

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-063496- -00005-0000

Fecha: 2008-09-10 16:33:27 Dep. 2020 NULCRACIONE
Tra. 11 PAI LN I I Y I I Eve: 379 FASLNACIONAL I I
Act. 444 RESPUESTARLQUE Folios: 30

Señora

Alix Carmenza Céspedes de Vergel

Jefe de División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 04.063.496

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Terapia combinada contra tumores que comprende derivados sustituidos de acrililo distamicina e inhibidores de proteína quinasa (Serina/Treoína quinasa)"

Solicitante: Pharmacia Italia S.P.A.

RESPUESTA AL AUTO NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA NO. 185**DEL 13 DE JUNIO DE 2008, OFICIO NO. 7831 (EXAMEN DE FONDO)**

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, doy respuesta al auto emanado por ese Despacho dentro del término legal:

1. Objeciones del Examinador**1.1 De las reivindicaciones de la solicitud**

El Examinador considera que:

"La reivindicación 1 no es concisa al indicar «un inhibidor de proteína quinasa» ya que puede incluir compuestos que no hacen parte del objeto de la invención.

En la reivindicación 2 se deben escribir los nombres de los principios activos de acuerdo a la Denominación Común Internacional.

La reivindicación 8 se debe hacer dependiente de la reivindicación 1.

Los productos de la reivindicación 9 y sus dependientes no mencionan componentes diferentes a los de las composiciones farmacéuticas de la reivindicación 1, por lo tanto no es necesario que sean independientes.”

En cuanto a las reivindicaciones 23 y 24 el Examinador considera que están exceptuadas de patentabilidad según el artículo 20 D 486 literal a)-d).

Así mismo, El Examinador objeta las reivindicaciones 17 a 22 porque indican el uso de un derivado acrililoilo distamicina de fórmula (1) para la fabricación de medicamentos, lo cual no se considera como invención y por lo tanto no es patentable.

1.2 Nivel Inventivo

Sobre el requisito del nivel inventivo, el Examinador establece que encontró los documentos: D1 (WO 01/97618) y D2 (Artículo: International Journal of Cancer, volume 72, Issue 5, páginas 810-814) que afectan el nivel inventivo de la solicitud.

“El documento D1 describe composiciones farmacéuticas que tienen un efecto sinérgico antitumoral y están conformadas por un agente antitumoral y un derivado de acrililoil distamicina de fórmula: (...)

Con estos compuestos pueden formar composiciones farmacéuticas muy similares a las descritas en la presente solicitud ya que al realizar los respectivos reemplazos de los sustituyentes R1 y R2 de la fórmula (1), se obtienen los mismos compuestos derivados de acrililoilo distamicina. Estas composiciones descritas en D1 también están conformadas por un derivado de acrililoilo distamicina y un agente antitumoral, y solo se diferencian de las composiciones de la solicitud en estudio en que dicho agente antitumoral corresponde a un inhibidor de proteína quinasas.

Estas composiciones, además de tener los mismos principios activos, es decir, derivados de acrililoilo distamicina y un agente antitumoral, sugieren y demuestran con diversos ensayos

un efecto sinérgico al combinarlos.

El documento D2 describe el efecto citotóxico sinérgico de algunos derivados de distamicina-A en combinación con citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF). De acuerdo a lo establecido en D2, el aumento de la sensibilidad de las células de TNF está relacionado con la inhibición de TNF inducida por la fosforilación de las enzimas quinasas las cuales estarían involucradas en el mecanismo de acción antitumoral de los derivados de distamicina-A, lo cual sugiere que una combinación un derivado de distamicina-A con un inhibidor de proteínas quinasas puede generar un efecto aumentado de su actividad antiproliferativa.

Dados los argumentos anteriores, vemos que las diferencias entre las composiciones farmacéuticas de la solicitud en estudio y las de las anterioridades citadas no parecen concederle a las composiciones reivindicadas un efecto técnico inesperado, ventaja o mejoría con respecto a los presentes en el estado de la técnica, ya que tienen los mismos componentes de actividad antitumoral conocida y no se presentan datos de ensayos que demuestren una actividad sorprendente o un efecto sinérgico superior al demostrado en el arte previo para este tipo de composiciones, por lo tanto se les puede considerar composiciones farmacéuticas alternativas a las ya conocidas.

Teniendo en cuenta el problema técnico de la presente solicitud, el cual es la necesidad de proveer composiciones farmacéuticas compuestas por un derivado de acrílico distamicina de fórmula (1) más un inhibidor de proteína quinasa que produzcan un efecto antineoplásico sinérgico, vemos que la información de cualquiera de las anterioridades citadas le sugiere al experto en la materia, utilizando sus conocimientos generales, a diseñar composiciones farmacéuticas compuestas por agentes con conocida actividad antitumoral y solucionar así este problema técnico de manera obvia, por lo tanto el objeto reivindicado en esta solicitud de patente no tiene nivel inventivo."

2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la solicitud

2.1. Modificación de las reivindicaciones para que sean iguales a las aprobadas por la Oficina Europea de patentes.

Presento junto con este escrito un Capítulo Reivindicatorio Modificado, en el cual se incorporan las modificaciones hechas a la solicitud equivalente presentada ante la Oficina Europea de Patentes para este mismo invento y que fue otorgada bajo el número EP 1461083 B1. De igual manera, las reivindicaciones 14 a 25 dirigidas a un uso fueron eliminadas.

Para que la anterior modificación surta efecto, adjunto el nuevo capítulo reivindicatorio, formulario de modificación voluntaria a solicitud pendiente y la tarifa establecida por ese Despacho para este trámite.

2.2. Las reivindicaciones de la solicitud.

2.1.1 El Examinador considera que el término “inhibidor de proteína quinasa” de la Reivindicación 1 no es conciso porque puede incluir compuestos que no son parte de la invención. Este término está definido y claro en la especificación. Específicamente, el texto de la solicitud suministra suficiente descripción para inhibidores de proteína de quinasa, incluyendo modalidades específicas. Esto se encuentra en las páginas 4 líneas 3 a 7 y 6 líneas 1 a 7.

2.1.2 El solicitante ha modificado la Reivindicación 2 para que se muestren los nombres químicos de los inhibidores de proteína quinasa que allí se mencionan. Sin embargo, también se han eliminado de esta reivindicación los CP-564959, ZD 2171 y CI-202 por cuanto los nombres químicos de los mismos no están disponibles.

2.1.3 En cuanto a la objeción dirigida a la Reivindicación 8, se aclara al Examinador que esta reivindicación corresponde a la nueva Reivindicación 7 que es dependiente de la Reivindicación 1. La Reivindicación 7 se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un representante del compuesto de fórmula (I) y un inhibidor de proteína de quinasa seleccionado de ST1571, ZD-1839, OSI-774 y SU 5416.

2.1.4 En cuanto a la objeción dirigida a la Reivindicación 9, se aclara al Examinador que esta reivindicación corresponde a la nueva Reivindicación 8. La nueva Reivindicación 8 y la nueva Reivindicación 1 tienen objetos diferentes; específicamente, la nueva Reivindicación 1 está dirigida a una composición farmacéutica mientras que la nueva

Reivindicación 8 corresponde a un producto como preparación combinada para uso simultaneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores. Por lo tanto, la nueva Reivindicación 8 no puede ser dependiente de la Reivindicación 1, debe ser independiente.

2.3. Nivel inventivo

2.3.1. El nivel inventivo de una solicitud se encuentra definido en el Artículo 18 de la Decisión 486 y se establece cuando *“si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

2.3.2. El Examinador considera que la presente solicitud no tiene nivel inventivo debido a las divulgaciones hechas en los documentos D1 y D2. Particularmente, el Examinador establece que D2 describe el efecto citotóxico sinérgico de algunos derivados de distamicina-A en combinación con citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF). Sin embargo, de acuerdo con lo que se establece en D2, el incremento en la sensibilidad de las células TNF está relacionada con la inhibición de TNF inducida por la fosforilación de las enzimas de quinasa lo cual puede estar relacionado con el mecanismo anti-tumoral de los derivados de distamicina-A, lo cual sugiere que una combinación de un derivado de distamicina-A con un inhibidor de proteína quinasa puede generar un efecto incrementado de su actividad anti-proliferativa. Además, el Examinador alega que no hay datos biológicos en la presente invención.

2.3.3. Contrario a lo que plantea el Examinador, los documentos del arte previo citados no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud por cuanto no es posible derivar la presente invención a partir de las enseñanzas contenidas en los documentos D1 y D2.

2.3.4. En relación con D1, se tiene que esta anterioridad simplemente enseña una composición que comprende un derivado de distamicina de acilo de fórmula (I) y un agente antimicrotubular y/o antimetabólico. D1 no enseña ni sugiere una composición farmacéutica que comprende derivados de distamicina de acilo de fórmula (I) y un inhibidor de proteína quinasa, útiles en el tratamiento de tumores.

2.3.5. Con respecto a D2, esta publicación muestra un efecto sinérgico anti-proliferativo

de dos derivados de distamicina-A, estructuralmente diferentes a los compuestos de la presente invención, con TNF. D2 no enseña, divulga ni sugiere que la combinación de un derivado de α -bromo o α -cloro-acrilóil-distamicina de fórmula (I) con inhibidores de quinasa pueden producir un efecto sinérgico antineoplástico, lo cual esta en concordancia con la presente solicitud. Además, tal y como se muestra en la publicación científica M. Ciomei *et al.* British Journal of Cancer 1995, 72:1504-1508 (Anexo 1) hemos presentado que el efecto sinérgico de los derivados de distamicina con inhibidores de quinasa son impredecibles a partir de las enseñanzas disponibles en el estado de la técnica.

2.3.6. Específicamente, en la publicación de M. Ciomei *et al.* se muestra que la actividad citotóxica de FCE 24515, uno de los derivados de distamicina-A citados en D2, se disminuye en combinación con los inhibidores de quinasa: genistein o staurosporine. Se sugiere al Examinador ver el resumen de esta publicación en la página 1504, y el segundo párrafo de la columna de la izquierda de la página 1507. Estos datos suministran evidencia de que la combinación de un derivado de Distamicina-A con inhibidores de quinasa llevan a resultados impredecibles. Entonces, en vista de las enseñanzas de los documentos del estado de la técnica, una persona versada en la materia no hubiera podido tener expectativas razonables que lo llevaran a pensar que la combinación del compuesto de la presente invención con un inhibidor de quinasa produjera el efecto sinérgico que ahora se reclama en la presente solicitud.

2.3.7. Adicionalmente, evidencia de nivel inventivo para la presente solicitud se puede ver en los datos experimentales *in vitro* (Anexo 2) que muestran los efectos antineoplásticos sinérgicos de la composición farmacéutica de la presente invención. Específicamente, los datos experimentales adjuntos, muestran los resultados de la combinación de brostallicin con:

ST1571 en una línea de célula humana CML del tipo K562,

ZD1839 en una línea de célula de cáncer de pulmón del tipo NCI-H322M y

OSI-774 en una línea de carcinoma humano de pecho del tipo MDA-MB-468.

Mientras que la brostallicina es un representante de derivados de acrilóil distamina, ST1571, ZD1839 y OSI-774 representan tres diferentes tipos de inhibidores de proteína quinasa. En consecuencia, los resultados de las Tablas 1 a 3 que se adjuntan demuestran

claramente el efecto sinérgico antineoplástico de la composición que comprende un derivado de acrililo dictamina y un inhibidor de proteína quinasa como ahora se reclama. Teniendo en cuenta que ninguna de las referencias citadas muestra o divulga la composición que comprende un derivado de acrililo dictamina y un inhibidor de proteína quinasa que muestren efecto sinérgico antineoplástico, entonces la presente invención si cuenta con nivel inventivo frente a los documentos del estado de la técnica.

3. Solicitudes concedidas en otros países para esta misma invención.

A manera informativa, pongo en conocimiento del Examinador que la patente EP 1461083 B1 (16 de febrero de 2006) equivalente a la presente solicitud colombiana ha sido otorgada, habiendo sido evaluada según los criterios de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial universales.

En virtud de lo anterior, solicito que se acepten las razones expuestas en el presente documento y en consecuencia, se otorgue el privilegio de patente de invención para el invento que se tramita en este expediente.

4. Anexos.

Anexo 01. M. Ciomei *et al.* British Journal of Cancer 1995, 72:1504-1508.

Anexo 02. Datos experimentales *in vitro* que muestran los efectos antineoplásticos sinérgicos de la composición farmacéutica de la presente invención.

Atentamente,



ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

125 8
124

Anexos: Capítulo reivindicatorio modificado
 Formulario de modificación
 Recibo
 Anexo 1
 Anexo 2

BOGLMS/BOGDMS-127092 DOC - P2004/000020

126
125



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1		SOLICITUD DE	
☐ Corrección de Error Material		☒ Modificación de una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre: PHARMACIA ITALIA S.P.A.	IDENTIFICACION	
	Dirección: Via Robert Koch, 1.2, I-20152 Milán; Italia	C.C. ☐	NIT ☐
	Nacionalidad o Domicilio: Milán; Italia	C.E. ☐	Otro ☐
	Lugar de Constitución: Italia	Cual ☐	
	Teléfono:	Fax:	Número
	E-Mail		
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	IDENTIFICACION	
	Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.	C.C. ☒	NIT ☐
	Teléfono: 634 1500	C.E. ☐	Otro ☐
	Fax: 376 2211	Cual ☐	
	E-Mail: patents.bogota@bakernet.com	Número 79.143.366	TP 20.281
4 Numero de expediente			
04.063.496			
5 Descripción de la corrección o modificación solicitada			
El solicitante presenta nuevo capítulo reivindicatorio con respuesta a auto de fondo No. 7831			
6 Comprobante de Pago No. 08-68758			
Fecha 29-AGO-08			
7 Anexos			
☒ Comprobante de pago de la tasa.			
☐ Poderes, si fuere el caso.			
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.			
8			
NOMBRE ALVARO CORREA ORDOÑEZ		FIRMA	
		C.C. 79.143.366 T.P. 20.281	

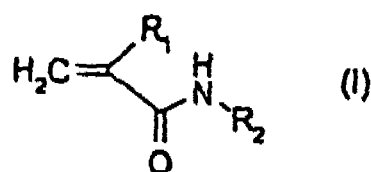
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2000-F03

REIVINDICACIONES

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

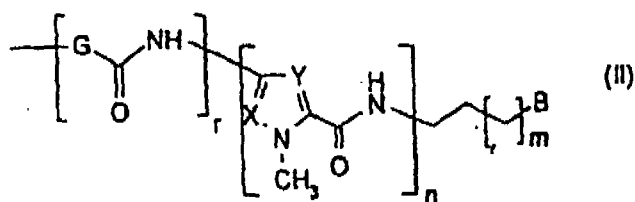
Un derivado de acrilóilo distamicina de la fórmula (I):



En donde:

R₁ es un átomo de bromo o cloro; o

R² es una distamicina o un grupo de fórmula (II):



En donde

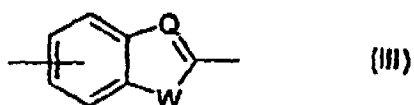
m es un entero entre 0 a 2;

n es un entero entre 2 a 5;

```
res 0 0 1;
```

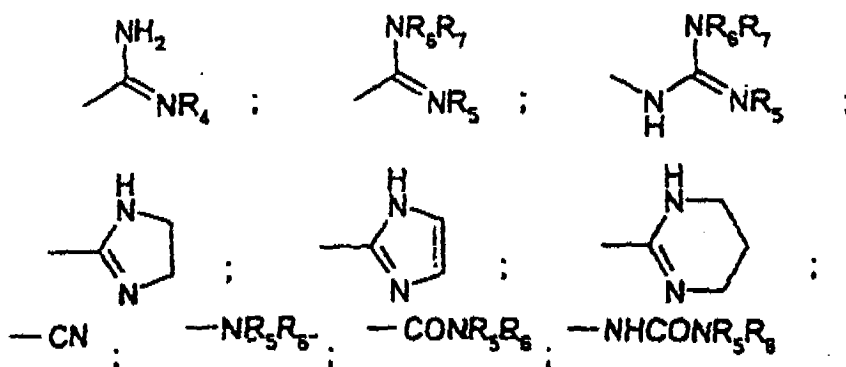
X y Y son, el mismo o diferente e independientemente de cada uno un anillo heterocíclico, un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

G es fenileno, un anillo heterocíclico saturado o no saturado con 5 a 6 miembros con 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O o S, o es un grupo de fórmula (III) como sigue:



En donde Q es un átomo de nitrógeno o un grupo CH y W es un oxígeno o un átomo de azufre o es un grupo NR_3 en donde R_3 es hidrógeno o un alquilo con 1 a 4 carbonos;

B es seleccionado del grupo que consiste de:



En donde R_4 es ciano, amino, hidroxilo o alcoxi con 1 a 4 carbonos; R_5 , R_6 y R_7 , es el mismo o diferente, son hidrógeno o alquilo con 1 a 4 carbonos;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

un inhibidor proteína quinasa.

2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el inhibidor de proteína quinasa se selecciona del grupo que consiste de:

STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil)amino]fenilo]-)

ZD-1839 (4-Quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholinil)propoxi]-)

OSI-774 (4-Quinazolinamina, N-(3-etinilfenil)-6, 7-bis(2-metoxietoxi)-)

PKI 166 (Fenol, 4-[4-[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-6-il]-)

EKB-569 (2-Butenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-, (2E)-)

GW572016 (4-Quinazolinamina, N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxil]fenil]-6-[5-[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil-2-furanilo]-)

CEP 2563 (β -Alanina, L-Iysil-, [(9S, 10S, 12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-metoxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo[3,4-I][1,6] benzodiazocin-10-il]metil ester, hidrocioruro (1:2))

UCN-01 (9,13-Epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-Im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-1-ona,2,3,10,11,12,13-hexahidro-3-hidroxi-10-metoxi-9-metil-11-(metilamino)-, (3R,9S,10R,11R,13R)-)

CGP 41251 (Benzamida, N-[(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metoxi-9-metilo-1-oxo-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-Im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metil-)

Safingol (1,3-Octadecanediol, 2-amino-, (2S,3S)-)

Perifosina (Piperidinium, 4-[[hidroxi(octadeciloxi)fosfinil]oxi)-1,1-dimetil-, sal interna)

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metileno]-1,3-dihidro-)

CGP 79787(1 -Ftalazinamina, N-(4-clorofenil)-4-(4-piridinilmetil)-)

ZD 6474 (4-Quinazolinamina, N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxil-7-[(1 -metil-4-piperidinil)metoxil]-)

SU-11248 (ácido Butanedioico , 2-hidroxi-, (2S)-, compuesto con N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoror-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ilideno)metal]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida(1:1));

y

Flavopiridol (4H-1 -Benzopiran-4-ona, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-).

3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el inhibidor de proteína quinasa se selecciona del grupo que consiste de:

STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]fenilo]-)

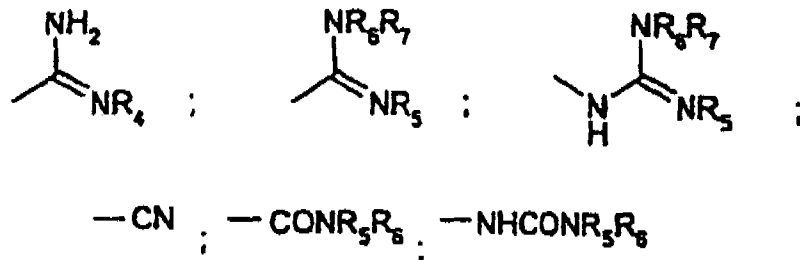
ZD-1839 (4-Quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholinil)propoxi]-)

OSI-774 (4-Quinazolinamina, N-(3-etinilfenil)-6, 7-bis(2-metoxietoxi)-)

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-

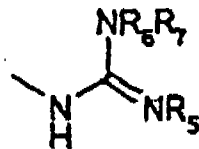
il)metileno]-1,3-dihidro-).

4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un derivado de acrililoilo distamicina de fórmula (1) en donde R_1 y R_2 son según se definió en la reivindicación 4, r es 0, m es 0 o 1, n es 4, X y Y son ambos grupos CH y B se selecciona de:



En donde R_4 es ciano o hidroxilo y R_5 , R_6 y R_7 son iguales o diferentes, y son hidrógeno o alquilo con 1 a 4 carbonos.

5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende un derivado de acrililoilo distamicina de fórmula (1) en donde R_1 es bromo, R_2 es un grupo de fórmula (II) en donde r y m son 0, n es 4, X y Y son CH, B es un grupo de fórmula:



en donde R_5 , R_6 y R_7 son átomos de H opcionalmente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un derivado de acrililoilo distamicina, opcionalmente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, seleccionada del grupo que consiste de:

1. Clorhidrato de N-[5-[[[5-[[[2-[(aminoiminometil)amino] etil] amino] carbonil] -1-metil-1H-pirrol-3-il] amino] carbonil] -1- metil-1H-pirrol-3-il] -4-[[[4- [(2-bromo-1-oxo-2-propenil) amino] -1-metil-1H-pirrol-2-il [carbonil] amino]-1-metil-1H-pirrol -2 - carboxamida (Brostaglicina);
2. Clorhidrato de N-(5-{[(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-carboxamida;
3. Clorhidrato de 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-carboxamida;
4. Clorhidrato de 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-carboxamida;
5. Clorhidrato de 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-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. Clorhidrato de 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-carboxamida;

8. Clorhidrato de 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-carboxamida;

9. Clorhidrato de 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-bromoacriloil) amino] -1-
metil-1H-pirrol-2-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-bromoacriloil)amino]-1-metil-1H-pirrol-2-
carboxamida.

7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 que
comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y,
como ingrediente activo,

Clorhidrato de N-[5-[[[[5-[[[2-[(aminoiminometil)
amino]etil]amino] carbonil]-1-metil-1H-pirrol-3-
il]amino]carbonil]-1-metil-1H- pirrol-3-il]-4-[[[4-[(2-bromo-1-
oxo-2-propenil) amino] -1-metil-1H-pirrol-2- il[carbonil]amino]-
1-metil-1H-pirrol-2-carboxamida (Brostalicina); y

un inhibidor de proteína quinasa se selecciona del grupo que
consiste de:

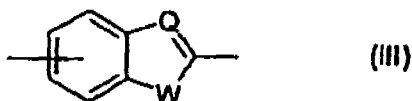
STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metileno]-1,3-dihidro-).

```
res 0 o 1;
```

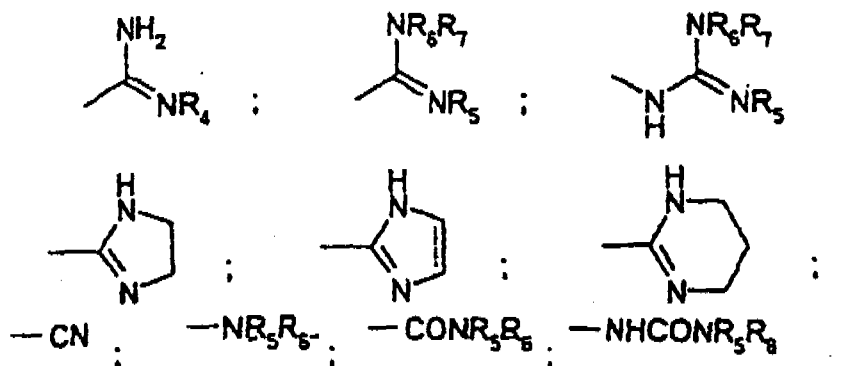
X y Y son, el mismo o diferente e independientemente de cada uno un anillo heterocíclico, un átomo de nitrógeno o un grupo CH;

G es fenileno, un anillo heterocíclico saturado o no saturado con 5 a 6 miembros con 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O o S, o es un grupo de fórmula (III) como sigue:



En donde Q es un átomo de nitrógeno o un grupo CH y W es un oxígeno o un átomo de azufre o es un grupo NR_3 en donde R_3 es hidrógeno o un alquilo con 1 a 4 carbonos;

B es seleccionado del grupo que consiste de:



En donde R_4 es ciano, amino, hidroxilo o alcoxi con 1 a 4 carbonos; R_5 , R_6 y R_7 , es el mismo o diferente, son hidrógeno o alquilo con 1 a 4 carbonos;

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y un inhibidor proteína quinasa como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.

9. Productos de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el inhibidor de quinasa es seleccionado del grupo que consiste de:

137 20
736

STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]fenilo]-)

ZD-1839 (4-Quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholinil)propoxi]-)

OSI-774 (4-Quinazolinamina, N-(3-etinilfenil)-6, 7-bis(2-metoxietoxi)-)

PKI 166 (Fenol, 4-[4-[(1R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-6-il]-)

EKB-569 (2-Butenamida, N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-3-ciano-7-etoxi-6-quinolinil]-4-(dimetilamino)-, (2E)-)

GW572016 (4-Quinazolinamina, N-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxil]fenil]-6-[5-[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil-2-furanilo]-)

CEP 2563 (β -Alanina, L-Iysil-, [(9S, 10S, 12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-metoxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-I][1,6]benzodiazocin-10-il]metil ester, hidrocloreto (1:2))

UCN-01 (9,13-Epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-Im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-1-ona,2,3,10,11,12,13-hexahidro-3-hidroxi-10-metoxi-9-metil-11-(metilamino)-, (3R,9S,10R,11R,13R)-)

CGP 41251 (Benzamida, N-[(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metoxi-9-metilo-1-oxo-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-Im]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metil-)

Safingol (1,3-Octadecanediol, 2-amino-, (2S,3S)-)

Perifosina (Piperidinium, 4-[[hidroxi(octadeciloxi) fosfinil]oxi)-1,1-dimetil-, sal interna)

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metileno]-1,3-dihidro-)

CGP 79787(1 -Ftalazinamina, N-(4-clorofenil)-4-(4-piridinilmetil)-)

ZD 6474 (4-Quinazolinamina, N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxil-7-[(1 -metil-4-piperidinil)metoxil]-)

SU-11248 (ácido Butanedioico , 2-hidroxi-, (2S)-, compuesto con N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoror-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-ilideno)metal]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida(1:1));

y

Flavopiridol (4H-1 -Benzopiran-4-ona, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-).

10. Productos de acuerdo con la Reivindicación 9 en donde el inhibidor de proteína quinasa se selecciona del grupo que consiste de:

STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil)amino]fenilo]-)

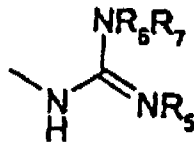
ZD-1839 (4-Quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholinil)propoxi]-)

OSI-774 (4-Quinazolinamina, N-(3-etinilfenil)-6, 7-bis(2-metoxietoxi)-)

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-

il)metileno]-1,3-dihidro-).

11. Productos de acuerdo con la reivindicación 8 que comprenden un derivado de acrililoilo distamicina de fórmula (I) en donde R₁ es un átomo de bromo o cloro; R₂ es un grupo de fórmula (II) en donde r y m son 0, n es 4, X y Y son un grupo CH; B es un grupo de fórmula:



en donde R₅, R₆ y R₇ son átomos de H opcionalmente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

12. Productos de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el derivado de acrililoilo distamicina es seleccionado del grupo como se definió en la reivindicación 6.

13. Productos que comprenden el derivado de acrililoilo distamicina clorhidrato de N-[5-[[[5-[[[2-[(aminoiminometil)amino]etil] amino]carbonil]-1-metil-1H-pirrol-3-il] amino] carbonil] -1-metil-1H-pirrol-3-il] -4- [[4-[(2-bromo-1-oxo-2-propenil) amino] -1-metil-1H-pirrol-2- u [carbonil] amino] -1-metil-1H-pirrol-2- carboxamida (Brostalicina), y un inhibidor de la proteína quinasa que se selecciona del grupo que consiste de:

STI571 (Benzamida, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil)amino]fenilo]-)

ZD-1839 (4-Quinazolinamina, N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-[3-(4-morpholinil)propoxi]-)

OSI-774 (4-Quinazolinamina, N-(3-etinilfenil)-6, 7-bis(2-

metoxietoxi)-)

SU 5416 (2H-indol-2-one, 3-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metileno]-1,3-dihidro-);

como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de tumores.



144 2A
740

SHORT COMMUNICATION

Decreased tyrosine phosphorylation in tumour cells resistant to FCE 24517 (tallimustine)

M Ciomei, W Pastori, L Capolongo, C Geroni, G Melegaro, G Pennella and M Grandi

Pharmacia, R&D/B.A. Pharmaceuticals, Experimental Oncology Department, Via Giovanni XXIII no. 23, 20014 Nerviano MI - Italy.

Summary Resistance to FCE 24517 is not related to the emergence of any of the most frequently observed phenotypes. We have found that two resistant cell lines (L1210/24517 murine leukaemia and LoVo/24517 human colon adenocarcinoma) present congenital modifications in tyrosyl phosphatase and kinase activities. Moreover, the cytotoxic activity of FCE 24517 is increased in combination with a tyrosine phosphatase inhibitor and decreased in combination with protein kinase inhibitors, this being in agreement with the hypothesis that the activity of this drug is strictly dependent on the presence of tyrosine phosphorylated protein(s).

Keywords: FCE 24517; tallimustine; resistance; MDR; phosphorylation balance

FCE 24517 (tallimustine), a benzoyl mustard derivative of distamycin A, is a new anti-tumour agent which has shown a remarkable preclinical anti-tumour activity (Barbieri *et al.*, 1988; Arcamone *et al.*, 1989) and is now in phase II clinical trials (Abigerges *et al.*, 1993; Hageboutros *et al.*, 1994; Sessa *et al.*, 1994).

A murine leukaemia L1210 line (L1210/24517) and a human colon adenocarcinoma line (LoVo/24517) resistant to FCE 24517 have been recently described (Capolongo *et al.*, 1993; Geroni *et al.*, 1993). These cell lines maintain the same growth features and biological behaviour as the parental line and are specifically resistant *in vitro* and *in vivo* to the selecting agent and other distamycin A derivatives bearing different alkylating moieties, such as nitrogen mustard, epoxycarbonyl and halogenoacriloyl group on the N-terminal position of distamycin A (D'Alessio *et al.*, 1994). As regards other cytotoxic agents, the L1210/24517 subline does not present the multidrug resistance (MDR) phenotype and is fully sensitive to anti tumour compounds involved in the MDR mechanism and to alkylating agents (e.g. cisplatin) (Geroni *et al.*, 1993). Moreover, it is partially cross-resistant to melphalan, this resistance being accounted for by higher glutathione and glutathione-S-transferase intracellular levels, which however do not influence the resistance to FCE 24517 (Geroni *et al.*, 1993; Tagliabue *et al.*, 1993). The LoVo/24517 subline is partially different, because it is marginally resistant to doxorubicin, VP-16 and vinblastine, because the *mdr-1* mRNA expression is elevated 2-fold. In this case the resistance selected by FCE 24517 is partially mediated through p170 overexpression, but the main mechanism still remains to be established.

Further possible explanations for drug resistance were examined, such as, for example, the presence of a more efficient repair of the DNA damage caused by FCE 24517. This compound is able to alkylate adenine-N3 located in highly specific DNA sequences (Broggi *et al.*, 1991) and therefore an increase in adenine N3 glycosylases could protect the cells; however, the significant cross-resistance to the parent compound distamycin A, which is not an alkylating agent, is completely in contrast with this hypothesis. We now report that a congenital modification in the phosphorylation balance is present in the resistant sublines. The importance of a well-regulated balance between phosphorylation and

dephosphorylation for the mode of action of FCE 24517 is strengthened by the increased cytotoxicity of FCE 24517 observed in combination with a tyr-phosphatase inhibitor in both sensitive and resistant cells.

Materials and methods

Chemicals

FCE 24517 was synthesised in the Chemical Department of Pharmacia, Farmitalia Carlo Erba, Milan, Italy. The drug was dissolved in sterile water immediately before use and the concentration was checked spectrophotometrically following dilution of aliquots of the drug solution in ethanol: $\lambda_{\text{max}} = 314 \text{ nm}$, $E 1\% = 744.09$. Herbinycin and staurosporine were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA); genistein, quercetin and sodium orthovanadate were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Sodium orthovanadate (Na-V) was dissolved in water; herbinycin, staurosporine, genistein and quercetin were dissolved in DMSO (maximum concentration in the assays 1%, which has no effect on cell proliferation).

Cell cultures

L1210 and L1210/24517 murine leukaemia cell lines were grown *in vitro* as a stationary suspension culture in RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Flow, Irvine, UK), 2 mM L-glutamine (Gibco Europe, Glasgow, UK), $10 \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol, 100 Unit ml^{-1} penicillin and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin.

LoVo and LoVo/24517 human colon adenocarcinoma cell lines were maintained in Ham's F12 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FCS, 1% vitamins (vitamins BME solution, $100\times$, Gibco) and 2 mM L-glutamine.

Drug sensitivity assays

To determine the antiproliferative effect of the combination of Na-V or protein kinase inhibitors with FCE 24517, L1210 and L1210/24517, exponentially growing cells were seeded (1×10^5 cells ml^{-1}) in T25 flasks (Costar, Cambridge, MA, USA) in the presence or absence of Na-V or protein kinase inhibitors. After 48 h incubation cells were readjusted to the

Correspondence: M Ciomei

Received 20 March 1995; revised 6 July 1995; accepted 2 August 1995

concentration of 1×10^5 cells ml^{-1} , reseeded in test tubes (1 ml per tube) and treated for 1 h with different concentrations of FCE 24517 in the presence of Na-V or protein kinase inhibitors. At the end of the treatment, the cells were washed and incubated in drug-free medium for 48 h; inhibition of cell growth was evaluated by counting surviving cells in a ZBI Coulter Counter (Hialeah, FL, USA). LoVo and LoVo/24517 cells were seeded in 35 mm plastic dishes at a concentration of 600 cells per dish; after 24 h cells were treated with Na-V for 48 h. FCE 24517 was added for the last 4 h, then the medium was replaced with fresh medium and colonies were counted after 8–10 days using an optical microscope.

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated on the derived concentration–response curves. For each drug concentration duplicate cultures were used.

Antiphosphotyrosine blots

For total protein extracts, cells in exponential growth were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with 1 mM Na-V for 15 min (LoVo cells) or 60 min (L1210 cells) in serum-free medium. After exposure, the pelleted cells were solubilised in boiling Laemmli buffer. The cell lysates were immediately boiled for 5 min and sonicated.

In each sample of total protein extracts the protein content was estimated by the Pierce protein assay (bicinchoninic acid assay) and adjusted to an equivalent concentration in order to load 300 μg of protein per lane for separation by SDS–PAGE on a 10% acrylamide slab gel.

The SDS–PAGE separated proteins were transferred electrophoretically to a nitrocellulose sheet that was soaked as described (Toedín *et al.*, 1979). The nitrocellulose sheets were then incubated 1 h at room temperature in the presence of 2 μg ml^{-1} of antiphosphotyrosine antibody monoclonal IgG2bk (UBI, Lake Placid, NY, USA). After washing, blots were incubated with horseradish peroxidase-linked whole antibody anti-mouse Ig at room temperature for 1 h. Detection using the ECL reagents (Amersham, UK) was accomplished by mixing them in a ratio of 1 : 1 and applying to the nitrocellulose surface for 1 min. Excess reagent was drained off and the membrane exposed for 30 s to Hyperfilm-ECL.

The molecular weight of the phosphoproteins was estimated relative to the electrophoretic mobility of co-transferred, prestained protein standards (Amersham, UK).

The total optical density of the different lanes was measured using an Imaging Analyser (Vidas Plus, Zeiss), program Ibas 20, Kontron Elektronik.

Phosphotyrosyl-specific protein phosphatase (PTPase) assay

A standard 100 μl reaction contained 100 000 c.p.m. ^{32}P -labelled substrate ^{32}P -Tyr-myein basic protein, labelled at its tyrosine residue using $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and v-abl tyrosine kinase as described by Streuli *et al.*, 1990) in buffer A: 50 mM Hepes, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 50 mM sodium chloride, 50 μg ml^{-1} bovine serum albumin (BSA) pH 7.0.

The reaction was initiated by the addition of the appropriate dilution of membrane protein samples (extracted according to Butler *et al.*, 1989). After different times at 30°C, the reaction was stopped by adding 500 μg of BSA as carrier protein and 200 μl of 20% trichloroacetic acid (TCA) and proteins were precipitated in liquid nitrogen. The samples were then centrifuged in an Eppendorf centrifuge for 10 min and the ^{32}P content of the supernatant was determined.

Tyrosine kinase assay

A standard 50 μl reaction contained 0.1 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (6000 Ci mmol^{-1} , 10 mCi ml^{-1} , NEN DUPONT), 10 μg ml^{-1} myelin basic protein, 3 mM sodium orthovanadate, 50 μM ATP in buffer B: 25 mM Tris, 0.1 mM DTT, 10 mM magnesium chloride pH 8.0.

The reaction was initiated by addition of the appropriate dilution of membrane protein samples (extracted according

to Butler *et al.*, 1989). After 30 min at 30°C, the reaction was stopped by adding 250 μg of BSA as carrier protein and 100 μl of 20% TCA and proteins were precipitated in liquid nitrogen. The samples were then centrifuged in an Eppendorf centrifuge for 10 min and the ^{32}P content of the pellets resuspended in 0.1 M Tris pH 8.0 was determined.

Results

Studies on tyrosine phosphorylated proteins

No changes in the total protein content of the FCE 24517 resistant subclones in comparison with the protein content of the parental cell lines, LoVo and L1210, were seen after SDS–PAGE and Coomassie staining (not shown). On the contrary, Figure 1 shows the difference observed after immunodetection of the same blotted gels with an antiphosphotyrosine monoclonal antibody: a general reduced phosphorylation in tyrosine was present in the LoVo/24517 proteins (lane 4 in comparison with lane 1) together with a reduced sensitivity of the resistant line (lanes 5 and 6 in comparison with lanes 2 and 3) to a 15 min treatment with a tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate (Tonks *et al.*, 1988). Figure 2 shows the quantitative densitometric evaluation of three repeated experiments on LoVo and LoVo/24517 cells and of similar experiments on L1210 and L1210/24517 cells: also in the case of L1210 cells, the proteins of the resistant line presented a reduced phosphorylation in tyrosine.

Studies on phosphotyrosyl-specific phosphatase activity

The general picture of reduced tyr-phosphorylation seen in total protein extracts of both resistant sublines was in agreement with the hypothesis of a modification either in the tyr-phosphatase activity or in the tyr-kinase activity of the resistant sublines. The total PTPase activity in membrane extracts of both sensitive and resistant subclones was evaluated as the ability to dephosphorylate ^{32}P -myelin basic protein phosphorylated by abl oncogene product.

As shown in Figure 3 the phosphotyrosyl-specific phosphatase activity is increased in the protein membrane extract of L1210/24517 cells in comparison with the activity of the membrane extract of the parental L1210 cell line, whereas no difference was observed with LoVo and LoVo/24517 membrane extracts.

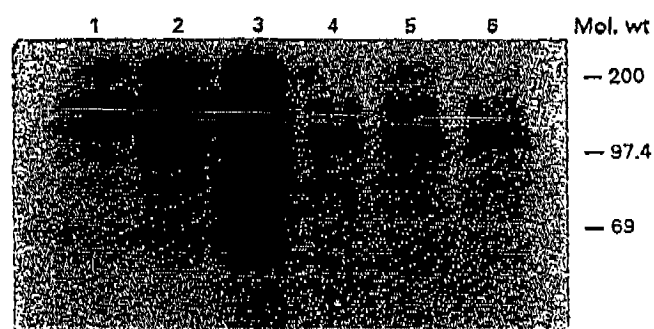


Figure 1 Tyrosine-phosphorylated proteins in total extracts of LoVo and LoVo/24517 cells: treatment with sodium orthovanadate. Cell treatments were performed with 0.1 and 1 mM Na-V for 15 min. Total proteins, extracted in Laemmli sample buffer, were separated by SDS–PAGE and transferred to a nitrocellulose sheet. The blot was probed with a monoclonal antiphosphotyrosine antibody. This is one representative experiment of three. Lanes 1–3: LoVo cells (1, control; 2, 0.1 mM Na-V; 3, 1 mM Na-V); lanes 4–6: LoVo/24517 cells (4, control; 5, 0.1 mM Na-V; 6, 1 mM Na-V). Standard proteins: myosin (H chain) 200 (mol. wt in kDa), phosphorylase B 97.4; bovine serum albumin 69.

On the contrary, a decreased tyrosine kinase activity was observed in the LoVo/24517 extract in comparison with LoVo extract, whereas no change was observed in the same membrane extracts of L1210 cell lines (Figure 4). The addition of FCE 24517 in these assays had no effect (not shown).

Effect of sodium orthovanadate treatment on FCE 24517 cytotoxicity

With the aim of confirming that the regulation of tyrosine phosphorylation was related to resistance to FCE 24517, we tested if the treatment with an inhibitor of the tyrosine phosphatase activity could affect the sensitivity of both sensitive and resistant cell lines to FCE 24517.

As shown in Table I, a 48 h pretreatment with non-toxic doses of sodium orthovanadate (2.7, 5.4 and 10.8 μM for L1210 lines and 12.5 and 17 μM for LoVo lines) was observed to increase the cytotoxic activity of FCE 24517 in a dose-dependent way.

Effect of protein kinase inhibitors treatment on FCE 24517 cytotoxicity

The same treatment reported for sodium orthovanadate has been repeated with different classes of protein kinase inhibitors. On LoVo cell lines, no significant modification of FCE 24517 cytotoxicity has been observed in combination with the tyr-kinase inhibitor genistein and the protein kinase inhibitor staurosporine. The only effect was observed with the tyr-kinase inhibitor quercetin: the ID_{50} value of FCE 24517 in combination with 6.6 nM quercetin was increased by 49% and 41% for LoVo and LoVo/24517 respectively.

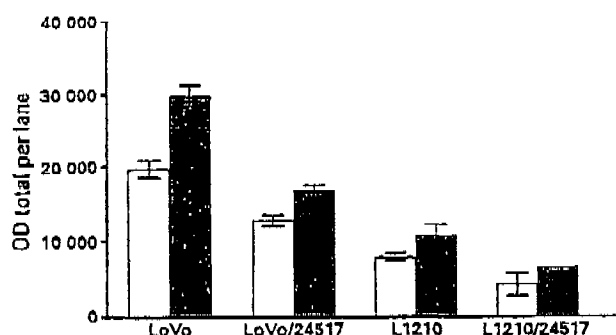


Figure 2 Tyrosine - phosphorylated proteins in total extracts of LoVo, LoVo/24517, L1210 and L1210/24517 cells. Evaluation of the total optical density of the protein lanes by imaging analysis. Open columns, untreated cells, hatched columns, cells treated with 1 mM Na-V (15 min for LoVo cells, 240 min for L1210 cells).

Table 1 Cytotoxicity of FCE 24517 in combination with non-toxic doses of sodium orthovanadate (Na-V)

Treatment	IC_{50} (ng ml^{-1})	
	LoVo ^a	LoVo/24517 ^a
FCE 24517	330 $\pm$ 25	8300 $\pm$ 650
FCE 24517 + Na-V 12.5 μM ^b	104 $\pm$ 8	5200
FCE 24517 + Na-V 17.0 μM ^b	41	3150 $\pm$ 275
	L1210 ^c	L1210/24517 ^c
FCE 24517	169 $\pm$ 26	3368 $\pm$ 127
FCE 24517 + Na-V 2.7 μM ^b	126 $\pm$ 13	2704 $\pm$ 350
FCE 24517 + Na-V 5.4 μM ^b	104 $\pm$ 12	2668 $\pm$ 245
FCE 24517 + Na-V 10.8 μM ^b	97 $\pm$ 11	1091 $\pm$ 215

^aForty-eight hours treatment with Na-V. FCE 24517 was added for the last 4 h. Colony number was counted after 8 days.

^bAll the Na-V doses used in combination with FCE 24517 are non-toxic (survival > 75%).

^cForty-eight hours treatment with Na-V. FCE 24517 was added for the last hour. Cell number was evaluated after 48 h.

Higher doses of quercetin were toxic. On L1210 cell lines, no influence on the cytotoxic activity of FCE 24517 was observed with genistein and herbimycin.

Table II reports the results obtained after pretreatment with non-toxic doses of quercetin and staurosporine. The cytotoxic activity of FCE 24517 was decreased in a dose-dependent way. This effect was more evident on the resistant L1210/24517 cells.

Discussion

Results presented in this paper show that both sublines resistant to the antineoplastic agent FCE 24517 present a congenital modification in the tyrosyl-specific phosphatase and kinase balance: L1210/24517 cells present an increase in the phosphatase activity whereas LoVo/24517 cells present a decrease in the kinase activity. This modification is related to a decrease in tyrosine phosphorylation levels of LoVo/24517 and L1210/24517 protein extracts. Moreover, by using a

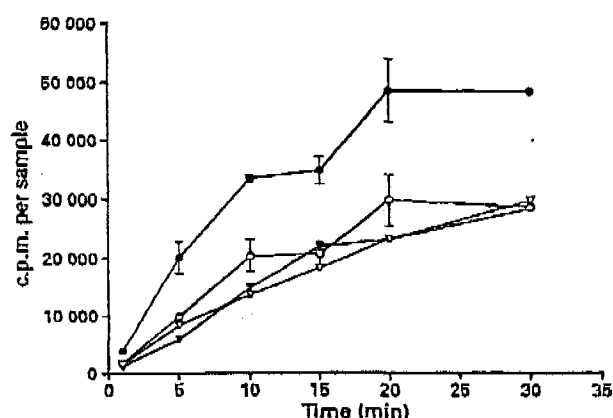


Figure 3 Phosphotyrosyl-specific phosphatase activity in membrane extracts of LoVo, LoVo/24517, L1210 and L1210/24517 cells. Aliquots of 10 ng of membrane proteins (LoVo ∇ ; LoVo/24517 ∇ ; L1210 $\circ$; L1210/24517 $\bullet$) were added to ^{32}P -Tyrosine basic protein and incubated at 30°C. ^{32}P release was determined at different times. Values represent the average of three determinations. Bars, s.e. (when bars are not shown they are smaller than the symbol).

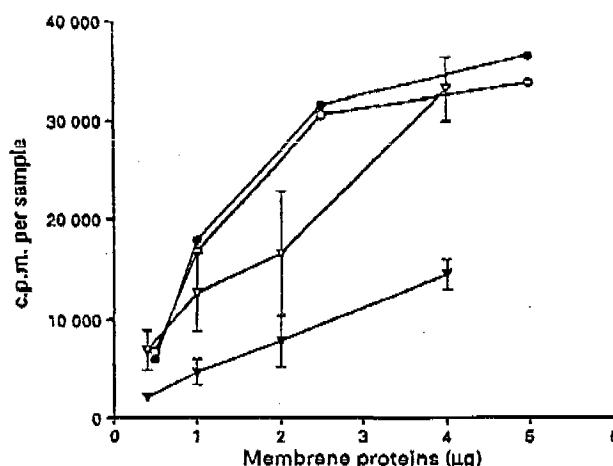


Figure 4 Tyrosine kinase activity in membrane extracts of LoVo, LoVo/24517, L1210 and L1210/24517 cells. Aliquots of membrane proteins (LoVo ∇ ; LoVo/24517 ∇ ; L1210 $\circ$; L1210/24517 $\bullet$) were added to ^{32}P -ATP and myelin basic protein in the presence of 3 mM sodium orthovanadate at 30°C. ^{32}P incorporated in the protein was determined after 30 min. Values represent the average of three determinations. Bars, s.e. (when bars are not shown they are smaller than the symbol).

1442
143

Table II Cytotoxicity of FCE 24517 in combination with non-toxic doses of staurosporine and quercetin

Treatment	<i>I</i> ₅₀ (ng ml ⁻¹)	
	L1210 ^a	L1210/24517 ^b
FCE 24517	209 ± 18	2800 ± 256
FCE 24517 + staurosporine 1.5 nM ^a	463 ± 104	7455 ± 61
FCE 24517 + staurosporine 3.0 nM ^a	481 ± 102	8840 ± 305
FCE 24517 + quercetin 5000 nM ^a	279	3703 ± 48
FCE 24517 + quercetin 10 000 nM ^a	334	7858 ± 303

^aAll the doses of protein kinase inhibitors used in combination with FCE 24517 are non-toxic (survival > 75%).

^bForty-eight hours treatment with protein kinase inhibitors. FCE 24517 was added for the last hour. Cell number was evaluated after 48 h.

phosphatase inhibitor (sodium orthovanadate) in combination with FCE 24517 it is possible to increase the cytotoxic effect of FCE 24517. This effect is evident not only on the resistant cells but also on the sensitive cells: it is not a reversion of the resistance phenotype, but a demonstration of the importance of tyrosine phosphorylation for the mode of action of FCE 24517.

In agreement with this hypothesis, an opposite effect has been observed in combination with two protein kinase inhibitors (quercetin and staurosporine) on L1210 and L1210/24517 cells. This effect was less evident on LoVo cells: a combination of more than one protein kinase inhibitor could be necessary on this model.

The mechanism of resistance selected by treatment with FCE 24517 in L1210 leukaemia and LoVo colon adenocarcinoma cells has not been found correlated to any of the changes frequently involved in the drug resistance.

One of the mechanisms most frequently involved in the cell resistance to cytotoxic drugs is the decrease of drug accumulation, either by decreasing its uptake or by increasing the efflux. In fact many tumour cell lines become resistant to structurally and functionally unrelated compounds with the overexpression of the *mdr-1* gene, coding for a P-gp 170 that acts as a drug efflux pump (Endicott and Ling, 1989; Gottesman, 1993). L1210/24517 cells are MDR1-negative (Geroni *et al.*, 1993) and LoVo/24517 cells present only a 2-fold increase in *mdr-1* gene (Capolongo *et al.*, 1993).

More similar to the L1210/24517 and LoVo/24517 cell lines is a nitrogen mustard-resistant Walker 256 rat breast carcinoma cell line which presents changes in the phosphorylation balance. However in this case a different enzyme is involved: a decreased specific activity of a cAMP-dependent protein kinase influenced a different nuclear matrix protein phosphorylation profile (Moy and Tew, 1986).

Moreover, a decreased phosphorylation of a p66 protein has been described in the membrane of a L1210 cell line resistant to cisplatin (Xuan *et al.*, 1994), which also exhibited a decreased methotrexate uptake.

From the data presented here a balance between tyrosine phosphorylation and dephosphorylation activity seems to be important for the activity of FCE 24517. We have hypothesised that the protein(s) involved in the mode of action of this drug need to be phosphorylated to work.

Experiments to identify the protein(s) involved in the mode of action and, consequently, in the resistance mechanism of FCE 24517 are in progress.

Acknowledgements

We thank Miss Loredana Bertani for secretarial assistance, Mr Giovanni Magistrelli for technical assistance and Dr Antonella Isacchi for useful suggestions and discussions.

References

- ABIGERGES D, ARMAND JP, DA COSTA L, FADEL E, MIGNARD D, LHOMME C, ZURLO MG AND GANDIA D. (1993). Distamycin A derivative, FCE 24517: A Phase I study in solid tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 34, 1589.
- ARCAMONE FM, ANIMATI F, BARBIERI B, CONFIGLIACCHI E, D'ALESSIO R, GERONI C, GIULIANI FC, LAZZARI E, MENOZZI M, MONGELLI N, PENCO S AND VERINI MA. (1989). Synthesis, DNA-binding properties, and antitumor activity of novel distamycin derivatives. *J. Med. Chem.*, 32, 774-778.
- BARBIERI B, GIULIANI FC, PEZZONI G, LAZZARI B, ARCAMONE FM AND MONGELLI N. (1988). In vivo antitumor activity of FCE 24517, a novel distamycin derivative with specificity for A-T-rich sequences of DNA. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 29, 330.
- BROGGINI M, ERBA E, PONTI M, BALLINARI D, GERONI C, SPREAFICO F AND D'INCALCI M. (1991). Selective DNA interaction of the novel distamycin derivative FCE 24517. *Cancer Res.*, 51, 199-204.
- BUTLER MT, ZIEMIECKI A, GRONER B AND FRIS RR. (1989). Characterization of a membrane-associated phosphotyrosyl protein phosphatase from the A431 human epidermoid carcinoma cell line. *Eur. J. Biochem.*, 185, 475-483.
- CAPOLOGO L, MELEGARO G, BROGGINI M, MONGELLI N AND GRANDI M. (1993). Characterization of a LoVo subline resistant to a benzoyl mustard derivative of distamycin A (FCE 24517). *Br. J. Cancer*, 68, 916-919.
- D'ALESSIO R, GERONI C, BIASOLI G, PESENTI E, GRANDI M AND MONGELLI N. (1994). Structure-activity relationship of novel distamycin A derivatives: synthesis and antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 1467-1472.
- ENDICOTT JA AND LING V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 137-171.
- GERONI C, PESENTI E, TAGLIABUE G, BALLINARI D, MONGELLI N, BROGGINI M, ERBA E, D'INCALCI M, SPREAFICO F AND GRANDI M. (1993). Establishment of L1210 leukemia cells resistant to the distamycin-A derivative (FCE 24517): characterization and cross-resistance studies. *Int. J. Cancer*, 53, 308-314.
- GOTTESMAN MM. (1993). How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. *Cancer Res.*, 53, 747-754.
- HAGEBOUITROS A, MCDONNELL T, DE MARIA D, VONHOFF DD, VITEK L, O'DWYER PJ AND WEISS GR. (1994). Phase I trial of FCE 24517 on a three-day bolus schedule. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 35, 1467.
- MOY BC AND TEW KD. (1986). Differences in the nuclear matrix phosphoproteins of a wild-type and nitrogen mustard-resistant rat breast carcinoma cell line. *Cancer Res.*, 46, 4672-4676.
- SESSA C, PAGANI O, ZURLO MG, DE JONG J, HOFMANN C, IASSUS M, MARRARI P, STROLIN BENEDETTI M AND CAVALLI F. (1994). Phase I study of the novel distamycin derivative tullimustine (FCE 24517). *Annals of Oncology*, 6, 901-907.
- STREULI M, KRUEGER NX, THAI T, TANG M AND SAITO H. (1990). Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. *EMBO J.*, 9, 2399-2407.

145 28
144

TAGLIABUE G, PIFFERI A, BALCONI G, MASCELLANI E, GERONI C, D'INCALCI M AND UBEZIO P. (1993). Intracellular glutathione heterogeneity in L1210 murine leukemia sublines made resistant to DNA-interacting anti-neoplastic agents. *Int. J. Cancer*, 54, 435-442.

TOEDIN H, STAEHELIN T AND GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 76, 4350-4353.

TONKS NK, DILTZ CD AND FISCHER EH. (1988). Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, 263, 6731-6737.

XUAN YZ, BHUSHAN A, HACKER MP AND TRITTON TR. (1994). Tyrosine phosphorylation of a membrane protein (P66) may play an important role in methotrexate transport, (II). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 35, 2523.

146
145

IN VITRO CYTOTOXIC ACTIVITY

Exponentially growing cells were seeded and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 24 hours, scalar doses of brostallicin plus the kinase inhibitor were added to the medium and cells were treated for 72 hours. At the end of treatment, cell proliferation was determined by a cellular adenosine triphosphate monitoring system. Cell proliferation was compared to control cells. All tested cell lines were sensitive to brostallicin. For each combination, the cell line most sensitive to the kinase inhibitor was selected: human CML K562 (BCR-ABL positive) for STI571 (Gleevec); human lung cancer NCI-H322M for ZD1839 (Iressa) and human breast cancer MDA-MB-468 for OSI-774 (Tarceva).

The combination indices (C.I.) were calculated using a computer program for multiple drug effect analysis based on the equation of Chou-Talalay (Adv Enzyme Regul 1984;22:27-55) for mutually nonexclusive drugs, where a C.I. of <1 in vitro indicates a more than additive effect.

The results obtained with the drugs as single agents and in combination are shown in tables 1-3.

Table 1: in vitro combination of brostallicin with STI571 on K562 human CML cell line

	IC ₅₀ (μM)	C.I. At 90% of fraction affected
Brostallicin	0.304	
STI571	0.348	
Combination (ratio 1:1)		
Brostallicin	0.218	0.69
STI571	0.218	

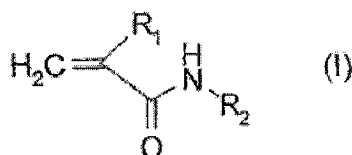
Table 2: in vitro combination of brostallicin with ZD1839 on human lung cancer NCI-H322M human lung cancer cell line

	IC ₅₀ (μM)	C.I. At 90% of fraction affected
Brostallicin	0.249	
ZD1839	0.494	
Combination (ratio 1 : 1.25)		
Brostallicin	0.178	0.62
ZD1839	0.222	

Table 3: in vitro combination of brostallicin with OSI-774 on MDA-MB-468 human breast carcinoma cell line

	IC ₅₀ (μM)	C.I. At 90% of fraction affected
Brostallicin	0.0014	
OSI-774	1.076	
Combination (ratio 1: 250)		
Brostallicin	0.0036	0.67
OSI-774	0.891	

The results show that on human tumor cells brostallicin can be combined effectively with STI571 (Gleevec), ZD1839 (Iressa) or OSI-774 (Tarceva) producing a more than additive (i.e. synergic) effect.



Reivindicaciones 1 a 7: Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acrilóilo distamicina de fórmula (I) y un inhibidor de proteína quinasa junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Reivindicaciones 8 a 13: Productos que comprenden un derivado acrilóilo distamicina de fórmula (I) y un inhibidor de proteína quinasa, como una 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 inhibidor de proteína quinasa.

Se catalogó el objeto de la invención según la IPC en las categorías A61K 31/415 y A61P 35/00.

3. De la solicitud de Patente

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

Las reivindicaciones 1 a 7 no están sustentadas en el capítulo descriptivo por cuanto allí no se menciona ninguna composición farmacéutica que contenga un derivado de acrilóilo distamicina de fórmula (I) y un inhibidor de proteína quinasa junto con un portador farmacéuticamente aceptable, tampoco se encuentra ningún ejemplo en donde se ilustre alguna de ellas.

Los productos de las reivindicaciones 8 a 13 están caracterizados por un uso.

4. Respuesta a los argumentos del solicitante:

El solicitante en su respuesta argumenta que *tal y como se muestra en la publicación científica M. Ciomei et al. British Journal of Cancer 1995, 72:1504-1508 (anexo 1) el efecto sinérgico de los derivados de distamicina con inhibidores de quinasa son impredecibles.*

Al respecto este despacho considera que, si bien el compuesto allí evaluado (tallimustina) no incrementa su actividad citotóxica con inhibidores de proteínas kinasas, si la incrementa con inhibidores de tirosin fosfatasas, lo cual sugiere que combinaciones de compuestos derivados de distamicina con otros inhibidores enzimáticos pueden incrementar su acción farmacológica, llevando al experto en la materia a ensayar combinaciones de estos compuestos citotóxicos.

También argumenta el solicitante que *la evidencia de nivel inventivo para la presente solicitud se puede ver en los datos experimentales in vitro (anexo 2) que muestran los efectos antineoplásicos sinérgicos de la composición farmacéutica de la presente invención.*

Al respecto cabe resaltar, que el estudio *in vitro* (folios 146 y 147) adjuntado por el solicitante no demuestra que los resultados obtenidos son resultado de la administración de una composición farmacéutica con los dos principios activos y no de la administración de cada uno de ellos por separado.

De la misma manera, es importante destacar que el problema técnico planteado de la actual solicitud está directamente relacionado con proporcionar una composición farmacéutica que contiene un derivado de acrilóil distamicina y un inhibidor de proteínas quinasas 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 es un kit de partes de los activos en mención como preparaciones combinadas, entendiéndose estas como preparaciones de cada activo por separado administradas conjuntamente.

Dados los argumentos anteriores, es claro que la presente invención, aunque reivindica composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de acrilóil distamicina y un inhibidor de proteínas quinasas, el capítulo descriptivo no las sustenta como tal sino que se refiere a preparaciones combinadas de cada activo administradas al mismo tiempo, 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 CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha _____

CONCEPTO TECNICO No. 2988	EXAMINADOR TECNICO Código No. 202077
---------------------------	---