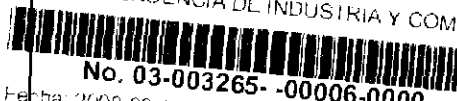


SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003265- -00006-0000

Fecha: 2008-09-05 16:07:59 Dep. 2020 NUECRLACIONI
Tte. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Fojos: 30

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-PHARMACIA ITALIA S.p.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "TERAPIA COMBINADA CONTRA TUMORES COMPUESTA POR DERIVADOS SUSTITUIDOS DE ACRILOIL DISTAMICINA TAXANES Y/O ANTIMETABOLITOS".- Clase A61K 31/70.-Expediente número 03-003.265.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de Junio 13 de 2008.

2. Con el fin de responder las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su concepto técnico **No. 1338** bajo los acápites de Claridad del capítulo Reivindicatorio, Excepción a la patentabilidad, Reivindicaciones relativas a uso, Novedad 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. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

En primera instancia el Señor Examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio señalando puntualmente las reivindicaciones 1 y 10 (y sus dependientes) originalmente presentadas.

Acatando estas objeciones es deseo del solicitante realizar modificaciones sobre el capítulo reivindicatorio que hagan que este sea completamente claro al reclamar la composición farmacéutica objeto de la invención.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

De esta forma, **el nuevo capítulo reivindicatorio está conformado por 15 reivindicaciones** que tienen como base las originalmente presentadas, modificadas de manera tal que se clarifica la composición farmacéutica objeto de la invención.

Me permito señalar que **dichas modificaciones no constituyen de forma alguna una ampliación del alcance de la invención**, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se tienen como único fin delimitar de forma más clara el objeto de la invención tal como se muestra a continuación:

- Reivindicación 1. Con respecto a esta reivindicación el Señor Examinador señala que *"no es clara al indicar "un marco de distamicina o similar a la distamicina" ya que no define de manera clara e inequívoca la materia que se desea proteger en la solicitud. De la misma manera, esta reivindicación no es concisa al indicar "un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito" ya que puede incluir compuestos que no hacen parte del objeto de la invención"*.

Con respecto a este particular me permito señalar que se ha modificado la reivindicación 1 de forma tal que **se incluyen las características esenciales de los derivados de distamicina de la invención que eran considerados en la reivindicación 6 originalmente presentada**. Así, la reivindicación 1 modificada no incluye la expresión *"un marco de distamicina o similar a distamicina"* y delimita claramente cuáles son los derivados de distamicina que se incluyen en la composición farmacéutica objeto de la presente solicitud.

Por otro lado la expresión *"un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito"*, señalada por el Señor Examinador, es clara para la persona versada en la materia, a la cual va dirigida la presente solicitud, que comprendería que la invención hace referencia a composiciones farmacéuticas que contienen: **a)** un derivado de distamicina de la fórmula (I) y **b)** un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito. En este sentido me permito resaltar que la presente invención no pretende reclamar estos agentes por sí mismos, **sino la composición farmacéutica que contiene una combinación de dichos agentes** (dos de ellos o los tres, un derivado de distamicina, un agente antimicrotúbulo y un antimetabolito), la cual presenta un efecto

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

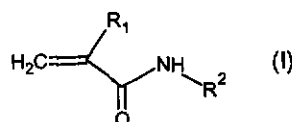
Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

sorprendentemente superior en el tratamiento antineoplásico, comprobado por el solicitante.

Así, la nueva reivindicación 1 se lee como sigue:

"Una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables, y como ingrediente activo.

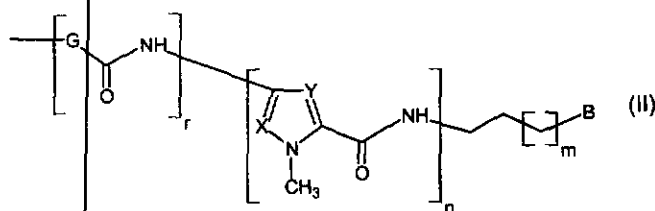
- un derivado acrilóil distamicina de la fórmula (I):



donde

R₁ es un átomo de bromo o cloro;

R₂ es un grupo de la fórmula (II)



donde

m es un entero de 0 a 2;

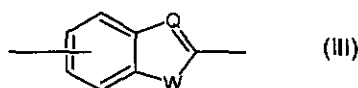
n es un entero de 2 a 5;

r es 0 ó 1;

X y Y son iguales o distintos e independientes para cada anillo heterocíclico, un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

G es fenileno, un anillo heterocíclico saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros con 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre

N, O, ó S, ó es un grupo de la fórmula (III) a continuación:

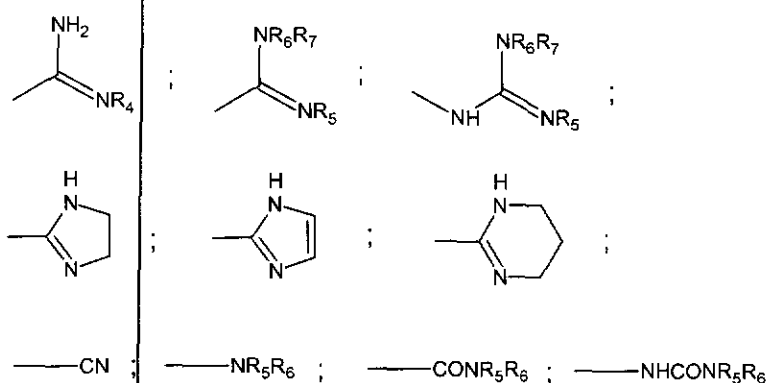


donde Q es un átomo de nitrógeno o un grupo CH y W es un átomo de oxígeno o azufre o bien es un grupo NR₃ en donde R₃ es un hidrógeno o alquil C₁-C₄;

B se selecciona a partir del grupo conformado por:

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701



donde R_4 es ciano, amino, hidroxilo, o alcoxi C_1-C_4 ; R_5 , R_6 y R_7 iguales o distintos, son hidrógenos, o alquil C_1-C_4 ; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y

- un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito."

- Reivindicaciones 2 a 5. Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas.
- Reivindicación 6. Como consecuencia de la modificación realizada en la reivindicación 1, esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- Reivindicaciones 7 a 9 (nuevas reivindicaciones 6 a 8). Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas. Donde ha sido necesario se ha ajustado la dependencia a la nueva numeración.
- Reivindicación 10 (nueva reivindicación 9). De igual forma que en la reivindicación 1, se han incluido las características de los derivados de distamícina consideradas en la reivindicación 15 originalmente presentada, clarificando el objeto de la invención.

Por otro lado, el Señor Examinador señala con respecto a esta reivindicación que "la reivindicación 10 y sus dependientes no mencionan componentes diferentes a los de las composiciones farmacéuticas de la reivindicación 1, por tanto no es necesario que sean independientes".

Sobre este particular me permito resaltar que la reivindicación 10 (nueva reivindicación 9) hace referencia a un "producto" el cual tiene características diferentes a la "composición farmacéutica" y por lo tanto

97 99

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

no puede hacerse dependiente de la reivindicación 1. Tal como lo manifiesta la reivindicación 10 (nueva 9) el producto está en forma de "preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores" característica que no comparte con la composición farmacéutica reclamada en dicha reivindicación 1, y por lo tanto, esta reivindicación no podría hacerse dependiente de la reivindicación 1.

- Reivindicaciones 11 a 14 (nuevas reivindicaciones 10 a 13). Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas, se ha modificado la dependencia acorde con la nueva numeración.
- Reivindicación 15. Dadas las modificaciones realizadas en la reivindicación 10 (nueva reivindicación 9), esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- Reivindicación 16 (nueva reivindicación 14). Esta reivindicación no ha sido modificada y corresponde a la originalmente presentada. Se ha ajustado la dependencia acorde con la nueva numeración.
- Reivindicaciones 17 a 24. Acatando las objeciones presentadas por el Señor examinador con respecto a estas reivindicaciones (que serán discutidas más adelante en este mismo memorial), me permito manifestar que, debidamente autorizado por mi representado, dichas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- Reivindicación 25 (nueva reivindicación 15). Esta reivindicación no ha sido modificada y corresponde a la originalmente presentada.

Finalmente me permito resaltar que las modificaciones expuestas anteriormente hacen que el capítulo reivindicatorio sea completamente claro y conciso al reclamar el objeto de la invención, cumpliendo por lo tanto con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión 486.

4. **EXCEPCIÓN A LA PATENTABILIDAD.**

Adicionalmente, el Señor examinador señala que las reivindicaciones 23 y 24 se refieren a métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, lo cual es

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

considerado como materia no patentable acorde con el Artículo 20, literal a)-d) de la Decisión 486.

Con respecto a este particular me permito señalar que, tal como se mencionó en el numeral anterior de este memorial, tomando en consideración esta objeción es deseo del solicitante **eliminar** estas reivindicaciones del capítulo reivindicatorio. Como consecuencia el capítulo reivindicatorio modificado no hace referencia a métodos de tratamiento.

5. **REIVINDICACIONES RELATIVAS A USO.**

De igual forma, el Señor Examinador manifiesta que las reivindicaciones 17 a 22 hacen relación a un uso lo cual no se considera como una invención.

Al igual que en el caso anterior, acatando esta objeción, el solicitante desea **eliminar** estas reivindicaciones del capítulo reivindicatorio. Consecuentemente, el capítulo reivindicatorio modificado no contempla usos.

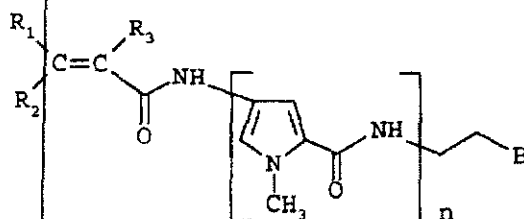
6. **NOVEDAD.**

Por otro lado, el Señor Examinador objeta la novedad de la solicitud en estudio a la luz de las enseñanzas del documento **WO9804524 (D1)**.

Con respecto a este documento el Señor Examinador señala que "*de acuerdo a lo establecido en D1, se podrían encontrar más composiciones farmacéuticas compuestas por compuestos de fórmula (I) un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito*".

A este respecto me permito señalar que el citado documento D1 no contiene específicamente la composición farmacéutica objeto de la invención, y por lo tanto no puede anticipar de ninguna forma a la solicitud en estudio.

El documento D1 revela compuestos derivados de acrilil distamicina que se agrupan bajo la fórmula general (I):



99 107

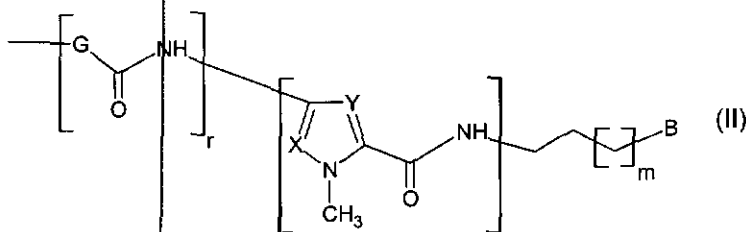
JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Sobre estos compuestos el citado documento D1 señala que son útiles como agentes antineoplásicos y antivirales.

Al hacer una comparación de las estructuras de los derivados de distamicina revelados en D1 y aquellos considerados en la presente solicitud, es evidente que sólo un subgrupo de los compuestos objeto de la invención pueden corresponder a aquellos de D1.

Así, cuando sobre la fórmula (II) de la solicitud en estudio:



r es igual a 0, y X y Y son iguales entre si y corresponden a un grupo CH, los compuestos resultantes serían similares a los considerados en D1. Sin embargo, las demás posibilidades de equivalencia de dichos sustituyentes no están contenidas dentro de los compuestos revelados en el citado documento D1.

A pesar del hecho que existan compuestos comunes en ambos documentos, la composición farmacéutica objeto de la presente invención, no estaría revelada en el documento D1. Si bien, el documento D1 hace referencia a que los compuestos de allí revelados pueden estar acompañados por "un agente antitumoral adicional" (página 29, líneas 15 a 19, D1), enumerando una lista de posibles compuestos que son tradicionalmente empleados como agentes antitumorales, dicho documento no revela específicamente una composición farmacéutica que contenga los compuestos de la invención combinados con un agente antimicrotúbulo y/o antimetabolito, como sí lo hace la presente solicitud.

De este modo, el documento D1 hace un señalamiento acerca de la posible utilidad de suministrar los compuestos de la invención en una mezcla o un "cóctel" con otros agentes antineoplásicos, pero dentro de sus enseñanzas no revela ninguna composición farmacéutica de este tipo, y menos una que contenga un agente antimicrotúbulo y/o antimetabolito.

160 ~~107~~

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Tan es así, que dentro de los ensayos farmacológicos que enseña el documento D1 (páginas 16 y 17), los compuestos allí revelados son administrados **solos** para evaluar su efectividad antineoplásica.

Consecuentemente, **tomando en consideración que el documento D1 no revela de forma específica una combinación de un derivado de distamicina, como aquellos de la invención, combinado con un agente antimicrotúbulo y/o antimetabolito, la solicitud en estudio no es anticipada por las enseñanzas de D1.**

En este punto me permito señalar que si bien es cierto que dentro de la lista de agentes antineoplásicos incluida en la página 20 del documento D1 se incluyen un agente antimicrotúbulo (vinblastina) y un antimetabolito (fluorouracilo), dicho documento no muestra puntualmente una composición que contenga dichos compuestos combinados con un derivado de acrilóil distamicina como el contenido en la composición farmacéutica de la invención.

Dentro de este marco de ideas, me permito llamar la atención a ese despacho a la consideración que hace el Manual Andino de Patentes, con respecto a la novedad de una solicitud:

*"La descripción de un ejemplo específico destruye la novedad de una reivindicación genérica que incluya esta descripción, **pero una descripción genérica no destruye normalmente la novedad de un ejemplo específico que caiga dentro de dicha descripción genérica**".¹ (Resaltado fuera de texto).*

A la luz de esta consideración es claro que dado el hecho que el documento D1 solamente hace una *descripción genérica* de la posibilidad de combinar un derivado de distamicina con "*agentes antineoplásicos*" en general, y que la presente solicitud reclama un caso específico que cabría dentro de dicha descripción genérica, el documento D1 no puede de ningún modo afectar la novedad de la solicitud en estudio, toda vez que **en dicho documento no se enseña una combinación farmacéutica idéntica a la que es objeto de la presente invención.**

¹ Secretaría General de la Comunidad Andina "Manual para el examen de solicitudes de patentes de invención en las oficinas de propiedad industrial de los países de la Comunidad Andina". Lima, 2004. Página 67.

101103

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Adicionalmente, me permito resaltar que el mismo Señor Examinador reconoce que existen diferencias entre D1 y la solicitud en estudio "*el documento D1 describe composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de acrilol distamicina en combinación con agentes antitumorales **muy similares** a las de la presente solicitud, **pues solo se diferencia en los agentes antitumorales** que acompañan el derivado de acrilol distamicina*". (Resaltado fuera de texto).

Tomando en consideración todo lo anterior, es claro que el documento D1 no contiene **todas las características técnicas** reveladas en la solicitud en estudio y, por lo tanto, la presente solicitud es **novedosa** frente al estado del arte más próximo.

7. **NIVEL INVENTIVO.**

Por último, el Señor Examinador objeta la altura inventiva de la solicitud en estudio con base en los documentos **WO9804524 (D1)** y **WO9934796 (D2)**.

Con respecto a estos documentos el Señor Examinador señala "*las composiciones indicadas en D1 y D2, además de tener los mismos principios activos, es decir, derivados de acrilol distamicina, un agente antimicrotúbulo y un agente antimetabólico sugieren y demuestran con diversos ensayos un efecto sinérgico al combinarlos*".

Sobre este particular me permito señalar que **no existen dentro de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 ninguna indicación que llevara a la persona versada en la materia a obtener de forma obvia la composición farmacéutica objeto de la invención**, tal como me permito mostrar a continuación.

7.1. **Documento WO9804524 (D1).**

Como se discutió anteriormente el documento D1 revela compuestos derivados de acrilol distamicina como agentes antineoplásicos y antivirales.

Contrario a lo asegurado por el Señor Examinador el documento D1 no muestra ningún ensayo de actividad biológica de una **composición farmacéutica** y menos de una que contenga el derivado de acrilol distamicina junto con un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito. *fm 106*

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Tal como se discutió en el numeral 6 de este mismo memorial, las páginas 16 y 17 del documento D1 muestran los resultados de los ensayos in Vitro e in vivo únicamente empleando "los compuestos de la invención", resaltando su actividad antineoplásica.

De esta forma, el documento D1 no brinda ninguna indicación que lleve a la persona versada en la materia a suponer que si emplea derivados de acrilolil distamicina similares a los contenidos en D1, de forma combinada con un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito, se obtendría un efecto sinérgico en su actividad antineoplásica, toda vez que dicho documento ni siquiera considera específicamente esta combinación de principios activos.

A este respecto, me permito señalar que el efecto sinérgico que presenta la composición farmacéutica objeto de la invención fue comprobado por el solicitante tal como lo demuestra la tabla 1 de la descripción de la presente solicitud (página 12), en la cual un compuesto representativo de la invención combinado con un antimetabolito (gemcitabina) presentan un incremento en la supervivencia de los animales tratados ILS% de 127, el cual es muy superior al obtenido con cada uno de los componentes por separado.

Otra evidencia de dicho efecto sinérgico se muestra en la tabla 4 del documento *Clin. Cancer Res.*, **2003**,9, 5402-5408, de publicación posterior a la presente solicitud.

Table 4 Combination effects of brostallicin plus taxotere against A549 human lung carcinoma xenograft (simultaneous 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; simultaneous administration once a week $\times$ 3 injections.

Dose (mg/kg/injection)		T/C (%) ^a	FTV ^b	LCK ^c	T-C (days) ^d	Toxic death	Weight loss % (days of nadir) ^e	Tumor free/total mice
Taxotere	Brostallicin							
2.5	0	115	—	0	0	0/8	<5	0/8
5	0	70	—	0.09	2	0/15	11 (4)	0/15
10	0	37	—	0.62	26	0/6	11 (4)	1/6
20	0	18	—	8.3	347	0/7	11 (8)	3/7
0	0.2	86	—	0.04	2	0/15	<5	1/15
0	0.4	95	—	0	0	1/15	7 (4)	0/15
2.5	0.2	73	1.4	0	0	0/8	<5	0/8
2.5	0.4	54	1.9	0.18	4	0/8	<5	0/8
5	0.2	57	1	0.14	3	0/8	<5	0/8
5	0.4	52	1.1	0.24	9	0/15	15 (4)	0/15
10	0.4	28	1.4	2.9	122	0/6	19 (4)	0/6
20	0.2	13	1	N.E. ^f	N.E.	0/7	19 (8)	1/7
20	0.4	9	—	N.E.	N.E.	6/7	23 (4)	0/7

^a Tumor regression (T/C%) on day 8 after the last treatment.

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

^c Log cell kill.

^d T-C, tumor growth delay.

^e Days after the last treatment.

^f $P < 0.05$ versus taxotere alone.

^g $P < 0.01$ versus taxotere alone.

^h $P < 0.05$ versus brostallicin alone.

ⁱ N.E. not evaluable because of the tumor growth kinetic value.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

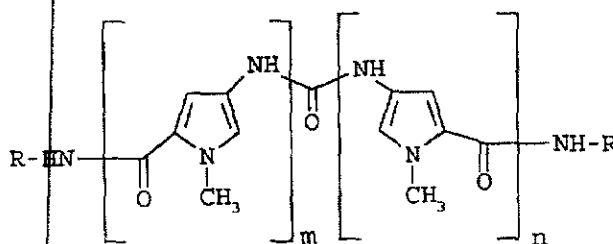
Dicha tabla muestra claramente que el uso de un compuesto representativo de la invención (brostalicina) junto con un agente antimicrotúbulo como es el Taxotere, contra un xenoinjerto de carcinoma de pulmón humano, brinda una regresión del tumor (T/C%) muy superior a la obtenida con los compuestos por separado sin aumentar la toxicidad.

De igual forma, la fracción de volumen relativa del tumor (FTV) demuestra que al usar conjuntamente el compuesto representativo de la invención y taxotere, el efecto obtenido sobre el tumor es más que aditivo (FTV= relación entre el volumen medio del tumor del grupo tratado con respecto al volumen medio del tumor del grupo control, una relación >1 indica un efecto más que aditivo).

Consecuentemente, dado el efecto sinérgico que presenta la composición farmacéutica objeto de la invención y el hecho que el documento D1 no revela ni sugiere que la combinación de un derivado de acrilil distamicina y un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito, podría producir dicho efecto sinérgico, la persona versada en la materia no podría derivar de forma evidente la presente solicitud a partir de las enseñanzas del citado documento D1.

7.2. Documento WO9934796 (D2).

Por su parte, el documento D2 enseña composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de ureido de la forma:



Donde R siempre es un naftilo sustituido con 1 o 2 grupos sulfónicos, y otro agente antineoplásico.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Con respecto a este documento, me permito resaltar que, contrario a lo afirmado por el Señor Examinador, el documento **D2 no muestra composiciones que incluyan un derivado de acrilol distamicina**, sino un compuesto ureido que contiene una parte de su estructura similar a la de la distamicina, pero que presenta diferencias importantes con respecto a los derivados de acrilol distamicina incluidos en la formulación objeto de la invención.

Por otro lado, si bien el documento D2 considera antimetabolitos y agentes antimicrotúbulo (taxanes) dentro de los posibles agentes antineoplásicos presentes en la composición, y resalta que las cantidades de estos componentes son tales que se produce un efecto sinérgico, no existe ninguna indicación que lleve a la persona versada en la materia a suponer que si combina estos agentes con los derivados de acrilol distamicina de la presente invención se obtendrá de igual forma un efecto sinérgico.

En este sentido me permito resaltar que, como se mencionó anteriormente, existen diferencias estructurales significativas entre los compuestos revelados en D2 y los derivados de distamicina que hacen parte de la composición farmacéutica de la presente solicitud. Si bien ambos compuestos presentan como eje central un heterociclo aromático de cinco miembros con un nitrógeno sustituido con un metilo y en la posición 2 un grupo carboxamida, los compuestos de D2 contienen **siempre** en la posición 4 un grupo urea, el cual no está presente en los derivados de distamicina de la invención. De igual forma, la carboxamida de los compuestos de D2 **siempre** está unida a un grupo naftilo el cual está sustituido por de 1 a 3 grupos sulfónicos. Este tipo de grupo aromático no está incluido en los compuestos que hacen parte de la composición farmacéutica objeto de la presente solicitud.

Dadas estas diferencias estructurales tan significativas el técnico con conocimientos medios en el arte no podría pensar que al combinar un compuesto tan diferente estructuralmente a aquellos revelados en D2 con un antimetabolito y/o un agente antimicrotúbulo se podría obtener un efecto sinérgico tal como el señalado dentro del documento D2.

Para la persona versada en la materia es claro que **no todas** las combinaciones de principios activos muestran efectos sinérgicos, que en muchas ocasiones es posible obtener un efecto antagonista en dicha combinación, y que dichos efectos (tanto el sinérgico como el antagonista) no son de ningún modo predecibles.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Sumado a lo anterior, el documento D2 señala un muy gran número de posibles combinaciones de los compuestos de la invención con otros agentes antineoplásicos, pero sólo ejemplifica 4 clases de ellos: inhibidores de depolimerización de tubulina (TX), agentes de unión a DNA (CIS), inhibidores de topoisomerasa II (VP-16), e inhibidores de topoisomerasa I (CPT-11 Y 9-AC) (páginas 14 a 17, D2).

De esta forma, la persona versada en la materia no tendría ninguna motivación para escoger específicamente dos clases de compuestos: antimetabolitos y antimicrotúbulos, y combinarlos con un derivado de distamicina estructuralmente muy diferente a los ureido compuestos de D2, buscando una composición farmacéutica que tenga un efecto mejorado en el tratamiento antineoplásico.

Consecuentemente, la presente invención no puede derivarse de forma obvia a partir de las enseñanzas del documento D2 y por lo tanto la solicitud en estudio tiene **nivel inventivo** frente al citado documento D2.

Adicionalmente, me permito señalar que ninguno de los documentos citados, D1 y D2, podría efectivamente conducir a la persona versada en la materia a producir la composición farmacéutica objeto de la invención, toda vez que en sus enseñanzas no existe ninguna sugerencia directa con respecto al hecho que la combinación de un derivado de acrilol distamicina y un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito tendría un efecto sinérgico en el tratamiento antineoplásico.

Por otra parte, tal como lo manifiesta el Manual Andino de Patentes, con respecto a la evaluación de nivel inventivo de una solicitud:

*"La pregunta a contestar es si teniendo en cuenta el estado de la técnica en su conjunto **existe alguna indicación** que lleve a la persona versada en la materia a modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema técnico, de tal forma que llegue a un resultado que estuviera incluido en el tenor de la(s) reivindicación(es)".² (Resaltado fuera de texto).*

² Ibid página 8, ver Página 77.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

En este caso, al no existir ninguna indicación dentro de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 que señale a la persona versada en la materia la utilidad de realizar específicamente la combinación considerada en la composición farmacéutica objeto de la invención, la presente solicitud a todas luces es **inventiva** frente al estado del arte más próximo.

8. **CONCLUSIÓN.**

Por último, me permito resaltar que las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio, así como los argumentos expuestos hacen que dicho capítulo sea claro y conciso al reclamar las composiciones farmacéuticas objeto de la invención. De igual forma, dichas modificaciones hacen que el capítulo reivindicatorio no haga referencia a métodos de tratamiento o a usos.

De otro lado, el análisis realizado con respecto al documento D1 demostró que dicho documento no contiene explícitamente la composición farmacéutica de la invención, y por lo tanto la solicitud en estudio es **novedosa** frente a las enseñanzas del citado documento D1.

Así mismo, el análisis realizado con respecto a los documentos D1 y D2 estableció de forma incontrovertible que la persona versada en la materia no podría obtener de manera obvia la composición farmacéutica objeto de la solicitud en estudio, y por tanto dicha presente solicitud conlleva **nivel inventivo** con respecto al estado del arte más próximo.

9. Anexo me permito presentar:

- a) Recibo número 08-70,573, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- b) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio, en el cual se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente; y
- c) Copia del documento *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 5402-5408, referenciado en el texto.

107109

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

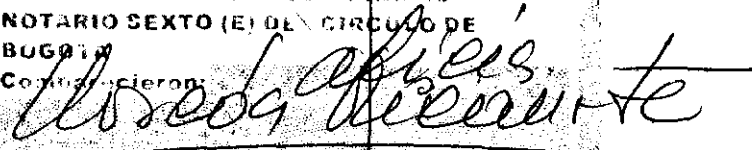
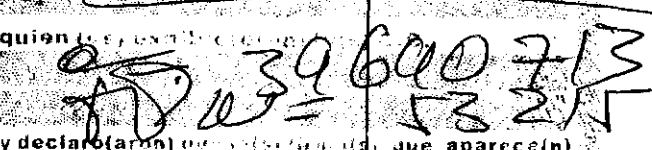
10. En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y de las modificaciones realizadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

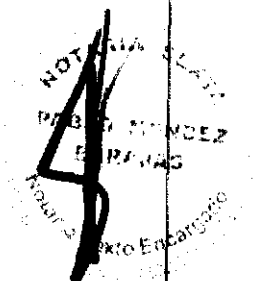
T.P. 53.215

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENCIA PERSONAL
Bogotá, D.C. 03 SEP 2008
Ante mí PABLO MENDEZ RARAÍAS
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCUITO DE
BOGOTÁ
Contrataron:

quien (es, una, o los) _____

y declaro(aron) que el/los 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

C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

168410

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 990176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-003265- -00006-0000

Fecha: 2008-09-05 16:07:59 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 30

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 70,573
FECHA : SEPTIEMBRE 4 DE 2008

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754307	110622	04/09/2008	6,074,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50006-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	103,000.00
	TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

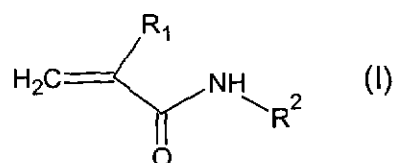
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

109

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables, y como ingrediente activo.

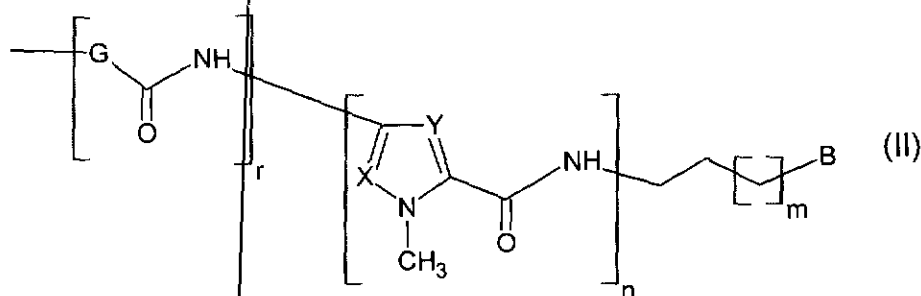
- un derivado acríloil distamicina de la fórmula (I):



donde

R₁ es un átomo de bromo o cloro;

R₂ es un grupo de la fórmula (II)



donde

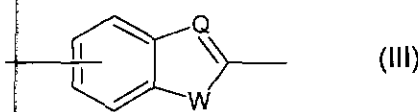
m es un entero de 0 a 2;

n es un entero de 2 a 5;

r es 0 ó 1;

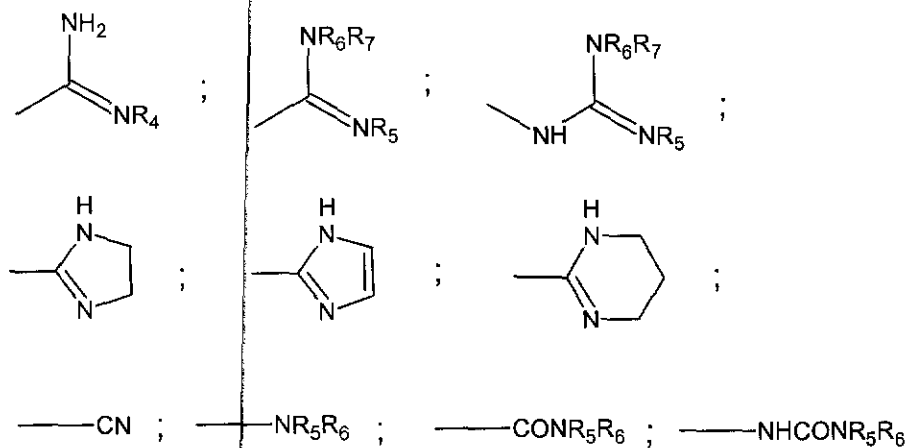
X y Y son iguales o distintos e. independientes para cada anillo heterocíclico, un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

G es fenileno, un anillo heterocíclico saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros con 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, ó S, ó es un grupo de la fórmula (III) a continuación:



donde Q es un átomo de nitrógeno o un grupo CH y W es un átomo de oxígeno o azufre o bien es un grupo NR₃ en donde R₃ es un hidrógeno o alquil C₁-C₄;

B se selecciona a partir del grupo conformado por:



donde R₄ es ciano, amino, hidroxilo, o alcoxi C₁-C₄; R₅, R₆ y R₇ iguales o distintos, son hidrógenos, o alquil C₁-C₄; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y

- un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente antimicrotúbulo se selecciona a partir de taxanos, incluyendo paclitaxel y docetaxel; vinca alcaloides, incluyendo vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina; y estramustina, encapsulada opcionalmente dentro de liposomas.

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, donde el agente antimicrotubular es paclitaxel o estramustina.

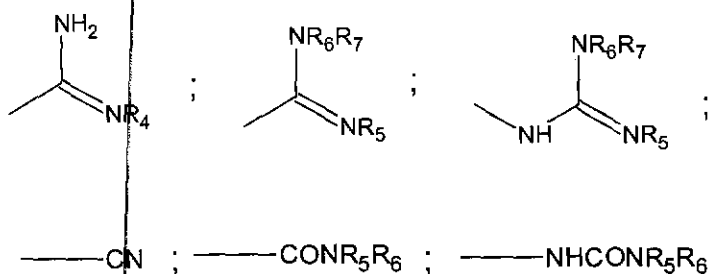
4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antimetabolito se selecciona a

partir de antifolatos, incluyendo metotrexato, tomudex y trimetrexato: derivados de 5-fluoropirimidina, incluyendo 5-fluorouracil, floxuridina, ftorafur, y capecitabina; y análogos de citidina, incluyendo, citarabina, azacitidina y gemcitabina.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 donde el antimetabolito se selecciona a partir de 5-fluorouracil o gemcitabina.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un derivado acrilóil distamicina de la fórmula (I) donde R_1 , R_2 y B corresponden a la definición de la Reivindicación 1, r es 0, m es 0 ó 1, y n es 4.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende un derivado acrilóil distamicina de la fórmula (I) donde R_1 y R_2 corresponden a la definición de la Reivindicación 1, r es 0, m es 0 ó 1, y n es 4, X y Y son ambos grupos CH y B se selecciona a partir de:



donde R_4 es ciano o hidroxilo y R_5 , R_6 y R_7 iguales o distintos, son hidrógeno o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$.

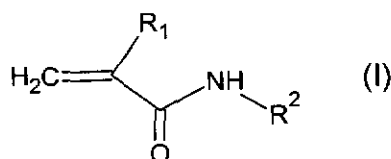
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un derivado acrilóil distamicina, opcionalmente en la fórmula de sal farmacéuticamente aceptable, seleccionada a partir del grupo conformato por:

1. 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-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-hidrocloruro de carboxamida;
2. N-(5-{[(5-{[(5-{[(2-{[amino(imino)metil]amino}propil) 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-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-hidrocloruro de carboxamida;
3. N-(5-{[(5-{[(5-{[(3-amino-3-iminopropil) 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-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-hidrocloruro de carboxamida;
4. N-(5-{[(5-{[(5-{[(3-amino-3-iminopropil) 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-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-imidazol-2-hidrocloruro de carboxamida;
5. N-(5-{[(5-{[(5-{[(3-amino-3-iminopropil) amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)-3-[(2-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirazol-5-hidrocloruro de carboxamida;
6. N-(5-{[(5-{[(5-{[(3-amino-3-oxopropil) amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)-3-[(2-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirazol-5-carboxamida;
7. 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-cloroacriloil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-hidrocloruro de carboxamida;
8. N-(5-{[(5-{[(3-{[amino(imino)metil]amino}propil) amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)amino] carbonil}-1-metil-1H-pirrol-3-il)-4-[(2-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-

pirrol-2-hidrocloruro de carboxamida;

9. N-(5-{[(5-{[(3-amino-3-iminopropil)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-hidrocloruro de carboxamida; y
10. N-{5-[(5-{[(5-{[(3-{(aminocarbonil)amino]propil}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.

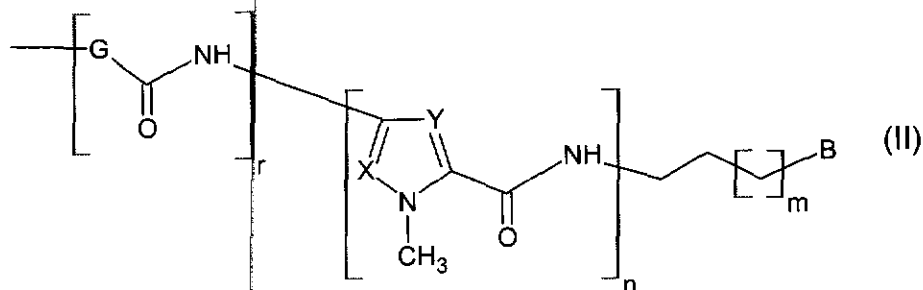
9. Productos que comprenden un derivado acrilóil distamicina de la fórmula (I):



donde

R_1 es un átomo de bromo o cloro;

R_2 es un grupo de la fórmula (II)



donde

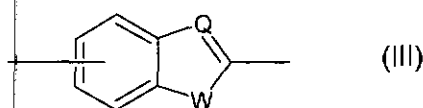
m es un entero de 0 a 2;

n es un entero de 2 a 5;

r es 0 ó 1;

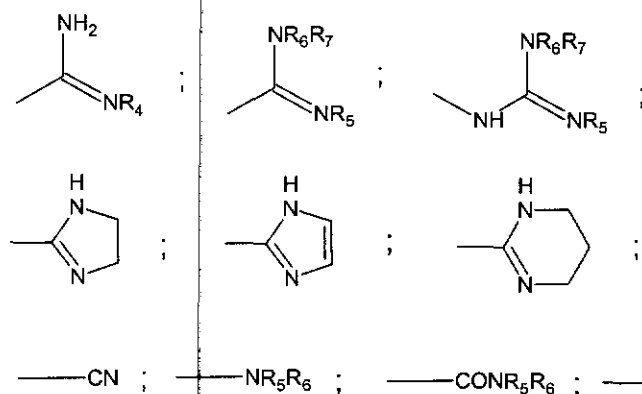
X y Y son iguales o distintos e independientes para cada anillo heterocíclico, un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

G es fenileno, un anillo heterocíclico saturado o insaturado de 5 o 6 miembros con 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, ó S, ó es un grupo de la fórmula (III) a continuación:



donde Q es un átomo de nitrógeno o un grupo CH y W es un átomo de oxígeno o azufre o bien es un grupo NR₃ en donde R₃ es un hidrógeno o alquil C₁-C₄;

B se selecciona a partir del grupo conformado por:



donde R₄ es ciano, amino, hidroxilo, o alcoxi C₁-C₄; R₅, R₆ y R₇ iguales o distintos, son hidrógenos, o alquil C₁-C₄; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; un agente antimicrotubular y/o un antimetabolito, en forma de preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

10. Productos de acuerdo con la reivindicación 9 donde el agente antimicrotubular se selecciona a partir de taxanos, incluyendo paclitaxel y docetaxel; vinca alcaloides, incluyendo vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina; y estramustina, encapsulada opcionalmente dentro de las liposomas.

11. Productos de acuerdo con la reivindicación 10 donde el agente antimicrotubular es paclitaxel o estramustina.

12. Productos de acuerdo con la reivindicación 9 donde el antimetabolito se selecciona a partir de antifolatos,

incluyendo metotrexato, tomudex y trimetrexato; derivados de 5-fluoropirimidina, incluyendo 5-fluorouracil, floxuridina, ftorafur, y capecitabina; y análogos de citidina, incluyendo, citarabina, azacitidina y gemcitabina.

13. Productos de acuerdo con la reivindicación 12 donde el antimetabolito se selecciona a partir de 5-fluorouracil o gemcitabina.

14. Productos de acuerdo con la reivindicación 9 donde el derivado acrilóil distamicina se selecciona del grupo según se define en la reivindicación 8.

15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 donde el derivado acrilóil distamicina, opcionalmente en forma de sal farmacéuticamente aceptables, 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 y donde el antimetabolito es gemcitabina.

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.

¹To 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: 39-233546277; E-mail: broggini@marionegri.it.

²The 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: $LCK = T-C/3,32 \times T_d$; 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 T_d 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 ^h	0.2	4	0/8	<5 (4)
	1	0.4	48 ^h	1.0 ^h	0.6	11	0/8	6 (4)
	2	0.2	46	1.2 ⁱ	0.8	14	0/8	<5 (4)
	2	0.4	40 ^{g,h,i}	2.6 ^j	1.5	27	0/16	12 (4)
	2	0.8	40 ^h	1.5 ⁱ	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 ^j	0.4	10	0/8	9 (6)
	2	0.8	45	0.9 ⁱ	0.4	12	1/8	9 (8)
	4	0.4	39	0.8 ^j	0.8	19	1/8	19 (6)
	4	0.8	25 ^h	1.0 ^g	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 $9.6 \text{ nm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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

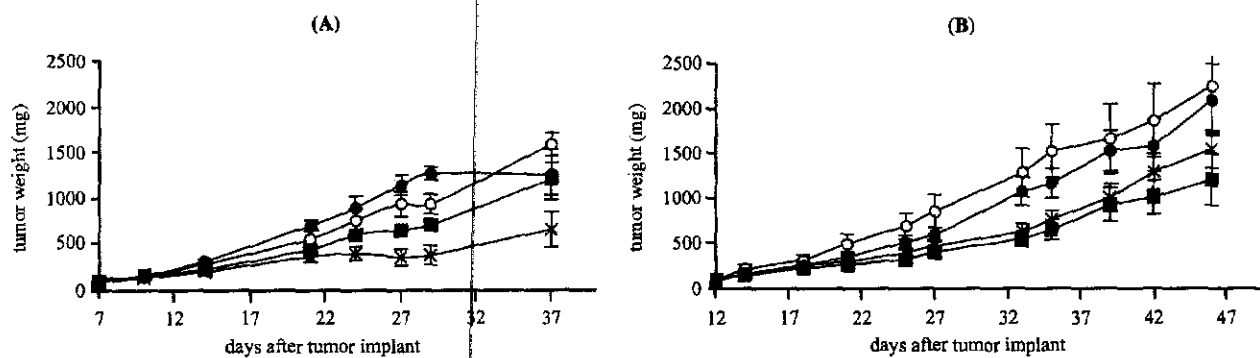


Fig. 1 Representative growth inhibition curves of brostallicin and cDDP alone and in combination in HCT-116 tumor. Mice were treated i.v. q7dx3 with brostallicin 0.4 mg/kg/injection (■) and cDDP 2 mg/kg/injection (●) alone or in combination (×) as cDDP followed by brostallicin 2 days after (A) or brostallicin followed by cDDP 2 days after (B). Control mice were treated with saline (○). Tumor volumes were measured as described in "Materials and Methods" and the mean tumor weight was plotted against time (days); bars, $\pm$ SE.

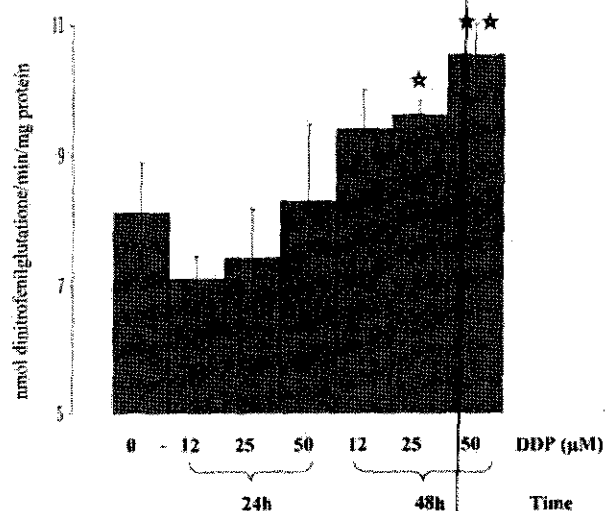


Fig. 2 Increase of GST activity in HCT-116 cells treated with cDDP. Exponentially growing cells were exposed to cDDP or to cDDP vehicle (control) for 1 h. After incubation for 24 and 48 h in drug-free medium at 37°C the level of GST activity was determined. *, $P < 0.05$; ☆☆, $P < 0.01$ versus untreated cells.

single drugs. Conversely, with the opposite schedule, the ratio ranged from 0.7 to 1, suggesting at best an additive effect of the combination.

Furthermore, schedule A was associated with a significant LCK increase (see Table 1) compared with both cDDP and brostallicin given alone.

On the contrary, LCK did not change significantly in schedule B in comparison to either drug alone.

The same tumor model was used to evaluate the efficacy of brostallicin in combination with the topoisomerase I inhibitor CPT-11. Drugs were given on the same day (q7dx3), with brostallicin administered 1 h after the i.v. injection of CPT-11. The results obtained are shown in Table 2. The highest dosages evaluated, 0.4 and 60 mg/kg/injection for brostallicin and CPT-11, respectively, were well tolerated with weight loss $< 5\%$

either when the drugs were given alone or in combination. The combination therapy exhibited more potent antitumor activity than single-drug treatment. The LCK values for CPT-11 40 mg/kg, brostallicin 0.2 mg/kg, and the combination of the two were in fact 0.4, 0.1, and 1.1, respectively. Higher doses, still not toxic, such as CPT-11 60 mg/kg, brostallicin 0.4 mg/kg, and the combination of these two, gave a LCK of 0.8, 0.4, and 1.7, respectively. The combined use of brostallicin and CPT-11 appeared to be superior to single drugs against this tumor model, being the ratio between expected and observed FTV > 1 for all of the tested doses (Table 2).

The antileukemic effect of brostallicin in combination with the anthracycline DX alone was studied in the i.v. injected murine L1210 leukemia. Three administration schedules were tested alone and in combination: simultaneous administration at day 1 after tumor inoculum (schedule 1) or at 24 h interval, with DX given at day 1 and brostallicin at day 2 (schedule 2) or *vice versa* (schedule 3).

Table 3 reports the data obtained testing brostallicin, DX, and the combination of the two drugs. At all of the tested doses the CI values were determined (Table 3). The antileukemic activity of brostallicin and DX administered alone was dose dependent. The highest nontoxic doses were 0.8 and 15 mg/kg/injection for brostallicin and DX, respectively. The combination therapy of the two drugs showed a higher ILS% compared with either drug alone, especially in the DX or brostallicin-preceding treatments (schedules 2 and 3). The CI values for the three schedules ranges between 0.67 and 1, 1 and 1.52, and 1.1 and 1.65 for schedules 1, 2, and 3, respectively. These results suggest that the sequential administration of brostallicin and DX gave an antitumor effect higher than that obtained with simultaneous therapy. In all of the treatment schedules both drugs were well tolerated.

A comparison between the antitumor activity of brostallicin and Taxotere alone and in combination against A549 NSCLC transplanted in nude mice is reported in Table 4. Drugs were given simultaneously (q7dx3), with brostallicin administered 1 h after the i.v. injection of Taxotere. The highest dosages evaluated, 0.4 and 20 mg/kg/injection for brostallicin and Taxotere, respectively, were well tolerated when drugs were admin-

Table 2 Combination effects of brostallicin plus CPT-11 against HCT-116 human colon carcinoma xenograft (simultaneous 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; simultaneous administration once a week $\times$ 3 injections. Brostallicin administered 1 h after CPT-11.

Dose (mg/kg/injection)		T/C (%) ^a	FTV ^b	LCK ^c	T-C (days) ^d	Toxic death	Weight loss %
CPT-11	Brostallicin						
0	0.2	80	—	0.1	2	0/8	<5
0	0.4	68	—	0.4	11	0/8	<5
40	0	46	—	0.4	11	0/8	<5
60	0	39	—	0.8	23	0/8	<5
40	0.2	28 ^{e,f}	1.8	1.1	33	0/8	<5
40	0.4	32 ^{e,f}	1.1	0.9	26	0/8	<5
60	0.2	29 ^f	1.4	1	31	0/8	<5
60	0.4	19 ^{e,f}	1.2	1.7	51	0/8	<5

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

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

^c Log cell kill.

^d T-C, tumor growth delay.

^e $P < 0.05$ versus CPT-11 alone.

^f $P < 0.01$ versus brostallicin alone.

Table 3 Combination effect of brostallicin plus doxorubicin against disseminated L1210 murine leukemia

L1210 cells (1×10^5) were inoculated i.v. to CDF1 mice on day 0 and treatment was given i.v.

Dose (mg/kg/day)		Schedule 1 DX (day 1) Brostallicin (day 1)			Schedule 2 DX (day 1) Brostallicin (day 2)			Schedule 3 Brostallicin (day 1) DX (day 2)		
Brostallicin	DX	ILS% ^a	Tox ^b	CI ^c	ILS% ^a	Tox ^b	CI ^c	ILS% ^a	Tox ^b	CI ^c
0.2	0	38	0/8	—	8	0/8	—	14	0/8	—
0.4	0	23	0/8	—	17	0/8	—	14	0/8	—
0.8	0	69	0/8	—	33	0/8	—	50	0/8	—
0	7.5	54	0/8	—	33	0/8	—	29	0/8	—
0	15	100	0/8	—	67	0/8	—	57	0/8	—
0.2	7.5	69	0/8	0.75	42	0/8	1.02	57	0/8	1.33
0.2	15	92	0/8	0.67	100	0/8	1.33	86	0/8	1.21
0.4	7.5	78	0/8	1.01	58	0/8	1.16	71	0/8	1.65
0.4	15	108	0/6	0.88	100	0/8	1.19	93	0/8	1.31
0.8	7.5	100	0/8	0.81	100	0/8	1.52	86	0/8	1.1
0.8	15	123	0/8	0.73	100	0/8	1	114	0/8	1.1

^a Percentage increase in life span.

^b Number of toxic deaths/number of mice.

^c Combination index = ratio between the ILS% of the two drugs in combination and the sum of ILS% of brostallicin and DX alone. A CI of >1 indicates a more than additive effect, and a ratio of <1 indicates a less than additive effect.

istered alone. Conversely, when drugs were given in combination at these dosages, some initial toxicity could be observed. Against this tumor model, Taxotere was very active (LCK of 8.3 at 20 mg/kg/injection), and brostallicin did not show any significant antitumor activity. When combination therapy was performed with the highest tolerated doses of both drugs, the antitumor effect was additive.

DISCUSSION

Brostallicin is a novel DNA minor groove binder anticancer agent in clinical development. The combined use of anticancer agents is a common strategy in clinical chemotherapy and, thus, the possibility to identify optimal combinations of the antitumor agents should be examined. The results of our study suggest that brostallicin is not only an active compound in single-agent therapy but is also a promising agent in combination with other anticancer agents.

Preclinical findings showing that brostallicin has increased activity in tumors with higher GSH/GST levels/expression (4, 10, 11), overcomes resistance to alkylating agents and topoisomerase I inhibitors, and is fully effective against mismatch repair-deficient tumor cells (23), stimulated our interest in studying the combined activity of brostallicin with drugs of which the antitumor activity is reduced by these mechanisms of resistance (13–20). The involvement of GSTs in tumor resistance to a wide range of chemotherapeutic agents has been described extensively (13–20). In addition, it has been shown that GST- π expression or amount into the nucleus increases in tumor cells in response to cDDP, DX, and CPT-11 treatment (21, 22).

The interaction and the biochemical mechanism of synergy between cDDP and brostallicin have been explored on a mismatch repair-deficient model (HCT-116; Ref. 28). The kinetic of GST activity in HCT-116 cells exposed to cDDP was eval-

Table 4 Combination effects of brostallicin plus taxotere against A549 human lung carcinoma xenograft (simultaneous 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; simultaneous administration once a week $\times$ 3 injections.

Dose (mg/kg/injection)		T/C (%) ^a	FTV ^b	LCK ^c	T-C (days) ^d	Toxic death	Weight loss % (days of nadir) ^e	Tumor free/total mice	T	B	T+B
Taxotere	Brostallicin										
2.5	0	115	—	0	0	0/8	<5	0/8	—	—	—
5	0	70	—	0.09	2	0/15	11 (4)	0/15	—	—	—
10	0	37	—	0.62	26	0/6	11 (4)	1/6	—	—	—
20	0	18	—	8.3	347	0/7	11 (8)	3/7	—	—	—
0	0.2	86	—	0.04	2	0/15	<5	1/15	—	—	—
0	0.4	95*	—	0	0	1/15	7 (4)	0/15	—	—	—
2.5	0.2	73 ^f	1.4 ^g	0	0	0/8	<5	0/8	—	—	—
2.5	0.4	54 ^g	1.9 ^g	0.18	4	0/8	<5	0/8	—	—	—
5	0.2	57 ^h	1 ^g	0.14	3	0/8	<5	0/8	—	—	—
5	0.4	52 ^h	1.1 ^g	0.24	9	0/15	15 (4)	0/15	—	—	—
10	0.4	28 ^h	1.4 ^g	2.9	122	0/6	19 (4)	0/6	—	—	—
20	0.2	13 ^h	1 ^g	N.E. ⁱ	N.E.	0/7	19 (8)	1/7	—	—	—
20	0.4	9	—	N.E.	N.E.	6/7	23 (4)	0/7	—	—	—

^a Tumor regression (T/C%) on day 8 after the last treatment.

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

^c Log cell kill.

^d T-C, tumor growth delay (days).

^e Days after the last treatment.

^f $P < 0.05$ versus taxotere alone.

^g $P < 0.01$ versus taxotere alone.

^h $P < 0.05$ versus brostallicin alone.

ⁱ N.E., not evaluable because of the tumor growth kinetic value.

uated and results confirmed the previously reported ability of cDDP in increasing the expression of GST- π . Because results showed a higher level of GST activity after 48-h recovery in drug-free medium, two combination protocols were investigated, giving brostallicin 48 h before or after cDDP treatment. The sequence of drug administration in the combination influenced the response. cDDP/brostallicin interaction leads to a more than additive antitumor effect without additional toxicity, only giving cDDP before the brostallicin administration. These findings support our hypothesis that cDDP could enhance brostallicin activity through GST- π -stimulated overexpression. We found that the antitumor activity of CPT-11 is enhanced by brostallicin cotreatment. Although a clear understanding of the mechanism by which the antitumor activity of these two drugs benefits of their combination is not clearly understood, the combined use of brostallicin and CPT-11 is an interesting approach for colon cancer treatment considering that brostallicin overcomes camptothecin resistance and, therefore, can kill cells that can survive to CPT-11 treatment.

Furthermore, brostallicin preserves its activity in mismatch repair-deficient tumors, a condition found in human colon cancer with relatively high frequency (29–31).

In *in vivo* systemic L1210 murine leukemia model a more than additive antitumor effect was observed when DX/brostallicin were sequentially administered. The reasons for these results still remain to be determined, and other mechanisms, different from those involving the GSH/GST system, could be operative and should be investigated for designing more effective treatments regimens.

The last study reported in this article regards the combination of brostallicin and Taxotere. The choice of this agent was guided by the brostallicin-clinical plan in which NSCLC has

been selected. Among the effective drugs in clinical use against NSCLC, Taxotere as single agent or in combination therapy provides a clinical benefit over or comparable with other agents (32, 33). Preclinical data showed that brostallicin/Taxotere simultaneous combination is feasible without any antagonistic effect.

Combination chemotherapy using conventional cytotoxic agents accomplishes several important objectives not possible with single-agent treatment. Here we report four promising brostallicin combination treatments. Brostallicin plus cDDP or CPT-11 or DX showed hints of therapeutic synergy, and brostallicin plus Taxotere activity was certainly additive. Altogether these results, together with the peculiar mechanism of action of the drug, indicate brostallicin as a new promising candidate for clinical use in combination therapy.

REFERENCES

- Cozzi, P., Beria, I., Caldarelli, M., Capolongo, L., Geroni, C., and Mongelli, N. Cytotoxic halogenoacrylic derivatives of distamycin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10: 1269–1272, 2000.
- Cozzi, P., Beria, I., Caldarelli, M., Geroni, C., Mongelli, N., and Pennella, G. Cytotoxic α -bromoacrylic derivatives of distamycin analogues modified at the amidino moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10: 1273–1276, 2000.
- Cozzi, P. A new class of cytotoxic DNA minor groove binders: α -halogenoacrylic derivatives of pyrrolocarbamoyl oligomers. *Farmaco.*, 56: 57–65, 2001.
- Cozzi, P. Distamycin derivatives as potential anticancer agents. *IDrugs*, 4: 573–581, 2001.
- Geroni, C., Pennella, G., Capolongo, L., Moneta, D., Rossi, R., Farao, M., Marchini, S., and Cozzi, P. Antitumor activity of PNU-166196, a novel minor groove binder selected for clinical development. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 41: 265, 2000.

to F1250 lineages
brostallicin + cDDP
brostallicin + CPT-11
brostallicin + DX
brostallicin + Taxotere

6. Marchini, S., Broggin, M., Sessa, C., and D'Incalci, M. Development of distamycin-related DNA binding anticancer drugs. *Exp. Opin. Investig. Drugs*, 10: 1703-1714, 2001.
7. Hande, K. R., Roth, B. J., Vreeland, F., Howard, M., Fiorentini, F., Fowst, C., Berlin, J. D., Paty, V. A., Lankford, O., Campbell, A., Compton, L. D., and Rothemberg, M. L. Phase I study of PNU-166196 given on a weekly basis. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20: 96a, 2001.
8. Planting, A. S., De Jonge, M. J. A., Van der Gaast, A., Fiorentini, F., Fowst, C., Antonellini, A., and Verweij, J. Phase I study of PNU-166196, a novel DNA minor groove binder (MGB) with enhanced activity in tumor models expressing high Glutathione (GSH) levels, administered to patients (Pts) with advanced cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20: 96a, 2001.
9. Fedier, A., Fowst, C., Tursi, J., Geroni, C., and Fink, D. Retained sensitivity to brostallicin after loss of DNA mismatch repair. *Eur. J. Cancer*, 38 (Suppl. 7): S155, 2002.
10. Geroni, C., Marchini, S., Cozzi, P., Galliera, E., Ragg, E., Colombo, T., Battaglia, R., Howard, M., D'Incalci, M., and Broggin, M. Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione. *Cancer Res.*, 62: 2332-2336, 2002.
11. Sabatino, M. A., Geroni, C., and Broggin, M. Release of GST-pi promoter hypermethylation and activity of brostallicin in human prostate cancer cells. *Eur. J. Cancer*, 38 (Suppl. 7): S31, 2002.
12. Tsuchida, S., and Sato, K. Glutathione transferases and cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 27: 337-384, 1992.
13. Gate, L., and Tew, K. D. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Exp. Opin. Ther. Targets*, 5: 477-489, 2001.
14. Salinas, A. E., and Wong, M. G. Glutathione S-transferases—a review. *Curr. Med. Chem.*, 6: 279-309, 1999.
15. Ferruzzi, E., Franceschini, R., Cazzolato, G., Geroni, C., Fowst, C., Tradati, N., Pastorino, U., Tursi, J., Dittadi, R., and Gion, M. Validation and reliable assay methods for glutathione quantitation and glutathione s-transferase activity in cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 38 (Suppl. 7): S109, 2002.
16. Shen, H., Kauvar, L., and Tew, K. D. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol. Res.*, 9: 295-302, 1997.
17. Tew, K. D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.*, 54: 4313-4320, 1994.
18. Kearns, P. R., and Hall, A. G. Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy. *Drug Discovery Today*, 3: 113-121, 1998.
19. Hayes, J. D., and Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30: 445-600, 1995.
20. Gamcsik, M. P., Kasibhatla, M. S., Adams, D. J., Flowers, J. L., Colvin, O. M., Manikumar, G., Wani, M., Wall, M. E., Kohlhagen, G., and Pommier, Y. Dual role of glutathione in modulating camptothecin activity: depletion potentiates activity, but conjugation enhances the stability of the topoisomerase I-DNA cleavage complex. *Mol. Cancer Ther.*, 1: 11-20, 2001.
21. Nishiyama, M., Yamamoto, W., Park, J. S., Okamoto, R., Hanaoka, H., Takano, H., Saito, N., Matsukawa, M., Shirasaka, T., and Kurihara, M. Low-dose cisplatin and 5-fluorouracil in combination can repress increased gene expression of cellular resistance determinants to themselves. *Clin. Cancer Res.*, 5: 2620-2628, 1999.
22. Goto, S., Kamada, K., Soh, Y., Ihara, Y., and Kondo, T. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1047-1056, 2002.
23. Geran, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. M., Schumaker, A. M., and Abbott, B. J. protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (Third Edition). *Cancer Chemother. Rep.*, 3(Part 3): 1-103, 1972.
24. Yokoyama, Y., Dhanabal, M., Griffioen, A. W., Sukhatme, V. P., and Ramakrishnan, S. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res.*, 60: 2190-2196, 2000.
25. Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W., and Hicklin, D. J. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.*, 8: 994-1003, May.
26. Izumi, H., Hirano, S., Matsushita, Y., Iguchi, H., Tone, H., and Takeuchi, T. Experimental combination chemotherapy of pirarubicin with various antitumor drugs against P388 murine leukemia. *Cancer Biochem. Biophys.*, 14: 137-149, 1994.
27. Ferrandina, G., Scambia, G., Damia, G., Tagliabue, G., Fagotti, A., Benedetti Panici, P., Mangioni, C., Mancuso, S., and D'Incalci, M. Glutathione S-transferase activity in epithelial ovarian cancer: association with response to chemotherapy and disease outcome. *Ann. Oncol.*, 8: 343-350, 1997.
28. Taverna, P., Liu, L., Hanson, A. J., Monks, A., and Gerson, S. L. Characterization of MLH1 and MSH2 DNA mismatch repair proteins in cell lines of the NCI anticancer drug screen. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46: 507-516, 2000.
29. Peltomaki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 735-740, 2001.
30. Planck, M., Rambech, E., Moslein, G., Muller, W., Olsson, H., and Nilbert, M. High frequency of microsatellite instability and loss of mismatch-repair protein expression in patients with double primary tumors of the endometrium and colorectum. *Cancer (Phila.)*, 94: 2502-2510, 2002.
31. Ericson, K., Halvarsson, B., Nagel, J., Rambech, E., Planck, M., Piotrowska, Z., Olsson, H., and Nilbert, M. Defective mismatch-repair in patients with multiple primary tumours including colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 39: 240-248, 2003.
32. Georgoulas, V. Docetaxel (taxotere) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr. Med. Chem.*, 9: 869-877, 2002.
33. Manegold, C. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: standards. *Lung Cancer*, 34: S165-S170, 2001.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.

Abogada
ALICIA LLOREDA

ASUNTO

Radicación 03-03265
Trámite 011
Evento 379
Actuación 430
Oficio
Folios 003 0628

Patente de Invención

☒

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Vía Nacional

☐

Vía PCT (Fase Nacional)

☒

Cap. I

☐

Cap. II

☒

No. Sol. Internacional

PCT/EP01/07060

Fecha de Presentación Internacional.

20/06/2001

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

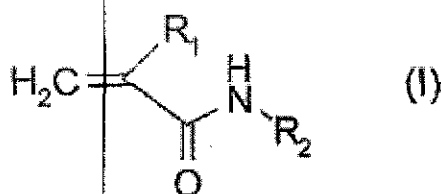
1. Documentos estudiados

- 1.1. Descripción: Folios 41 a 52 como se radicó inicialmente.
- 1.2. Reivindicaciones: Folios 111 a 117 modificado según respuesta del solicitante
- 1.3. Prioridad: Folio 1 GB 0015446.8 del 23/06/2000.
- 1.4. Respuesta del solicitante: Folios 95 a 124.

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: TERAPIA COMBINADA CONTRA TUMORES COMPUESTA POR DERIVADOS SUSTITUIDOS DE ACRILOIL DISTAMICINA, TAXANES Y/O ANTIMETABOLITOS.

Objeto de la invención: El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en composiciones farmacéuticas conformadas por un derivado de acrilóil distamicina de fórmula (I) junto con un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito.



Reivindicaciones 1 a 8 y 15: Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acrilóil distamicina de fórmula (I) junto con un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Reivindicaciones 9 a 14: Productos que comprenden un derivado acrilóil distamicina de fórmula (I); un agente antimicrotubular y/o un antimetabolito, en forma de preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

El problema planteado en esta solicitud de patente es la necesidad de proveer composiciones farmacéuticas que produzcan un efecto antineoplásico sinérgico.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de acrilóil distamicina de fórmula (I) mas un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito.

Se catalogó el objeto de la invención según la IPC en las categorías A61K 31/70 y A61K 31/565.

3. De la solicitud de Patente

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

Las reivindicaciones 1 a 8 y 15 no están sustentadas en el capítulo descriptivo por cuanto allí no se menciona ninguna composición farmacéutica que contenga un derivado de acrilóil distamicina de fórmula (I) más un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito junto un portador farmacéuticamente aceptable ni tampoco se encuentra ningún ejemplo en donde se ilustre alguna de ellas.

En las reivindicaciones 9 a 14 se caracterizan los productos reivindicados por su uso simultáneo en una preparación combinada.

4. Respuesta a los argumentos del solicitante:

Antes de discutir los argumentos del solicitante en su respuesta al concepto técnico número 1338, es importante resaltar que el problema técnico planteado de la actual solicitud está directamente relacionado con proporcionar una composición farmacéutica que contiene un derivado de acrilóil distamicina de fórmula (I) y un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito con la cual se obtienen efectos sinérgicos antineoplásicos, sin embargo, como ya se indicó en el punto 3.1, el capítulo descriptivo no ilustra ninguna composición farmacéutica, lo que describe son preparaciones combinadas de los compuestos activos, entendiéndose estas como preparaciones de cada activo por separado administradas conjuntamente.

Dados los argumentos anteriores y como prueba de ello, cabe mencionar que en el único ejemplo ilustrado en la solicitud en estudio (folio 51) se realiza un ensayo *in vivo* utilizando una preparación combinada de los compuestos PNU 166196 y Gencitabina dando como resultado datos correspondientes a la administración de una preparación de cada activo por separado administrada conjuntamente (fila 3 de la tabla 1).

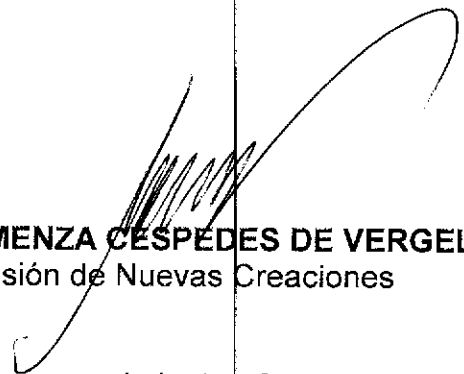
Los argumentos dados por el solicitante que tratan de demostrar la patentabilidad de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 8 y 15 no serán tenidos en cuenta ya que, como se explico anteriormente, no están sustentadas en la descripción.

Dados los argumentos anteriores, es claro que la presente invención, aunque reivindica composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de acrílico distamicina de fórmula (I) y un agente antimicrotúbulo y/o un antimetabolito, el capítulo descriptivo no las sustenta como tal sino que se refiere a preparaciones combinadas de cada activo administradas conjuntamente, con lo cual no se le puede atribuir a la invención la solución del problema técnico planteado.

5. Conclusión

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
23 ENE. 2009

CONCEPTO TECNICO No. 2989	EXAMINADOR TECNICO Código No. 202077
---------------------------	---