estado del arte más próximo.

5. Conclusión

Para concluir, me permito manifestar que con los argumentos técnicos expuestos anteriormente con respecto a la descripción y el nuevo capítulo reivindicatorio presentado, hacen que la presente solicitud sea lo suficientemente clara al describir la invención reclamada.

De la misma manera, los argumentos técnicos expuestos mostraron de manera incontrovertible que la persona versada en la materia no podría llegar de manera obvia la combinación materia de la presente invención, a partir de las enseñanzas de los documentos **D1** y **D2**, demostrando así el nivel inventivo que tiene la solicitud en estudio frente al estado del arte más próximo.

6. Anexo me permito presentar:

- (i) Recibo número 08-13,620, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (ii) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 5 reivindicaciones, **que reemplaza al anterior**, en el cual se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente; y
- (iii) Copia de las páginas 5402 a 5404 del documento *Clin. Cancer Res.*, **2003**,9, 5402-5408, referenciadas en el texto.

7. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

Alicia Lloreda Ricaurte
ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. 21 FEB 2008
Ante mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ

Comparecieron:
Alicia Lloreda Ricaurte

quien es exhibido (er) en la
39690713

y declaro(n) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto. En constan-
cia se firma esta diligencia.



Alicia Lloreda Ricaurte
ALICIA LLORED A RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



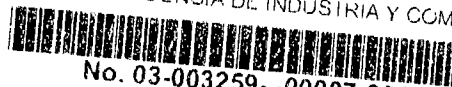
114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 13,620
: FEBRERO 15 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003259- -00007-0000

Fecha: 2008-02-22 16:48:01 Dep. 2020 NULCRLACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Lve: 379 FASLNACIONALI
Act 444 RESPUESTARQUE Folios: 19

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2926434	15/02/2008	11,405,000.00

***** CONCEPTO *****

CA	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables, y como ingrediente activo, un derivado acrilóil distamicina que es N-(5-{{(5-{{(5-{{(2-{{amino(imino)metil}amino} etil amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)-4-[(2-bromoacrilóil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (PNU 166196); o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y un agente alquilante.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 donde el agente alquilante se selecciona a partir del grupo conformado por mostazas tales como melfalan, clorambucil, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida y busulfan; nitrosoureas como carmustina, lormustina, semustina y fotemustina; tetrazinas tales como decarbazina y temozolomida; aziridinas tales como tiotepa y mitomicin C y derivados del platino como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino y lobaplatino.

3. Productos que comprenden un derivado acrilóil distamicina que es N-(5-{{(5-{{(5-{{(2-{{amino(imino)metil}amino} etil amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino]carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)-4-[(2-bromoacrilóil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (PNU 166196); o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; un agente alquilante, en forma de preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial.

4. Productos de acuerdo con la reivindicación 3| donde el agente alquilante se selecciona a partir de mostazas como melfalan, clorambucil, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida y busulfan; nitrosoureas como carmustina, lormustina, semustina y fotemustina; tetrazinas tales como decarbazina y temozolomida; aziridinas como tiotepa y mitomicin C y derivados del platino como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino y lobaplatino.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el agente alquilante es un derivado de platino seleccionado a partir del grupo conformado por cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino y lobaplatino.

M7

Enhancement of *in Vivo* Antitumor Activity of Classical Anticancer Agents by Combination with the New, Glutathione-Interacting DNA Minor Groove-Binder, Brostallicin

Maria Antonietta Sabatino, Tina Colombo, Cristina Geroni, Sergio Marchini, and Massimo Broggini¹

Laboratory of Molecular Pharmacology, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri," Milan [M. A. S., T. C., S. M., M. B.], and Pharmacia Italy, Discovery Research Oncology, Nerviano (Milan) [C. G.], Italy

ABSTRACT

Purpose: Brostallicin (PNU-166196) is a α -bromoacrylic DNA minor groove binder, currently in clinical evaluation. This drug has the peculiarity of showing enhanced antitumor activity in cells with high glutathione *S*-transferase (GST)/glutathione content. The purpose of the study was to study multiple combinations of brostallicin with classical anticancer agents.

Experimental Design: The *cis*-dichloro-diammine-platinum (cDDP)/brostallicin combination was tested in the human colon carcinoma (HCT-116) model transplanted in nude mice. Two treatment schedules were tested: cDDP followed by brostallicin 48 h after or brostallicin followed by cDDP. These two schemes were selected from the observation that tumor cells *in vitro* show an increased activity of GST 48 h after cDDP treatment. The HCT-116 model was used also to test the irinotecan (cPT-11)/brostallicin combination. The effect of brostallicin in combination with doxorubicin (DX) was studied in the i.v. injected murine L1210 leukemia. Three administration schedules were tested. The antitumor activity of brostallicin and Taxotere was tested on the A549 lung cancer xenografts.

Results: In line with the increased GST activity observed after treatment with cDDP, the cDDP/brostallicin interaction was sequence-dependent, leading to a more than additive antitumor effect, without additional toxicity, only when cDDP was given before brostallicin. The antitumor effect of CPT-11 was enhanced significantly by brostallicin cotreatment. A more than additive antitumor effect, without additional toxicity, was observed when DX/brostallicin were

sequentially administered in L1210-bearing mice. Finally, additivity was observed when brostallicin/Taxotere simultaneous combination was tested.

Conclusions: Although the precise molecular mechanism of interaction between brostallicin and the other tested cytotoxics has not yet been identified, a clear therapeutic gain is observed in preclinical models when brostallicin is combined with anticancer agents such as cDDP, DX, CPT-11, and Taxotere. These results indicate the potential therapeutic value of brostallicin in cancer combination treatment therapy.

INTRODUCTION

Brostallicin ($\{N-[5-([5-([2-(\text{aminoiminomethyl})\text{amino})\text{ethyl})\text{amino})\text{carbonyl}]-1\text{-methyl-1H-pyrrol-3-yl})\text{amino})\text{carbonyl}]-1\text{-methyl-1H-pyrrol-3-yl})-4-[[4-[(2\text{-bromo-1-oxo-2-propenyl})\text{amino}]-1\text{-methyl-1H-pyrrol-2-yl})\text{carbonyl})\text{amino}]-1\text{-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamide}$, PNU-166196) is a new derivative of a distamycin A-like frame (1-4), which has shown very promising activity in experimental tumor models (5, 6) and is currently under clinical investigation (7, 8).

In addition, brostallicin has shown a particularly favorable therapeutic index in preclinical studies, with myelotoxicity as dose-limiting toxicity (4, 6); its cytotoxic activity is not affected by mechanisms of resistance associated to mismatch repair deficiency or to treatment with alkylating agents and topoisomerase I inhibitors (4, 6, 9).

As for its mechanism of action, brostallicin is a DNA minor groove-binding agent of which the *in vitro* and *in vivo* activity is increased in tumor cells with higher GSH² and/or GST levels (4, 10, 11). The α -bromoacrylic moiety of brostallicin was found to react with GSH, in a reaction catalyzed by GST, with the possible formation of a highly reactive GSH-complex able to bind covalently to DNA. Among the different GST isoenzymes tested, the GST- π isoform was found to be the strongest activator of brostallicin-GSH reaction. Furthermore, transfection into tumor cells of the human cDNA encoding for GST- π resulted in an increased activity of the compound both in *in vitro* and *in vivo* experimental tumor models (10). This finding is particularly interesting, considering that GSTs, especially GST- π isoform, are overexpressed with high frequency in a

Received 4/8/03; revised 7/21/03; accepted 7/21/03.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

This work was supported in part by Federazione Italiana Ricerca Cancro.

¹ To whom requests for reprints should be addressed, at Laboratory of Molecular Pharmacology Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri," via Eritrea 62, 20157 Milan, Italy. Fax: 39-2-3546277; E-mail: broggini@marionegri.it.

² The abbreviations used are: GSH, reduced glutathione; CI, combination index; CPT-11, irinotecan; cDDP, *cis*-dichloro-diammine-platinum; DX, doxorubicin; FTV, fractional tumor volume; GST, glutathione *S*-transferase; ILS%, percent increase in life span (ILS% = [(median survival time of treated group / median survival time of control group) $\times$ 100]-100); LCK, log cell kill; NSCLC, non-small cell lung cancer; RTV, relative tumor volume; Taxotere, docetaxel; T/C%, tumor growth inhibition.

wide variety of tumors, whereas GST levels in normal or surrounding tissues are low (12–16), thus, potentially representing a therapeutic advantage for brostallicin, rather than a mechanism of resistance as it has been observed for established antitumor agents such as platinum derivatives, alkylating agents, anthracyclines, and to a certain extent for topoisomerase I inhibitors (17–20). Moreover it has been shown that anticancer drugs such as cDDP, DX, or CPT-11 are able to promote the expression or to increase the nuclear level of GST- π in tumor cells (21, 22).

The peculiar mechanism of chemical interaction of brostallicin with GSH and particularly its enhanced activity in cells with high GST/GSH content, prompted us to investigate its efficacy in combination with drugs of which the mechanism of resistance is because of high GST/GSH levels. Theoretically these combinations should increase the number of killed cancer cells.

Because the combined use of anticancer agents has generally been the most effective approach for treating metastatic cancer than the use of single agents, most current chemotherapy regimens are based on combinations.

In the current article, we report data obtained testing the antitumor efficacy of brostallicin in combination with cDDP, CPT-11, DX, and Taxotere. We show that indeed brostallicin is suitable for combination treatments with other anticancer agents and shows synergistic activity in different tumor models.

MATERIALS AND METHODS

Drugs. Brostallicin, DX, and CPT-11 were provided by Pharmacia (Milan, Italy). cDDP was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), and Taxotere was obtained from Aventis Pharmaceuticals. Drugs were dissolved and diluted just before use.

Animals. Four to 6-week-old female Swiss Ncr *nu/nu* mice (Charles River, Calco, Lecco, Italy), weighing 20–25 g, were used in experiments involving human tumors. Two to 3-month-old female DBA2 and CDF1 mice (Charles River), weighing 18–20 g, were used for L1210 cells. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions, and provided food and water *ad libitum*.

Procedures involving animals and their care are conducted in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national (D.L. n.116, G.U., suppl.40, 18 febbraio 1992, Circolare No.8, G.U., 14 luglio 1994) and international laws and policies (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358,1, Dec 12, 1987; Guide for the use of Laboratory Animals, United States National Research Council, 1996).

Tumor Cell Lines. The human tumors (HCT-116 colon carcinoma and A549 NSCLC) were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and were maintained *in vitro* as continuous cultures. HCT-116 and A549 cells were grown in Iscove's medium or Ham's F-12, respectively, at 37°C, 5% CO₂ in medium supplemented with 10% FCS.

For drug testing, tumor cells were implanted s.c. into the left flank of recipient athymic mice (5×10^5 cells/mouse). When the tumor was palpable (~0.2 g), animals were divided randomly into test groups consisting of at least 8 mice each (day 0). L1210 murine leukemia (National Cancer Institute, Frederick, MD) was maintained by weekly i.p. transplants (10^5

cells/mouse) in DBA/2 mice, according to Geran *et al.* (23). For combination experiments, CD2F1 mice were injected i.v. with 10^6 cells/mouse. Treatments started the day after tumor inoculum.

Drug Administration and Testing. All of the drugs were administered i.v. in a volume of 10 ml/kg of body weight, according to the indicated schedules. For solid tumors, the length (L) and width (W) of the solid tumor mass were measured by caliper twice weekly, and the tumor volume (TV) was calculated as: $TV = (L \times W^2)/2$.

The tumor volume at day *n* was expressed as RTV according to the following formula $RTV = TV_n/TV_0$, where TV_n is the tumor volume at day *n* and TV_0 is the tumor volume at day 0.

The percentage of T/C% was determined by calculating RTV as: $T/C\% = 100 \times (\text{mean RTV of treated group})/(\text{mean RTV of control group})$. According to the National Cancer Institute standards, a T/C <42% is the minimum level for activity. The LCK was calculated from the following formula: $LCK = T-C/3,32 \times Td$; T-C, the tumor growth delay, was calculated as the median time (in days) required for the treated-group tumors less the median time required for the control-group tumors to reach a predetermined size (usually 1g), whereas Td is the tumor volume doubling time, in days, measured from a best-fit straight line of the control group in exponential growth. The compound was considered active when the LCK value was >0.7.

Drug activity for leukemia models was calculated as ILS% of treated animals compared with the control group.

Toxicity was evaluated on the basis of weight loss. Mice body weight was recorded the same day of tumor measurement and was taken as a measure of toxicity, together with gross autopsy findings, mainly in terms of reduction of spleen and liver size. Antitumor activity was evaluated at the highest non-toxic dose, which is the highest dose that can be administered without causing death or undue toxicity. A dose producing a weight loss nadir of $\geq 20\%$ was considered as excessively toxic.

Statistical Analysis. Tumor volumes of all of the groups were compared using Fisher's test.

Analyses were computed using the StatView statistical package by SAS Institute Inc. (Third edition).

The antitumor activity of the combination therapy of brostallicin plus cDDP, CPT-11, and Taxotere in solid tumor-bearing mice was analyzed by the fractional product method as described (24, 25).

FTV relative to controls is calculated as the ratio between the mean tumor volume of the experimental groups and the mean tumor volume of the control group. The calculation was performed during the time after the last treatment. The expected FTV of the combination is the product of the mean FTV of the two drugs given as single drugs. The ratio was obtained by dividing the expected FTV by the observed FTV of the combination. A ratio of >1 indicates a more than additive effect, and a ratio of <1 indicates a less than additive effect (24, 25). The antitumor activity of the combination therapy in L1210-bearing mice of brostallicin plus DX was evaluated as reported by Izumi *et al.* (26).

Measurement of GST Activity. Exponentially growing HCT-116 cells were seeded in T-25 flasks 48 h before treatment. Cells were exposed to cDDP (12, 25, and 50 μM) for 1 h and

Table 1 Combination effects of brostallicin plus cDDP against HCT-116 human colon carcinoma xenograft (sequential treatment)
Tumors were implanted s.c. in nude mice; when tumors reached 0.2 g, animals were divided into test groups (day 0). Drug was administered i.v. from day 0.

Treatment schedule ^a	Dose (mg/kg/injection)		T/C (%) ^b	FTV ^c	LCK ^d	T-C (days) ^e	Toxic deaths	Weight loss % (days of nadir) ^f
	cDDP	Brostallicin						
(A)	1	0	99	—	0	0	0/8	<5 (4)
	2	0	88	—	0.3	5	1/16	<5–13 (1)
	4	0	76	—	0.3	5	1/8	26 (1)
	0	0.2	73	—	0.2	3	0/8	8 (4)
	0	0.4	58 ^g	—	0.6	11	0/16	12 (4)
	0	0.8	53	—	1.2	23	2/8	15 (6)
	1	0.2	71	1	0.2	4	0/8	<5 (4)
	1	0.4	48 ^h	1	0.6	11	0/8	6 (4)
	2	0.2	46	1.2	0.8	14	0/8	<5 (4)
	2	0.4	40 ^{g,h,i}	2.6	1.5	27	0/16	12 (4)
	2	0.8	40 ^h	1.5	1.6	31	0/8	13 (6)
	4	0.4	52 ^j	1.1	0.9	18	2/8	22 (4)
	4	0.8	32 ^h	1.4	1.6	31	6/8	30 (4)
(B)	2	0	96	—	0.2	4	0/16	5 (7)
	4	0	78	—	0.4	10	1/16	4–13 (7)
	0	0.4	43	—	0.6	14	0/8	<5 (6)
	0	0.8	31	—	0.4	13	2/8	9 (8)
	2	0.4	61	0.7	0.4	10	0/8	9 (6)
	2	0.8	45	0.9	0.4	12	1/8	9 (8)
	4	0.4	39	0.8	0.8	19	1/8	19 (6)
	4	0.8	25 ^h	1.0	0.6	19	3/8	9 (1)

^a Administration schedules were: A, cDDP on day 0, 7, 14 and brostallicin on day 2, 9, 16; B, brostallicin on day 0, 7, 14, and cDDP on day 2, 9, 16.
^b Tumor regression (T/C%) on day 7 after the last treatment.
^c Fractional tumor volume relative to controls was calculated as described in "Materials and Methods."
^d Log cell kill.
^e T-C, tumor growth delay.
^f Days after the last treatment.
^g One of 8 mice tumor-free survivor.
^h $P < 0.01$ versus cDDP alone.
ⁱ $P < 0.01$ versus brostallicin alone.
^j $P < 0.05$ versus cDDP alone.

then incubated in drug-free medium for 24 and 48 h. Treated and untreated cells were harvested. Total GST activity was determined using 1-chloro-2-4-dinitrobenzene as a substrate (27). Reaction was performed using cytosolic extracts and measuring the conversion of 1-chloro-2-4-dinitrobenzene by GST using a spectrophotometer. The data were normalized for the amount of proteins present in each sample and expressed as nmol of dinitrophenylglutathione formed/min/mg protein at 37°C, using the extinction coefficient of 9.6 nm⁻¹cm⁻¹.

RESULTS

The antitumor activity of brostallicin in combination with classical anticancer agents acting with different mechanisms has been evaluated *in vivo* in different experimental systems.
 The MLH1-deficient human colon carcinoma cell line HCT-116, transplanted s.c. in nude mice, was used to determine the effect of brostallicin given alone or in combination with the platinum derivative cDDP (Table 1; Fig. 1). Mice were treated when tumors reached ~200 mg. Brostallicin and cDDP were given i.v. three times every 7 days (q7dx3). Two treatment schedules were tested: cDDP followed by brostallicin 2 days after (schedule A) or brostallicin followed by cDDP 2 days after (schedule B).

The rationale in selecting these two administration schedules was based on the observation that tumor cells treated with cDDP showed an increased activity of GST.
 In fact, when GST activity was analyzed in HCT-116 cells, 24 and 48 h after a 1 h exposure to cDDP (Fig. 2), a statistical significant increase of GST activity was observed after 1-h treatment with cDDP (25–50 μM) and 48-h recovery in drug-free medium.
 In all of the experiments performed (Table 1), drugs alone produced a dose-dependent inhibition of tumor growth. The highest nontoxic doses were 2 and 0.4 mg/kg/day for cDDP and brostallicin, respectively. When these two doses were combined, no addition of toxicity was found for both schedules.
 As far as the antitumor activity is concerned, the effect obtained with the schedule A was significantly different from the extent of growth inhibition observed after the inverted administration schedule. The analysis of the results obtained with these two combination schedules are reported in Table 1. When cDDP administration was followed by brostallicin 48 h after, the ratio between the expected FTV and the observed FTV of the combination ranged from 1.0 to 2.6, which is clearly indicative of an increased activity of the combination over