

34 75

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 04-098266-00004-0000 Fec: 2005-05-05 10:24:40
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tiz: 11 PATENTEYII Eje 379 FASENACIONALI
Act 538 PETICION Folio: 7

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Ref: Expediente No. 04.098.266

Solicitud de patente de invención titulada:

"TERAPIA COMBINADA CONTRA TUMORES QUE COMPRENDE DERIVADOS DE DISTAMICINA ACRILOILO SUSTITUIDOS Y RADIOTERAPIA".

Solicitante: PHARMACIA ITALIA S.P.A.

SOLICITUD DE EXAMEN DE PATENTABILIDAD SEGÚN
EL ARTICULO 44 DE LA DECISION 486, GACETA No. 562

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado del solicitante, según consta en el nuevo poder presentado ante ese Despacho el pasado 20 de Abril de 2005, adjunto copia del memorial para su *inmediata referencia, respetuosamente me permito solicitar, que se examine si la invención reúne los requisitos de patentabilidad previstos en la misma. Dando cumplimiento a lo establecido en el articulo 44 de la Decisión 486 de la comisión de la Comunidad Andina de Naciones. Adjunto recibo por el monto de \$194.000 pesos para cubrir la tasa correspondiente, según la Resolución 35582 del año 2005.*

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295
Anexo: Recibo por \$194.000 pesos

JAN 2004/001153 000514

AVISO DE NOTIFICACION
CORREO CERTIFICADO**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

Radicación : 4-98266- -8-0 Fecha: 2008-05-30 09:51:27
Trámite : 11 PATENTEII
Evento : 379 FASENACIONALII
Actuación : 432 COMUNICACTOADM
Destinatario : CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA Folios 1

Señor (a) (es)
CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA
CALLE 100 NO. 8A-37 TORRE A P.10, WORLD TRADE CENTER
BOGOTA D.C.

Referencia RESOLUCION : 17299
Fecha : 29/05/2008
Expediente : 4-98266
Trámite : 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
Evento : 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II
Actuación : 432 COMUNICACION ACTO ADMINISTRATIVO

Comedidamente le solicito presentarse a este Despacho ubicado en la Carrera 13 No. 27 - 00 Piso Quinto (5), de la ciudad de Bogotá D.C., dentro del término de cinco (5) días hábiles contados a partir del envío de la presente citación, en horario de 8:00 a.m. a 4:30 p.m. jornada continua, con el fin de notificarle personalmente el contenido de la resolución de la referencia proferida dentro del expediente tramitado con el número de radicación citado en el asunto.

De no hacerse presente en el término indicado anteriormente, la providencia en mención se notificará por edicto, el cual se fijará por el término de diez (10) días en el Centro de Documentación e Información.

Para su comodidad el texto completo de la resolución se encontrará disponible en la página web de la Entidad desde el día hábil siguiente al de su notificación, la cual podrá ser consultada desde un computador con acceso a Internet, en la página www.sic.gov.co, con el número de resolución a través de la opción servicios en línea - caracter general - consulta actos administrativos.

Secretaría General
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Al contestar favor Indique el número de
radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Cra 50 No. 26-55 Int 2 PBX: 3820840
Fax: 3 82 26 95 3 50 52 20. Línea 018000 910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

275
276

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 04-098255-00004-0000 Fec: 2006-05-05 18:24:10
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYU Ene 379 FASENACIONALU
Act 538 PETICION Folios: 7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 33,231
FECHA : MAYO 4 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISDEBR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45832340	04/05/2006	4,643,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD	194,000.00
	TOTAL :	\$ 194,000.00

SON: CIENTO NOVENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

27
28



TRADUCCION OFICIAL No. 04-398

Efectuada el día 30 de noviembre de 2004, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 del 11 de febrero de 2002 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia.

Traducción Oficial de las autenticaciones notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PHARMACIA ITALIA S.P.A. a Carlos R. Olarte, y/o James Ian Raisback y/o Ana Maria Priieri, documento este que viene en español y se explica por sí solo.

(Edo.) Grover F. Fuller Jr, Apoderado Autorizado, 5 de octubre de 2004.

EL SUSCRITO KENNETH GREENWOOD, Notario Público de Egham, Surrey, debidamente admitido y juramentado por ejercer en Egham, Surrey.

POR EL PRESENTE CERTIFICA Y ATESTIGUA:

Que las firmas de documento anexo son auténticas.

EN FE DE LO CUAL firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial en Town of Egham a los 13 días del mes de noviembre de 2004.


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 00.121773
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No. 0138 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA / 1991 DE 2000

78
S 79



APOSTILLA

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

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte.

El presente documento público

2. Fue firmado por Kenneth Greenwood

3. Que actuó en su calidad de Notario Público

4. Lleva el sello del mencionado Notario Público

Se certificó

5. En Londres 6. El 2 de noviembre de 2004

7. Por parte del Principal Secretario de Estado de Su
Majestad para Asuntos Extranjeros y de la Mancomunidad.

8. Bajo el Número G547093

9. Sello de la Oficina de Asuntos Extranjeros y de la
Mancomunidad

10. Firmado por J. Johnson, Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa efectuada por:

S. Rueda

Sergio Andrés Rueda Iglesias
C.C. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR PÚBLICO OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - FRANCÉS - PORTUGUÉS
RESOLUCIÓN 112002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO



79 Ego

Notary Public • Commissioners for Oaths • Notaries Public

Kenneth Greenwood - Notary Public

Nicholas D. Jamison - Notary Public

47A HIGH STREET
EGHAM • SURREY

TVV20 9ES

Telephone - 01784 432292

Conveyancer
Francois Botha

FAX No. 01784-431864 DX 53100 Egham

Our Ref

Your Ref

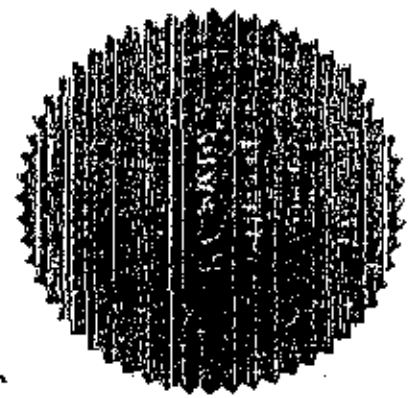
Date

I, KENNETH GREENWOOD, Notary Public of the Town of Egham in Surrey,
duly admitted and sworn, practising in the said Town,

DO HEREBY CERTIFY AND ATTEST:

THAT the signatures set and subscribed at the foot of the hereunto annexed
document are genuine.

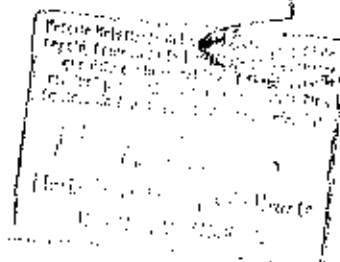
IN TESTIMONY WHEREOF I have hereunto set my hand and affixed my Seal
of Office in the Town of Egham aforesaid, this *1st* day of *November* Two
Thousand and Four



NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION IS PERMANENT

[Handwritten signature]

P62)



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **K Greenwood**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/status of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/statut de

5. at London/à Londres
6. the/le **02 November 2004**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G547093**

9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **J. Johnson**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented in the original language of the document.



28
781

PC27270/700156
CO-2

POWER OF ATTORNEY

PODER

The undersigned, **PHARMACIA ITALIA S.P.A.**,
a corporation organized under the laws of
Italy
located in
Via Robert Koch 1.2, I-20152 Milan, Italy

La abajo firmada
PHARMACIA ITALIA S.P.A.
domicilada en
Via Robert Koch 1.2, I-20152 Milan,
Italia.

declares that it hereby grants to

CARLOS R. OLARTE,
J. IAN RAISBECK y
ANA MARIA FRIERI

a full and sufficient power of attorney to apply to
the proper national officers and authorities for the
issue of: Patents, Utility Models and
Industrial Designs

declara por el presente otorgar a

CARLOS R. OLARTE,
J. IAN RAISBECK y
ANA MARIA FRIERI

poder especial amplio y bastante para recibir de las
oficinas y autoridades nacionales que correspondan,
la obtención de: Patentes, Modelos de
Utilidad y Diseños Industriales

to which end it empowers them to take all steps
necessary before said authorities for the objects
stated, to file petitions, prepare descriptions, make
protests, declarations, appeals and objections, pay
imposts, apply for certifications, receive documents
and securities, abandon applications and collect
refunds. To the said mandatories sufficient power
is granted hereby to receive notifications for and on
behalf of the Company, to confer powers on those
who are to represent the company judicially and
extrajudicially, to answer in court in the matter of
all claims and demands that may be presented in
connection with the marks, and to do everything
that may be required, before administrative or
judicial officers of any class giving them likewise
power to substitute these presents and revoke such
substitutions if necessary.

a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas
autoridades, todos los pasos necesarios al objeto
indicado, elevar solicitudes, formular descripciones,
protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos,
oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir
documentos y valores, desistir y percibir. Se
concede a los expresados mandatarios poder
bastante para recibir notificaciones a nombre de la
compañía, otorgar poderes a quienes vayan a
representar a la compañía judicial y
extrajudicialmente, responder en juicio a todas las
reclamaciones o demandas que por motivo de las
marcas se presentaren y hacer cuanto fuere
necesario, ante las autoridades administrativas o
judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo
facultad para sustituir el presente y en caso
necesario revocar dichas sustituciones.

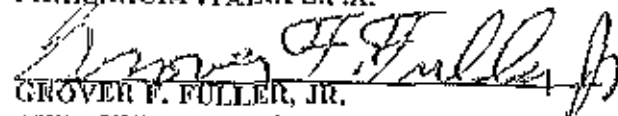
Done and subscribed in New York, New York,
USA

Dado y firmado en New York, New York, USA

Dated 05 October 2004

a los 5 días de Octubre de 2004

PHARMACIA ITALIA S.P.A.


GROVER F. FULLER, JR.
AUTHORIZED ATTORNEY

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No 04-098266

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**

FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **562** DE

FECHA **31 DE MARZO DE 2006** EL TERMINO HABIL ENALADO POR LA LEY

EXPIRA EL **05 DE JULIO DEL 2006**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI ☐

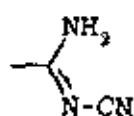
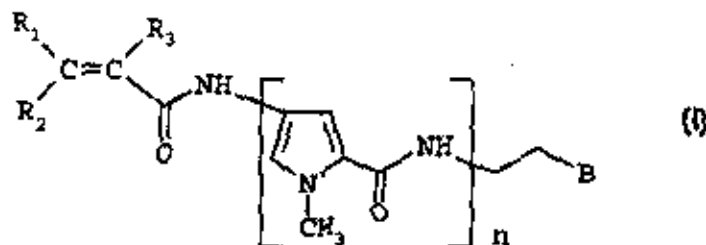
NO ☒



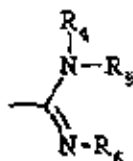
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 207/34, A61K 31/40	A1	(11) International Publication Number: WO 98/04524 (43) International Publication Date: 5 February 1998 (05.02.98)
(21) International Application Number: PCT/EP97/03719 (22) International Filing Date: 10 July 1997 (10.07.97) (30) Priority Data: 9615692.2 25 July 1996 (25.07.96) GB (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA & UPIOHN S.P.A. [IT/IT]; Via Robert Koch, 1.2, I-20152 Milan (IT). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): COZZI, Paolo [IT/IT]; Via Zancella, 48/5, I-20133 Milan (IT). BERIA, Italo [IT/IT]; Via G. Matteotti, 39, I-45030 Villamartana (IT). BIASOLI, Giovanni [IT/IT]; Via Scafardini, 31, I-21026 Gavirate (IT). CALDARELLI, Marina [IT/IT]; Via Besençanica, 9, I-20147 Milan (IT). CAPOLONGO, Laura [IT/IT]; Via P. Rembrandt, 11, I-20147 Milan (IT). FRANZETTI, Cristina [IT/IT]; Via De Gasperi, 4, I-21023 Besozzo (IT).	(81) Designated States: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, SG, SI, TR, UA, US. Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.	

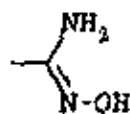
(54) Title: **ACRYLOYL SUBSTITUTED DISTAMYCIN DERIVATIVES, PROCESS FOR PREPARING THEM, AND THEIR USE AS ANTITUMOR AND ANTIVIRAL AGENTS**



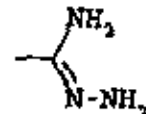
(1)



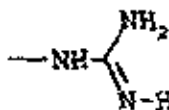
(2)



(3)



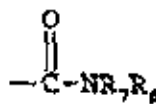
(4)



(5)



(6)



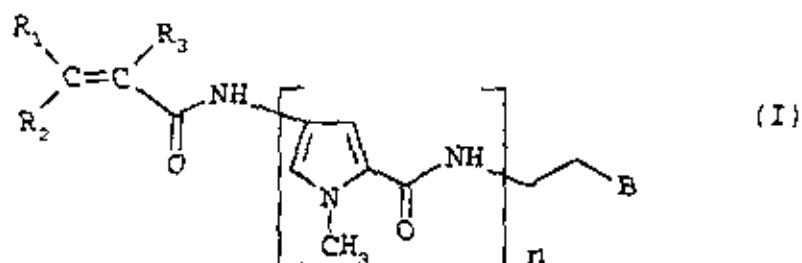
(7)

(57) Abstract

Acryloyl substituted distamycin derivatives of formula (I) wherein n is 2, 3, or 4; R₁ and R₂ are selected, each independently, from: hydrogen, halogen, and C₁-C₄ alkyl; R₃ is hydrogen or halogen; B is selected from: (1), (2), (3), (4), (5), (6) and (7); wherein R₄, R₅, R₆, R₇, and R₈ are, each independently, hydrogen or C₁-C₄ alkyl, with the proviso that at least one of R₄, R₅ and R₆ is C₁-C₄ alkyl; and pharmaceutically acceptable salts thereof. Such compounds are useful as antineoplastic and antiviral agents.

CLAIMS

1. An acryloyl substituted distamycin derivative of formula:



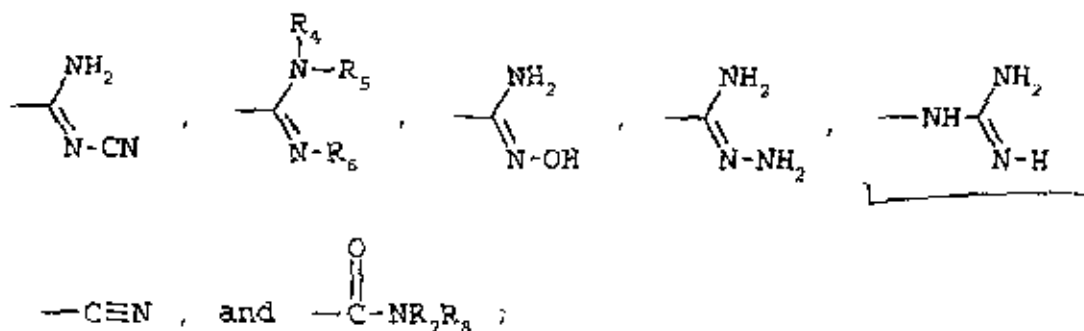
wherein:

* n is 2, 3 or 4;

→ R₁ and R₂ are selected, each independently, from: hydrogen,
halogen, and C₁-C₆ alkyl;

10 $\rightarrow R_3$ is hydrogen or halogen;

B is selected from:



wherein R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , and R_8 are, each independently, hydrogen or C_1 - C_4 alkyl, with the proviso that at least one of R_4 , R_5 and R_6 is C_1 - C_4 alkyl;
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound as defined in claim 1, wherein:

n is 3 or 4;

20 R_1 and R_2 are hydrogen;

R₃ is chlorine or bromine;

B is selected from:

compound of formula (I) into a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5 5. A compound as defined in any one of claims 1 to 3, for use in a method of treating the human or animal body by therapy.

6. A compound as claimed in claim 5 for use as an antineoplastic agent.

10

7. A compound as claimed in claim 5 for use as an antiviral agent.

15 8. Use of a compound as defined in any one of claims 1 to 3, in the manufacture of a medicament for use in the treatment of cancer.

9. Use of a compound as defined in any one of claims 1 to 3, in the manufacture of a medicament for use in the
20 treatment of viral infection.

10. A pharmaceutical composition, which comprises an effective amount of a compound as defined in any one of claims 1 to 3 as an active principle, in association with
25 one or more pharmaceutically acceptable carriers and/or diluents.

A new class of cytotoxic DNA minor groove binders: α -halogenoacrylic derivatives of pyrrolocarbamoyl oligomers

Paolo Cozzi

Pharmacia, Department of Chemistry, Discovery Research Oncology, Viale Pasteur 10, 20014 Nerlon, Milan, Italy

Abstract

DNA minor groove binders represent a class of cytotoxic antitumor agents whose DNA sequence specificity may lead to a high selectivity of action. Tallimustine, benzoyl nitrogen mustard derivative of distamycin A, showed excellent antitumor activity in preclinical tests but also a severe myelotoxicity. Novel nitrogen mustard derivatives of distamycin showing improved activity profile were recently identified. In particular, cinnamic nitrogen mustard and cinnamic ethyl half-mustard analogs of tallimustine showed increased potency and more favorable cytotoxicity/myelotoxicity ratio. However a series of α -halogenoacrylamide derivatives of distamycin-like frames showed an activity profile substantially improved in comparison to tallimustine. In particular PNU-166196, α -bromo-acrylamido derivative of four pyrrole distamycin-like frame ending with a guanidino moiety, showed high cytotoxic potency even on tumor cell lines resistant to alkylating agents and camptothecin, broad antitumor activity and myelotoxicity dramatically reduced in comparison to tallimustine. This compound was found to bind to minor groove TA-rich sequences but appeared unreactive in classical *in vitro* DNA alkylation assays. With respect to the apparent lack of DNA alkylation we speculated that an intracellular reactive nucleophilic species, e.g. glutathione (GSH), could activate the reactivity of the compound leading to alkylation of DNA *in vivo*. Recent evidence of both covalent interaction of PNU-166196 with plasmidic DNA in the presence of GSH and of enhanced cytotoxicity in tumor cells characterized by high levels of GSH were obtained. PNU-166196, in view of its excellent activity profile and its outstanding favorable cytotoxicity/myelotoxicity ratio, was selected for clinical development and is undergoing phase I studies. © 2001 Elsevier Science S.A. All rights reserved.

Keywords: Minor groove binders; Distamycin; Tallimustine; α -Halogenoacrylamides; Glutathione

1. Introduction

The putative mode of action of many antitumor agents involves DNA damage, either by direct binding of the drug to DNA or to DNA-binding proteins. However, most of the DNA-interacting agents have only a limited degree of sequence specificity, which implies that they may hit all the cellular genes.

DNA minor groove binders, among which the derivatives of distamycin A (DST) play an important role, could provide a significant improvement in cancer management increasing gene specificity, due to high selectivity of interaction with thymine-adenine (TA) rich sequences [1].

DST, an antibiotic characterized by an oligopeptidic pyrrolic frame ending with an amidino moiety [2], Fig.

1, binds reversibly to DNA minor groove with high selectivity for TA-rich sequences containing at least four TA base pairs [3]. Due to the high selectivity of DNA interaction, DST was used in the recent past as a DNA sequence-selective vector of alkylating functions. In particular, tallimustine (TAM) [4], Fig. 1, a benzoic acid nitrogen mustard (BAM) derivative of DST, that binds selectively to DNA as DST does [5,6], shows excellent cytotoxic and antitumor activity [4].

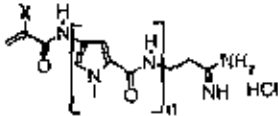
TAM was the first and until very recently the sole DST-derived cytotoxic that was clinically developed. However TAM showed severe myelotoxicity [7] that probably impaired the attainment of effective therapeutic doses [8,9] and its phase II clinical development was discontinued.

Nevertheless TAM has represented an important model for the design of new cytotoxics in which a moiety of mild chemical reactivity, such as the BAM moiety in the case of TAM, is tethered to a DNA binding-frame derived from DST.

E-mail address: paolo.cozzi@eu.pnu.com (P. Cozzi).

Table 2

The effect of the length of distamycin-like frame on *in vitro* and *in vivo* activity (L1210 leukemia) * [30]

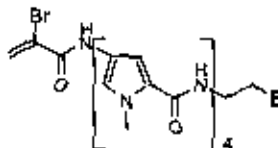


X	N	In vitro IC ₅₀ nM	In vivo	
			OD mg/kg	T/C %
Br	5	23.0 ± 5.0	0.78	167
Br	4	6.3 ± 1.3	1.56	200
Br	3	98.8 ± 24.2	12.5	100
Br	2	> 1300	nd	nd
Br	1	> 13000	nd	nd
Cl	4	7.8 ± 1.4	1.56	133
Cl	3	96.8 ± 24.2	12.5	117

* IC₅₀ = 50% inhibitory concentration as the mean ± SE from dose-response curves of at least two experiments; drug sensitivity determined after 4 h of continuous exposure against L1210 cells; after 48 h for other compounds; for *in vivo* studies cells were injected i.v. and mice were treated i.v. the day after tumor injection; OD optimal (non-toxic) dose < LD₅₀; T/C median survival time of treated versus untreated mice × 100.

Table 3

In vitro and *in vivo* activity (L1210 leukemia) of α-bromoacrylic distamycin-like derivatives modified at the amidino moiety* [30]



B	In vitro IC ₅₀ nM	In vivo	
		OD	T/C %
C(NH)(NH ₂)HCl	6.3 ± 1.3	1.56	200
C(NCH ₃)(NH ₂)HCl	2.6 ± 0.7	3.13	150
C(NCH ₃)(NCH ₃)HCl	1.8 ± 0.1	1.56	258
C(NHN(CH ₃) ₂)HCl	1.4 ± 0.8	nd	nd
imidazolin-2-yl-HCl	2.4 ± 0.5	nd	nd
C(NH)(NH ₂)HCl	1.8 ± 0.1	1.56	196
C(OH)(NH ₂)HCl	8.5 ± 1.5	6.25	186
C(NH)(NH ₂)HCl	4.1 ± 0.2	3.13	157
C(NH)(NH ₂)HCl	9.0 ± 0.4	6.25	169
C(NH)(NH ₂)HCl	18.1 ± 2.2	12.5	157

* IC₅₀ = 50% inhibitory concentration as the mean ± SE from dose-response curves of at least two experiments; drug sensitivity determined after 48 h of continuous exposure against L1210 cells; for *in vivo* studies cells were injected i.v. and mice were treated i.v. the day after tumor injection; OD optimal (non-toxic) dose < LD₅₀; T/C median survival time of treated versus untreated mice × 100.

reaction of the no longer vinylic bromide, leading to alkylation of DNA nucleophilic functions. Thus PNU-166196 might alkylate DNA only in the presence

of GSH, which is the most abundant intracellular thiol, present in the millimolar range in mammalian cells [39].

In order to verify the hypothesized role of GSH, experiments of interaction of PNU-166196 and parent PNU-151807 with plasmidic DNA were performed, in the presence or in the absence of GSH. Agarose gel electrophoresis showed that both compounds induced the change of plasmid DNA, from the supercoiled form to the circular form (nicking), only in the presence of GSH, while in the absence no change occurred in the plasmid topology, at variance with TAM. The inactive fluoroacrylic analog of PNU-166196 was unable to relax plasmidic supercoiled DNA in the presence of GSH, Fig. 11.

Moreover the role of GSH on the cytotoxicity of PNU-166196 was investigated by testing the compound against tumor cells characterized by high levels of GSH, such as melphalan (L-PAM) resistant leukemia tumor cells (L1210/L-PAM), which present a three fold increase of GSH in comparison to wild L1210 cells. The cytotoxicity of PNU-166196 and parent PNU-151807 against L1210/L-PAM cells showed a three fold increase in comparison to wild L1210 cells, while the cytotoxicity of TAM was comparable on the two cell lines, Table 5.

The role of GSH on PNU-166196 cytotoxicity was investigated also by inhibiting GSH formation with buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of γ-glutamylcysteine synthase. BSO was able to decrease significantly both cytotoxic and apoptotic effects of

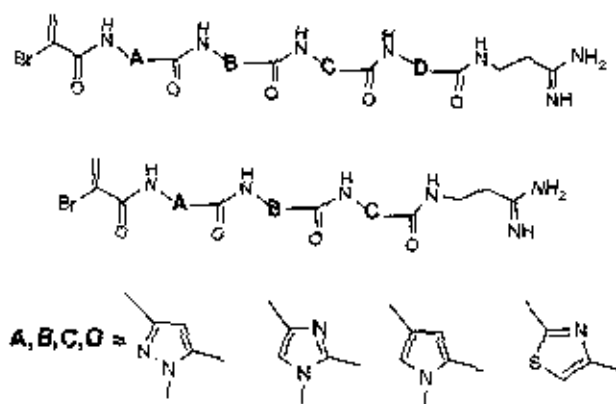


Fig. 9. Representative examples of isosteric α-bromoacrylic analogs.

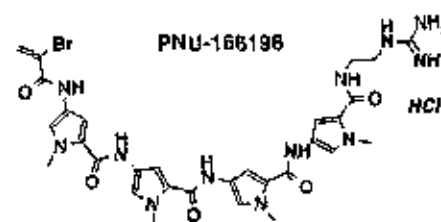


Fig. 10. PNU-166196 is undergoing phase I studies.

Table 4

PNU-166196 cytotoxicity/myelotoxicity ratio. The *in vitro* myelotoxicity of PNU-166196 is radically reduced compared to other minor groove binders, in particular for human hematopoietic progenitor cells

Comp.	Myelotoxicity human CFU-GM ^a IC ₅₀ ng/ml	Cytotoxicity tumor cells ^b IC ₅₀ ng/ml	In vitro cytotoxicity/myelotoxicity ratio
PNU-166196	2377	29.3	81.1
Tallimustine	290	330	0.9
Carzolesin	0.15	0.04	3.7
Bizelesin	0.18	0.17	1
Adozolesin	0.17	0.04	4.2

^a Human colony-forming units, granulocytes-monocytes hematopoietic progenitor cells.

^b Mean IC₅₀ values of ten tumor cell lines.

PNU-166196: no relaxation
PNU-151807: no relaxation

Tallimustine: relaxation
Distamycin: no relaxation

PNU-166196 + GSH: relaxation
PNU-151807 + GSH: relaxation

α -fluoroacrylic analog of PNU-166196 + GSH: no relaxation

Fig. 11. PNU-166196 interaction with plasmidic DNA (agarose gel electrophoresis after incubation with plasmid containing sequences T4GA). Relaxation of the plasmidic DNA from the supercoiled form to the circular form.

Table 5

Cytotoxicity of PNU-166196, PNU-151807 and tallimustine versus L1210 and L1210/L-PAM leukemia cells; L1210/L-PAM murine leukemia cells present a three-fold increase of GSH levels

Comp.	IC ₅₀ ng/ml (48 h treatment)	
	L1210	L1210/L-PAM

C	0.49	
NR		
CA		
CN		
CON		
CN		
IC ₅₀		
dose		
determ		
in vivo		
day after		
medium		
further		
ing to		
PNU		

PNU-166196 on A2780 human cells (Table 6). These findings suggest that GSH is involved in the mechanism of PNU-166196 DNA interaction and cytotoxicity, with a potential value in cancer treatment.

In fact high levels of GSH and of glutathione S-transferases (GSTs), the enzymes which catalyze the nucleophilic GSH reactivity [40], have been reported to play a role in the resistance of tumor cells to different anticancer drugs, such as classical mustards and *cis*-platinum [41,42]. Moreover there is evidence that a number of human tumors display increased levels of GSH and GST π isozyme with respect to normal tissues [43].

Table 6

Cytotoxicity and apoptotic effect of PNU-166196 on A2780 cells and A2780 cells pretreated with BSO

Treatment	Dose	Growth inhibition (%)	Apoptosis (%)
PNU-166196	1 μ g/ml	50	65
	3 μ g/ml	71	71
PNU-166196 + BSO 0.1 mM	1 μ g/ml	22	8
	3 μ g/ml	31	17
BSO	0.1 mM	5	0

4. Conclusions

In conclusion these studies led to the identification of a new class of cytotoxic minor groove binders, α -bromoacrylamido distamycin derivatives, endowed with potent antitumor activity and reduced myelotoxicity. Compounds of this class interact with TA-rich sequences of DNA, but at variance with TAM or CC-1065-derived agents, appear unreactive in classical *in vitro* DNA alkylation assays. However there is evidence that these compounds may be activated *in vivo* by GSH, leading to irreversible DNA interaction.

PNU-166196 shows potent antitumor activity and very favorable cytotoxicity/myelotoxicity ratio and, due to its interaction with GSH, may be hypothesized to have a specific role for the treatment of tumors characterized by constitutive or therapy-induced overexpression of GSH-GST levels.

Acknowledgements

The contribution of Italo Beria, Marina Caldarelli and Nicola Mongelli (Pharmacia, Department of Chemistry), Cristina Geroni (Pharmacia, Department of External Research), PierGiovanni Baraldi, Romeo Romagnoli (Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Ferrara), Enzo Ragg, Stefania Mazzini (D.I.S.M.A. Faculty of Agriculture, University of Milan) is gratefully acknowledged.

88 89

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020

Bogotá, D.C., 8 de enero de 2008

Abogado

CARLOS R. OLARTE

ASUNTO

Radicación 04-98266

Trámite 002

Evento 001

Actuación 430

Oficio

Folios 10 874

Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Vía Nacional



Vía PCT (fase nacional)



Cap. I



Cap. II



No. Sol. Internacional

PCT/EP03/03192

Fecha de Presentación Internat.

17-03-2003

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: 22 a 37 (como se radicó inicialmente)

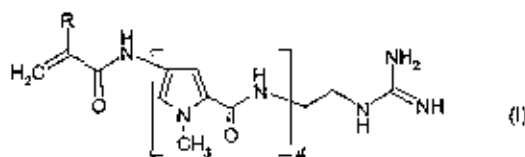
1.2. Reivindicaciones: Folios 38 a 43 (como se radicó inicialmente)

1.3. Prioridad: Folios: 1
Fecha: 02-04-2002; país y número: EP02076240.7

2. Objeto de la Invención

Título de la solicitud: "TERAPIA COMBINADA CONTRA TUMORES QUE COMPRENDE DERIVADOS DE DISTAMICINA ACRILOILO SUSTITUIDOS Y RADIOTERAPIA".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en:



Reivindicaciones 1-5: Uso de un derivado de distamicina α -bromo o α -cloro-acriloilo.

Reivindicaciones 6-15: Un método para tratar un mamífero.

Reivindicaciones 16-17: Una composición farmacéutica que contiene un derivado de la fórmula (I).

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de una terapia antitumor con un efecto supra-aditivo.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición que contiene un derivado de distamicina acrílico sustituida, más particularmente un derivado de distamicina α -bromo o α -cloro-acriloilo con radioterapia.

La invención se catalogó según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC.) como: A61K 31/40.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

La reivindicación 16 caracteriza una composición farmacéutica por su uso como un radiosensibilizador. Una composición debe caracterizarse por los compuestos o activos novedosos y las proporciones de los mismos dentro de la formulación. Por lo anterior esta reivindicación no cumple con los requisitos de del presente artículo.

4. Excepción a la patentabilidad (artículo 20 D486 literal d)

Las reivindicaciones 6 a 15 divulgan un método para tratar un mamífero, que incluye humanos que consiste en administrar un derivado de distamicina α -bromo o α -cloro-acriloilo en combinación con radioterapia para producir un efecto antineoplásico sinérgico. Los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal no son patentables.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (artículos 14 y 21 D 486)

Las reivindicaciones 1 a 5 pretenden proteger el uso de un derivado de distamicina α -bromo o α -cloro-acriloilo en la preparación de un medicamento que tiene actividad de radiosensibilización. Solo son objeto de patente las invenciones que sean de producto o de procedimiento, por lo tanto estas reivindicaciones no son patentables.

6. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 02-04-2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	WO98/04524	ACRYLOYL SUBSTITUTED DISTAMYCIN DERIVATIVES, PORCESS FOR PREPARING THEM, AND THEIR USE AS ANTITUMOR AND ANTIVIRAL AGENTS	05-02-1998
D2	IL FARMACO vol.56 (2001) 57-65	A NEW CLASS OF CYTOTOXIC DNA MINOR GROOVE BINDERS α -HALOGENOACRYLIC DERIVATIVES OF PYRROLECARGAMOYL OLIGOMERS	01-03-2001

7.1 Novedad (artículo 16 D486)

La reivindicación 16 establece una composición farmacéutica que comprende un derivado de distamicina α -bromo o α -cloro-acrilóilo de la fórmula (I). El documento D1 enseña derivados de distamicina α -bromo o α -cloro-acrilóilo entre los cuales se encuentran los compuestos derivados de la fórmula (I) de la presente solicitud (folios: 82 y 83), igualmente el documento D1 menciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I) en asociación con uno o mas vehículos farmacéuticamente aceptables; el documento D2 estudia derivados de distamicina α -halogenoacrilamido que poseen mejor actividad como agentes citotóxicos antitumorales que la talimustina (folio 85), D2 estudia la actividad de PNU 166196 el cual es uno de los derivados de esta solicitud, para lo cual utiliza una composición i.v que contiene este compuesto para su estudio in vivo la cual fue inyectada a ratones (folio 86). Por lo anterior la composición de la reivindicación 16 y la de la reivindicación dependiente 17 no es nueva.

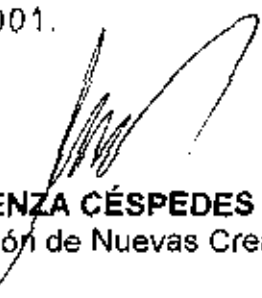
8. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento Nº	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO98/04524	16-17	Novedad
D2	IL FARMACO 56 (2001) 57-65	16-17	Novedad

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 Nº 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
25 ENE. 2008

CONCEPTO TÉCNICO No. 2787	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202073
-------------------------------------	--

VP 005