

Q.F.



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATE NTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

05-98900

TITULO: FORMAS DE DOSIFICACIÓN Y PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO
QUE USAN INHIBIDORES DEL VEGFR

SOLICITANTE: PFIZER INC.

A61K 31/337

DIRECCIÓN 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, E.U.A.

APODERADO CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Septiembre 29 de 2005

✓

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 60088-000 00000000 Folios: 103
Fecha (AMD): 2005-07-29 16:50:00
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

03-Nov-05

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER INC

Dirección: 235 East 42nd Street, New York, NY
10017 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

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

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: (1) JAMES LAWRENCE FREDDO, (2) DANA HU-LOWE, (3) YAZDI
KERSI PITHAVALA, (4) HEIDI MARIE STEINFELDT

Dirección: La Jolla Laboratorios, 10777 Science Center Drive, San Diego,
California 92121, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: (1, 3) Estadounidense (2) China (3) India

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/000867

Fecha Marzo 17, 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/087152

Fecha Octubre 14, 2004

6

Título (54) FORMAS DE DOSIFICACION Y PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO
QUE USAN INHIBIDORES DEL VEGFR

Clasificación Internacional (51) A61K 31/4439, 31/337, A61P 35/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Abril 3, 2003

Julio 31, 2003

(31) Número de Solicitud

60/460,695

60/491,771

9

Comprobante de pago No. 74,862

Fecha Septiembre 28, 2005

10

ANEXOS☒

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

☐

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

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

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

☐

Declaraciones.

☒

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

☒

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

☒

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

☒

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☐

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

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 75.782.747 Btá T.P. 74.295

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

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 85638966 00000000 Folios: 184
Fecha (AMD): 2005-09-29 16:50:08
Tramite : 011 PCI-PATENT / 379 FASE NAL 411 PRESENIAL
Dependencia: 200 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 74,862
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2005

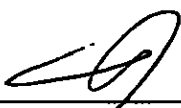
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36765273	27/09/2005	2,782,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
PFIZER INC.**

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman
Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

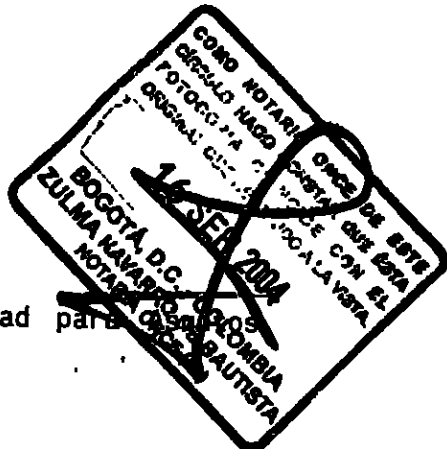
1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADÓ

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

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

Signature/Firma: _____

Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad,País: New York, USA

El suscrito,
Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

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

Poder



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

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

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*
J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in *New York, USA*
New York
signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Patent Counsel of Pfizer Inc.
3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
- 4 That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.
5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de
4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.
4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.
5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

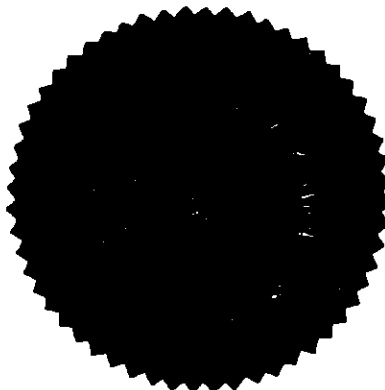
EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey

This *14th*

Day Of *July*

2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN

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
a été signé par K Greenwood

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

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

- 5 at London/à Londres

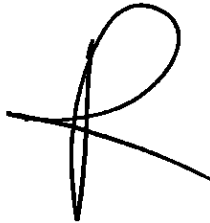
Certified/Atteste
6 the/le 17 July 2003

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** **G210434**

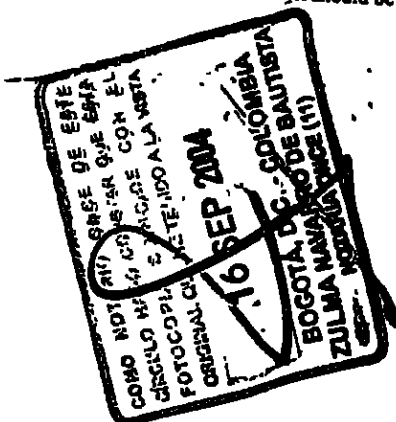
- 9 Stamp
timbre**

10. Signature **R. Bawden**



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 to the consular section of the mission representing that country.



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) International Publication Date
14 October 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/087152 A1

(51) International Patent Classification?: A61K 31/4439
31/337, A61P 35/00

(74) Agents: LUMB, J., Trevor et al., c/o WOOD, David, J.,
Pfizer Research and Development, Ramsgate Road, Sand-
wich, Kent CT13 9NJ (GB).

(21) International Application Number:
PCT/IB2004/000867

(22) International Filing Date: 17 March 2004 (17 03 2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/460,695 3 April 2003 (03.04 2003) US
60/491,771 31 July 2003 (31 07 2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
INC. [US/US], 235 East 42nd Street, New York, NY 10017
(US)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FREDDO, James,
Lawrence [US/US], Pfizer Global Research and Develop-
ment, La Jolla Laboratories, 10777, Science Center Drive,
San Diego, CA 92121 (US) HU-LOWE, Dana [CN/US],
Pfizer Global Research and Development, La Jolla Labora-
tories, 10777, Science Center Drive, San Diego, CA 92121
(US) PITHAVALA, Yazdi, Kersi [IN/US], Pfizer Global
Research and Development, La Jolla Laboratories, 10777,
Science Center Drive, San Diego, CA 92121 (US) STEIN-
FELDT, Heidi, Marie [US/US] Pfizer Global Research
and Development, La Jolla Laboratories, 10777, Science
Center Drive, San Diego, CA 92121 (US)

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

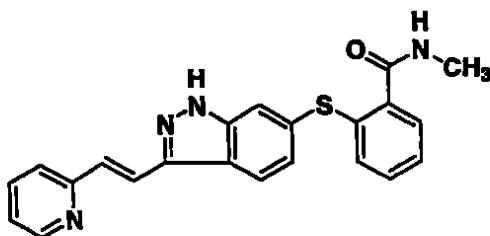
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: DOSAGE FORMS COMPRISING AG013736



(1)

(57) Abstract: The invention provides dosage forms of a compound
of formula (1) or pharmaceutically acceptable salts, solvates or pro-
drugs thereof. The invention further provides methods of treating
abnormal cell growth, such as cancers, by administering the dosage
forms to a mammal

WO 2004/087152 A1

-1-

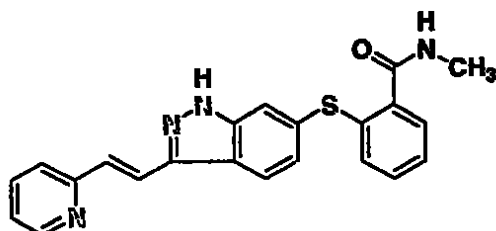
DOSAGE FORMS COMPRISING AG013736

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/460,695, filed April 3, 2003, and U.S. Provisional Application No. 60/491,771, filed July 31, 2003, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties.

Background of the Invention

This invention relates to VEGFR inhibitors that are useful in the treatment of abnormal cell growth, such as cancer, in mammals. This invention also relates to a method of using such compounds in the treatment of abnormal cell growth in mammals, especially humans, and to pharmaceutical compositions containing such compounds

The compound 6-[2-(methycarbamoyl)phenylsulfanyl]-3-E-[2-(pyridin-2-yl)ethenyl] indazole, represented by formula 1



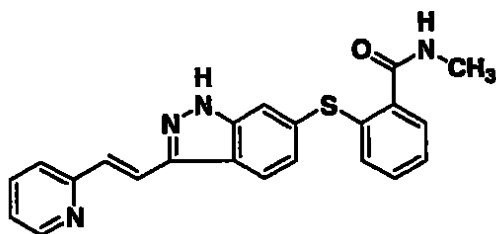
1

is a potent and selective inhibitor of VEGFR/PDGFR tyrosine kinases with broad preclinical activity in xenograft models of colon, melanoma, breast and lung cancer. (Hu-Lowe D, Heller, D, Brekken J, Feeley R, Amundson K, Hames M, Troche G, Kim Y, Gonzalez D, Herrman M, Batugo M, Velich S, Kania R, McTigue M, Gregory S, Bender S, Shalinsky D., Pharmacological Activities of AG013736, a Small Molecule Inhibitor of VEGF/PDGF Receptor Tyrosine Kinases; Proc Am. Assoc. Cancer Res 2002: abstract #5357). Preclinical tumor vascular response assessed using dynamic contrast enhanced MRI (dceMRI) has been shown to correspond with tumor growth index. (Wilmes LJ, Hylton NM, Wang D, Fleming LM Gibbs J, Kim Y, Dillon R, Brasch RC, Park JW, Li K-L, Henry RG, Partridge SC, Shalinsky DR, Hu-Lowe D, McShane TM, and Pallavicini MG., AG013736, a Novel VEGFR TK Inhibitor, Suppresses Tumor Growth and Vascular Permeability in Human BT474 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice"; Proc Am Assoc. Cancer Res. 2003: Abstract #3772.)

-2-

Summary of the Invention

The invention provides dosage forms and methods of treatment using a compound of formula 1:



1

which can be systematically named as 6-[2-(methycarbonyl)phenylsulfanyl]-3-E-[2-(pyridin-2-yl)ethenyl]indazole.

In one embodiment, the invention provides a dosage form for administration to a mammal, the dosage form comprising the compound of formula 1, a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, or a mixture thereof, in an amount effective to provide a 24-hour AUC blood plasma value of no more than 4500 ng-hr/mL of the compound of formula 1 or active metabolites thereof, after administration to the mammal. 24-hour AUC blood plasma values can be determined as described in the Detailed Description herein.

In specific aspects of this embodiment, the upper limit of the 24-hour AUC blood plasma value is no more than 4000 ng-hr/mL or no more than 3000 ng-hr/mL or no more than 2500 ng-hr/mL or no more than 2000 ng-hr/mL or no more than 1500 ng-hr/mL or no more than 1000 ng-hr/mL or no more than 800 ng-hr/mL or no more than 700 ng-hr/mL. Preferably, and in combination with any of the recited upper limits, the 24-hour AUC blood plasma value is at least 10 ng-hr/mL or at least 25 ng-hr/mL or at least 50 ng-hr/mL or at least 75 ng-hr/mL or at least 100 ng-hr/mL or at least 125 ng-hr/mL. Contemplated ranges of 24-hour AUC blood plasma values include ranges from any of the recited lower limits to any of the recited upper limits. Specific, non-limiting examples of preferred ranges include from 25 to 4500 ng-hr/mL, 50 to 2500 ng-hr/mL, 75 to 1000 ng-hr/mL, 100 to 800 ng-hr/mL, and 125 to 700 ng-hr/mL.

In another embodiment, the invention provides a dosage form comprising the compound of formula 1 as defined above, a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, or a mixture thereof, in an amount of no more than 30 mg. It should be appreciated that when all or part of the compound is in the dosage form as a salt, solvate or prodrug, the amount is the equivalent amount of the compound of formula 1, which is readily calculated by one skilled in the art based on molar masses.

In specific aspects of this embodiment, the upper limit of the amount is no more than 20 mg or no more than 15 mg or no more than 12 mg or no more than 10 mg or no more than 8 mg or no more than 7 mg. Preferably, and in combination with any of the recited upper limits, the amount is at least 0.5 mg or at least 1 mg or at least 1.5 mg or at least 2 mg or at least 2.5 mg or at least 3 mg. Contemplated ranges include ranges from any of the recited lower limits to any of the recited

upper limits. Specific, non-limiting examples of preferred ranges include from 0.5 to 30 mg, 1 to 20 mg, 1.5 to 15 mg, 2 to 10 mg, 2.5 to 8 mg, and 3 to 7 mg.

The invention further provides a method of treating abnormal cell growth in a mammal, including a human, by administering to the mammal the compound of formula 1 as defined above, a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, or a mixture thereof, in an amount effective to provide a 24-hour AUC blood plasma value of no more than 4500 ng-hr/mL of the compound of formula 1 or active metabolites thereof, after administration to the mammal. 24-hour AUC blood plasma values can be determined as described in the Detailed Description herein.

In specific aspects of this embodiment, the upper limit of the 24-hour AUC blood plasma value is no more than 4000 ng-hr/mL or no more than 3000 ng-hr/mL or no more than 2500 ng-hr/mL or no more than 2000 ng-hr/mL or no more than 1500 ng-hr/mL or no more than 1000 ng-hr/mL or no more than 800 ng-hr/mL or no more than 700 ng-hr/mL. Preferably, and in combination with any of the recited upper limits, the 24-hour AUC blood plasma value is at least 10 ng-hr/mL or at least 25 ng-hr/mL or at least 50 ng-hr/mL or at least 75 ng-hr/mL or at least 100 ng-hr/mL or at least 125 ng-hr/mL. Contemplated ranges of 24-hour AUC blood plasma values include ranges from any of the recited lower limits to any of the recited upper limits. Specific, non-limiting examples of preferred ranges include from 25 to 4500 ng-hr/mL, 50 to 2500 ng-hr/mL, 75 to 1000 ng-hr/mL, 100 to 800 ng-hr/mL, and 125 to 700 ng-hr/mL.

The invention further provides a method of treating abnormal cell growth in a mammal, including a human, by administering to the mammal the compound of formula 1 as defined above, a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, or a mixture thereof, in an amount of no more than 30 mg per dose. It should be appreciated that when all or part of the compound is in the dosage form as a salt, solvate or prodrug, the amount is the equivalent amount of the compound of formula 1, which is readily calculated by one skilled in the art based on molar masses.

In specific aspects of this embodiment, the upper limit of the amount is no more than 20 mg or no more than 15 mg or no more than 12 mg or no more than 10 mg or no more than 8 mg or no more than 7 mg. Preferably, and in combination with any of the recited upper limits, the amount is at least 0.5 mg or at least 1 mg or at least 1.5 mg or at least 2 mg or at least 2.5 mg or at least 3 mg. Contemplated ranges include ranges from any of the recited lower limits to any of the recited upper limits. Specific, non-limiting examples of preferred ranges include from 0.5 to 30 mg, 1 to 20 mg, 1.5 to 15 mg, 2 to 10 mg, 2.5 to 8 mg, and 3 to 7 mg.

In a specific embodiment of any of the inventive methods described herein, the abnormal cell growth is cancer, including, but not limited to, lung cancer, bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, uterine cancer, ovarian cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, colon cancer, breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of

-4-

the penis, prostate cancer, chronic or acute leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, or a combination of one or more of the foregoing cancers. In another embodiment
 5 of said method, said abnormal cell growth is a benign proliferative disease, including, but not limited to, psoriasis, benign prostatic hypertrophy or restinosis

In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting PDGFR BB mediated cancer cell migration in a mammal, by administering to the mammal a therapeutically acceptable amount of the compound of formula 1.

10 In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting c-KIT activity in a mammal, by administering to the mammal a therapeutically acceptable amount of the compound of formula 1.

In further specific embodiments of any of the inventive methods described herein, the method further comprises administering to the mammal an amount of one or more substances
 15 selected from anti-tumor agents, anti-angiogenesis agents, signal transduction inhibitors, and antiproliferative agents, which amounts are together effective in treating said abnormal cell growth. Such substances include those disclosed in PCT publication nos. WO 00/38715, WO 00/38716, WO 00/38717, WO 00/38718, WO 00/38719, WO 00/38730, WO 00/38665, WO 00/37107 and WO 00/38786, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties

20 Examples of anti-tumor agents include mitotic inhibitors, for example vinca alkaloid derivatives such as vinblastine, vinorelbine, vindesine and vincristine; colchines, allochochine, halichondrine, N-benzoyltrimethyl-methyl ether colchicinic acid, dolastatin 10, maytansine, rhizoxine, taxanes such as paclitaxel (TaxolTM), docetaxel (TaxotereTM), 2'-N-[3-(dimethylamino)propyl]glutaramate (TaxolTM derivative), thiocholchicine, trityl cysteine, teniposide,
 25 methotrexate, azathioprine, fluorouracil, cytosine arabinoside, 2'2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine), adriamycin and mitomycin. Alkylating agents, for example cis-platin, carboplatin, oxiplatin, iproplatin, Ethyl ester of N-acetyl-DL-sarcosyl-L-leucine (Asaley or Asalex), 1,4-cyclohexadiene-1,4-dicarbamate acid, 2,5-bis(1-aziridinyl)-3,6-dioxo-, diethyl ester (diaziquone), 1,4-bis(methanesulfonyloxy)butane (bisulfan or leucosulfan), chlorozotocin, clomesone, cyanomorpholinodoxorubicin, cyclophosphamide, dianhydroglactitol, fluorodopan, hepsulfam, mitomycin C, hycanthone, mitomycin C, mitozolamide, 1-(2-chloroethyl)-4-(3-chloropropyl)-piperazine dihydrochloride, piperazinedione, pipobroman, porfiromycin, spirohydantoin mustard, teroxirone, tetraplatin, thiotepa, triethylenemelamine, uracil
 30 nitrogen mustard, bis(3-mesyloxypropyl)amine hydrochloride, mitomycin, nitrosoureas agents such as cyclohexyl-chloroethylnitrosourea, methylcyclohexyl-chloroethylnitrosourea 1-(2-chloroethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitroso-urea, bis(2-chloroethyl)nitrosourea, procarbazine, dacarbazine, nitrogen
 35 mustard-related compounds such as mechlorethamine, cyclophosphamide, ifosamide, melphalan, chlorambucil, estramustine sodium phosphate, streptozocin, and temozolamide. DNA anti-metabolites, for example 5-fluorouracil, cytosine arabinoside, hydroxyurea, 2-[(3-hydroxy-2-pyridinyl)methylene]-hydrazinecarbothioamide, deoxyfluorouridine, 5-hydroxy-2-formylpyridine thiosemicarbazone, alpha-
 40 2'-deoxy-6-thioguanosine, aphidicolin glycinate, 5-azadeoxycytidine, beta-thioguanine deoxynboside,

cyclocytidine, guanazole, inosine glycodialdehyde, macbecin II, pyrazolimidazole, cladribine, pentostatin, thioguanine, mercaptopurine, bleomycin, 2-chlorodeoxyadenosine, inhibitors of thymidylate synthase such as raltitrexed and pemetrexed disodium, clofarabine, floxundine and fludarabine. DNA/RNA antimetabolites, for example, L-alanosine, 5-azacytidine, actvicin, aminopterin and derivatives thereof such as N-[2-chloro-5-[(2, 4-diamino-5-methyl-6-quinazolinyl)methyl]amino]benzoyl]-L-aspartic acid, N-[4-[(2, 4-diamino-5-ethyl-6-quinazolinyl)methyl]amino]benzoyl]-L-aspartic acid, N-[2-chloro-4-[(2, 4-diaminopteridiny]methyl]amino]benzoyl]-L-aspartic acid, soluble Baker's antifol, dichloroallyl lawsone, brequinar, floraf, dihydro-5-azacytidine, methotrexate, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartic acid tetrasodium salt, pyrazofuran, trimetrexate, plicamycin, actinomycin D, cryptophycin, and analogs such as cryptophycin-52 or, for example, one of the preferred anti-metabolites disclosed in European Patent Application No. 239362 such as N-(5-[N-(3,4-dihydro-2-methyl-4-oxoquinazolin-6-ylmethyl)-N-methylamino]-2-thenoyl)-L-glutamic acid, growth factor inhibitors; cell cycle inhibitors; intercalating antibiotics, for example adriamycin and bleomycin; proteins, for example Interferon; and anti-hormones, for example anti-estrogens such as Nolvadex™ (tamoxifen) or, for example anti-androgens such as Casodex™ (4'-cyano-3-(4-fluorophenylsulphonyl)-2-hydroxy-2-methyl-3'-(trifluoromethyl)propionanilide). Such conjoint treatment may be achieved by way of the simultaneous, sequential or separate dosing of the individual components of the treatment.

Anti-angiogenesis agents include MMP-2 (matrix-metalloproteinase 2) inhibitors, MMP-9 (matrix-metalloproteinase 9) inhibitors, and COX-II (cyclooxygenase II) inhibitors. Examples of useful COX-II inhibitors include CELEBREX™ (celecoxib), valdecoxib, and rofecoxib. Examples of useful matrix metalloproteinase inhibitors are described in WO 96/33172 (published October 24, 1996), WO 96/27583 (published March 7, 1996), European Patent Application No. 97304971.1 (filed July 8, 1997), European Patent Application No. 99308617.2 (filed October 29, 1999), WO 98/07697 (published February 26, 1998), WO 98/03516 (published January 29, 1998), WO 98/34918 (published August 13, 1998), WO 98/34915 (published August 13, 1998), WO 98/33768 (published August 6, 1998), WO 98/30566 (published July 16, 1998), European Patent Publication 606,046 (published July 13, 1994), European Patent Publication 931,788 (published July 28, 1999), WO 90/05719 (published May 31, 1990), WO 99/52910 (published October 21, 1999), WO 99/52889 (published October 21, 1999), WO 99/29667 (published June 17, 1999), PCT International Application No. PCT/IB98/01113 (filed July 21, 1998), European Patent Application No. 99302232.1 (filed March 25, 1999), Great Britain patent application number 9912961.1 (filed June 3, 1999), United States Provisional Application No. 60/148,464 (filed August 12, 1999), United States Patent 5,863,949 (issued January 26, 1999), United States Patent 5,861,510 (issued January 19, 1999), and European Patent Publication 780,386 (published June 25, 1997), all of which are herein incorporated by reference in their entirety. Preferred MMP-2 and MMP-9 inhibitors are those that have little or no activity inhibiting MMP-1. More preferred, are those that selectively inhibit MMP-2 and/or MMP-9 relative to the other matrix-metalloproteinases (i.e. MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, and MMP-13).

Examples of MMP inhibitors include AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, and the compounds recited in the following list.

- 3-[[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonyl]-(1-hydroxycarbamoyl-cyclopentyl)-amino]-propionic acid;
- 5 3-exo-3-[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-8-oxa-bicyclo[3.2.1]octane-3-carboxylic acid hydroxyamide,
 (2R, 3R) 1-[4-(2-chloro-4-fluoro-benzyloxy)-benzenesulfonyl]-3-hydroxy-3-methyl-piperidine-2-carboxylic acid hydroxyamide,
 4-[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-tetrahydro-pyran-4-carboxylic acid
 10 hydroxyamide;
 3-[[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonyl]-(1-hydroxycarbamoyl-cyclobutyl)-amino]-propionic acid,
 4-[4-(4-chloro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-tetrahydro-pyran-4-carboxylic acid
 hydroxyamide;
 15 3-[4-(4-chloro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-tetrahydro-pyran-3-carboxylic acid
 hydroxyamide;
 (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-methyl-benzyloxy)-benzenesulfonyl]-3-hydroxy-3-methyl-pipendine-2-carboxylic acid hydroxyamide,
 3-[[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonyl]-(1-hydroxycarbamoyl-1-methyl-ethyl)-amino]-
 20 propionic acid,
 3-[[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonyl]-(4-hydroxycarbamoyl-tetrahydro-pyran-4-yl)-amino]-propionic acid,
 3-exo-3-[4-(4-chloro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-8-oxa-bicyclo[3.2.1]octane-3-carboxylic acid hydroxyamide;
 25 3-endo-3-[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-8-oxa-bicyclo[3.2.1]octane-3-carboxylic acid hydroxyamide; and
 3-[4-(4-fluoro-phenoxy)-benzenesulfonylamino]-tetrahydro-furan-3-carboxylic acid
 hydroxyamide;

and pharmaceutically acceptable salts, solvates and prodrugs of said compounds.

- 30 Examples of signal transduction inhibitors include agents that can inhibit EGFR (epidermal growth factor receptor) responses, such as EGFR antibodies, EGF antibodies, and molecules that are EGFR inhibitors; VEGF (vascular endothelial growth factor) inhibitors; and erbB2 receptor inhibitors, such as organic molecules or antibodies that bind to the erbB2 receptor, for example, HERCEPTINTM (Genentech, Inc. of South San Francisco, California, USA)

- 35 EGFR inhibitors are described in, for example in WO 95/19870 (published July 27, 1995), WO 98/14451 (published April 9, 1998), WO 98/02434 (published January 22, 1998), and United States Patent 5,747,498 (issued May 5, 1998) EGFR-inhibiting agents include, but are not limited to, the monoclonal antibodies C225 and anti-EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated of New York, New York, USA), the compounds ZD-1839 (AstraZeneca), BIBX-1382 (Boehringer
 40 Ingelheim), MDX-447 (Medarex Inc. of Annandale, New Jersey, USA), and OLX-103 (Merck & Co.

of Whitehouse Station, New Jersey, USA), VRCTC-310 (Ventech Research) and EGF fusion toxin (Seragen Inc of Hopkinton, Massachusetts)

VEGF inhibitors, for example SU-5416 and SU-6668 (Sugen Inc. of South San Francisco, California, USA), can also be combined or co-administered with a compound of formula 1 VEGF
5 Inhibitors are described in, for example in WO 99/24440 (published May 20, 1999), PCT International Application PCT/IB99/00797 (filed May 3, 1999), in WO 95/21613 (published August 17, 1995), WO 99/61422 (published December 2, 1999), United States Patent 5,834,504 (issued November 10, 1998), WO 98/50356 (published November 12, 1998), United States Patent 5,883,113 (issued March 16, 1999), United States Patent 5,886,020 (issued March 23, 1999), United States
10 Patent 5,792,783 (issued August 11, 1998), WO 99/10349 (published March 4, 1999), WO 97/32856 (published September 12, 1997), WO 97/22596 (published June 26, 1997), WO 98/54093 (published December 3, 1998), WO 98/02438 (published January 22, 1998), WO 99/16755 (published April 8, 1999), and WO 98/02437 (published January 22, 1998), all of which are herein incorporated by reference in their entirety Other examples of some specific VEGF inhibitors are IM862 (Cytran Inc
15 of Kirkland, Washington, USA); anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab (Genentech, Inc. of South San Francisco, California); and angiozyme™, a synthetic nbozyme from Ribozyme (Boulder, Colorado) and Chiron (Emeryville, California).

ErbB2 receptor inhibitors, such as GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), and the monoclonal antibodies AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc. of The Woodlands, Texas, USA) and 2B-1
20 (Chiron), may be administered in combination with a compound of formula 1 Such erbB2 inhibitors include those described in WO 98/02434 (published January 22, 1998), WO 99/35146 (published July 15, 1999), WO 99/35132 (published July 15, 1999), WO 98/02437 (published January 22, 1998), WO 97/13760 (published April 17, 1997), WO 95/19970 (published July 27, 1995), United States Patent 5,587,458 (issued December 24, 1996), and United States Patent 5,877,305 (issued
25 March 2, 1999), each of which is herein incorporated by reference in its entirety. ErbB2 receptor inhibitors useful in the present invention are also described in United States Provisional Application No. 60/117,341, filed January 27, 1999, and in United States Provisional Application No. 60/117,346, filed January 27, 1999, both of which are herein incorporated by reference in their entirety.

30 Other antiproliferative agents that may be used include inhibitors of the enzyme farnesyl protein transferase and inhibitors of the receptor tyrosine kinase PDGFr, including the compounds disclosed and claimed in the following United States patent applications: 09/221946 (filed December 28, 1998); 09/454058 (filed December 2, 1999), 09/501163 (filed February 9, 2000), 09/539930 (filed March 31, 2000); 09/202796 (filed May 22, 1997); 09/384339 (filed August 26, 1999), and 09/383755 (filed August 26, 1999); and the compounds disclosed and claimed in the
35 following United States provisional patent applications: 60/168207 (filed November 30, 1999); 60/170119 (filed December 10, 1999); 60/177718 (filed January 21, 2000), 60/168217 (filed November 30, 1999), and 60/200834 (filed May 1, 2000) Each of the foregoing patent applications and provisional patent applications is herein incorporated by reference in their entirety

-8-

The compound of formula 1 may also be used with other agents useful in treating abnormal cell growth or cancer, including, but not limited to, agents capable of enhancing antitumor immune responses, such as CTLA4 (cytotoxic lymphocyte antigen 4) antibodies, and other agents capable of blocking CTLA4; and anti-proliferative agents such as other farnesyl protein transferase inhibitors. Specific CTLA4 antibodies that can be used in the present invention include those described in United States Provisional Application 60/113,647 (filed December 23, 1998) which is herein incorporated by reference in its entirety.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising the compound of formula 1, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, and a therapeutically effective amount of docetaxel.

In another embodiment, the invention provides a method of treating abnormal cell growth in a mammal, including a human, by administering to the mammal the compound of formula 1, or a pharmaceutically acceptable salt, solvate or prodrug thereof, and a therapeutically effective amount of docetaxel. The compound of formula 1 and docetaxel can be administered separately or in the same composition, and can be administered on the same dosing schedule or on different dosing schedules, as desired.

Definitions

"Abnormal cell growth", as used herein, unless otherwise indicated, refers to cell growth that is independent of normal regulatory mechanisms (e.g., loss of contact inhibition). This includes the abnormal growth of: (1) tumor cells (tumors) that proliferate by expressing a mutated tyrosine kinase or overexpression of a receptor tyrosine kinase; (2) benign and malignant cells of other proliferative diseases in which aberrant tyrosine kinase activation occurs; and (4) any tumors that proliferate by receptor tyrosine kinases.

The term "treating", as used herein, unless otherwise indicated, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or condition. The term "treatment", as used herein, unless otherwise indicated, refers to the act of treating as "treating" is defined immediately above.

The phrase "pharmaceutically acceptable salt(s)", as used herein, unless otherwise indicated, includes salts of acidic or basic groups which may be present in a compound. Compounds that are basic in nature are capable of forming a wide variety of salts with various inorganic and organic acids. The acids that may be used to prepare pharmaceutically acceptable acid addition salts of such basic compounds are those that form non-toxic acid addition salts, i.e., salts containing pharmacologically acceptable anions, such as the acetate, benzenesulfonate, benzoate, bicarbonate, bisulfate, bitartrate, borate, bromide, calcium edetate, camsylate, carbonate, chloride, clavulanate, citrate, dihydrochloride, edetate, edisylate, estolate, esylate, ethylsuccinate, fumarate, gluceptate, gluconate, glutamate, glycolylarsanilate, hexylresorcinate, hydrabamine, hydrobromide, hydrochloride, iodide, isothionate, lactate, lactobionate, laurate, malate, maleate, mandelate, mesylate, methylsulfate, mucate, napsylate, nitrate, oleate, oxalate, pamoate (embonate), palmitate, pantothenate,

-9-

phosphate/diphosphate, polygalacturonate, salicylate, stearate, subacetate, succinate, tannate, tartrate, teoclats, tosylate, triethiodode, and valerate salts.

The term "prodrug", as used herein, unless otherwise indicated, means compounds that are drug precursors, which following administration, release the drug *in vivo* via some chemical or physiological process (e.g., a prodrug on being brought to the physiological pH is converted to the desired drug form).

The subject invention also includes isotopically-labeled compounds, which are identical to those recited in Formula 1, but for the fact that one or more atoms are replaced by an atom having an atomic mass or mass number different from the atomic mass or mass number usually found in nature. Examples of isotopes that can be incorporated into compounds of the invention include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulfur, fluorine and chlorine, such as ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , and ^{36}Cl , respectively. Compounds of the present invention, prodrugs thereof, and pharmaceutically acceptable salts and solvates of said compounds or of said prodrugs which contain the aforementioned isotopes and/or other isotopes of other atoms are within the scope of this invention. Certain isotopically-labeled compounds of the present invention, for example those into which radioactive isotopes such as ^3H and ^{14}C are incorporated, are useful in drug and/or substrate tissue distribution assays. Tritiated, i.e., ^3H , and carbon-14, i.e., ^{14}C , isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with heavier isotopes such as deuterium, i.e., ^2H , can afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and, hence, may be preferred in some circumstances. Isotopically labeled compounds of Formula 1 of this invention and prodrugs thereof can generally be prepared by carrying out the procedures described for the non-labeled compound, substituting a readily available isotopically labeled reagent for a non-isotopically labeled reagent.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows metabolites of the compound of formula 1 identified in dogs following a single oral dose of the ^{14}C -labeled compound.

Figure 2 shows metabolites of the compound of formula 1 identified in mice following a single oral dose of the ^{14}C -labeled compound.

Detailed Description Of The Invention

The compound of formula 1 can be prepared as described in U.S. Patent Nos. 6,531,491 and 6,534,524 (issued March 11, 2003 and March 18, 2003, respectively), which are incorporated herein by reference in their entireties. Certain starting materials may be prepared according to methods familiar to those skilled in the art and certain synthetic modifications may be done according to methods familiar to those skilled in the art.

The compound of formula 1 is capable of forming a wide variety of different salts with various inorganic and organic acids. Although such salts must be pharmaceutically acceptable for administration to mammals, it is often desirable in practice to initially isolate the compound of formula

-10-

1 from the reaction mixture as a pharmaceutically unacceptable salt and then simply convert the latter back to the free base compound by treatment with an alkaline reagent and subsequently convert the latter free base to a pharmaceutically acceptable acid addition salt. The acid addition salts of the base compounds of this invention are readily prepared by treating the base compound with a substantially equivalent amount of the chosen mineral or organic acid in an aqueous solvent medium or, in a suitable organic solvent, such as methanol or ethanol. Upon careful evaporation of the solvent, the desired solid salt is readily obtained. The desired acid salt can also be precipitated from a solution of the free base in an organic solvent by adding to the solution an appropriate mineral or organic acid.

Administration of the compound of formula 1 can be effected by any method that enables delivery of the compound to the site of action. These methods include oral routes, intraduodenal routes, parenteral injection (including intravenous, subcutaneous, intramuscular, intravascular or infusion), topical, and rectal administration.

The compound may, for example, be provided in a form suitable for oral administration as a tablet, capsule, pill, powder, sustained release formulation, solution, suspension, for parenteral injection as a sterile solution, suspension or emulsion, for topical administration as an ointment or cream or for rectal administration as a suppository. The compound may be in unit dosage forms suitable for single administration of precise dosages. Preferably, dosage forms include a conventional pharmaceutical carrier or excipient and the compound of formula 1 as an active ingredient. In addition, dosage forms may include other medicinal or pharmaceutical agents, carriers, adjuvants, etc.

Exemplary parenteral administration forms include solutions or suspensions in sterile aqueous solutions, for example, aqueous propylene glycol or dextrose solutions. Such dosage forms can be suitably buffered, if desired.

Suitable pharmaceutical carriers include inert diluents or fillers, water and various organic solvents. The pharmaceutical composition may, if desired, contain additional ingredients such as flavorings, binders, excipients and the like. Thus for oral administration, tablets containing various excipients, such as citric acid may be employed together with various disintegrants such as starch, alginic acid and certain complex silicates and with binding agents such as sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, sodium lauryl sulfate and talc are often useful for tableting purposes. Solid compositions of a similar type may also be employed in soft and hard filled gelatin capsules. Preferred materials therefor include lactose or milk sugar and high molecular weight polyethylene glycols. When aqueous suspensions or elixirs are desired for oral administration the active compound therein may be combined with various sweetening or flavoring agents, coloring matters or dyes and, if desired, emulsifying agents or suspending agents, together with diluents such as water, ethanol, propylene glycol, glycerin, or combinations thereof.

In preferred embodiments of the dosage forms of the invention, the dosage form is an oral dosage form, more preferably, a tablet or a capsule.

In preferred embodiments of the methods of the invention, the compound of formula 1 is administered orally, such as, for example, using an oral dosage form as described herein.

The methods include administering the compound of formula 1 using any desired dosage regimen. In one specific embodiment, the compound is administered once per day (quaque die, or QD), preferably twice per day (bis in die, or BID), although more or less frequent administration is within the scope of the invention. The compound can be administered to the mammal, including a human, preferably in a fasted state (no food or beverage within 2 hours before and after administration). In a particularly preferred embodiment, the dosage is BID, fasted.

Methods of preparing various dosage forms with a specific amount of the compound of formula 1 are known, or will be apparent, to those skilled in this art. For examples, see Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition (1975).

AUC blood plasma values can be determined by directly measuring blood plasma concentrations of the compound of formula one or active metabolites thereof, such as by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), at various time intervals, and calculating the area under the plasma concentration versus time curve. Suitable methods for calculating AUC are well-known in the art, such as, for example, by using the trapezoidal approximation,

$$AUC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$$

where n is the number of data points, and t_i and C_i are the time and concentration (x and y values) of the i th data point. 24-hour AUC values can be determined by normalizing measured blood plasma concentrations according to the dosing schedule. Sodium bisulfite is added as a stabilizer in the reconstitution solution for preparation of concentration standards.

The compound of formula 1 has advantageous properties relating to the modulation and/or inhibition of the kinase activity associated with VEGF-R, FGF-R, CDK complexes, CHK1, CSF-R, and/or LCK.

As shown in the examples below, the compound of formula 1 is capable of inducing HUVEC apoptosis *in vitro*, inhibiting VEGF mediated Akt and eNOS phosphorylation in HUVEC, demonstrating a lasting inhibitory effect on VEGFR-2 phosphorylation in HUVEC after compound withdrawal, and inhibiting PDGF BB induced cancer cell migration on matrix protein fibronectin. The compound of formula 1 may have activity against PDGFR-driven tumor progression by inhibiting migration and invasion.

The compound of formula 1 also demonstrates more efficacious activity in tumor growth inhibition when combined with TaxolTM, more preferably docetaxel. More significant tumor regression was observed with the co-therapy than either agent alone.

The present invention is further directed to methods of modulating or inhibiting protein kinase activity, for example in mammalian tissue, by administering the compound of formula 1. The activity of the inventive compound as a modulator of protein kinase activity, such as the activity of kinases, may be measured by any of the methods available to those skilled in the art, including *in vivo* and/or *in vitro* assays. Examples of suitable assays for activity measurements include those described in Parast C et al., *BioChemistry*, 37, 16788-16801 (1998); Jeffrey et al., *Nature*, 376, 313-320 (1995), WIPO International Publication, No. WO 97/34876, and WIPO International

-12-

Publication No. WO 96/14843 These properties may be assessed, for example, by using one or more of the biological testing procedures set out in the examples below.

The examples and preparations provided below further illustrate and exemplify the dosage forms and methods of the present invention. It is to be understood that the scope of the present invention is not limited in any way by the scope of the following examples.

Example 1

The compound of formula 1 was tested for: (1) in vivo efficacy under several scheduling: sid, weekend dose holiday and intermittent dosing; (2) efficacy when combined with docetaxel in xenograft models; (3) in vitro eNOS and Akt phosphorylation in endothelial cells; (4) the concentration of Nitro Oxide and related products in cell culture and in vivo and (5) use of c-Kit signal in the whole blood cells as a potential biomarker for the compound.

BIOLOGICAL TESTING; ENZYME ASSAYS

The stimulation of cell proliferation by growth factors such as VEGF, FGF, and others is dependent upon their induction of autophosphorylation of each of their respective receptor's tyrosine kinases. Therefore, the ability of a protein kinase inhibitor to block cellular proliferation induced by these growth factors is directly correlated with its ability to block receptor autophosphorylation. To measure the protein kinase inhibition activity of the compounds, the following constructs were devised.

VEGF-R2 Construct for Assay: This construct determines the ability of a test compound to inhibit tyrosine kinase activity. A construct (VEGF-R2Δ50) of the cytosolic domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2) lacking the 50 central residues of the 68 residues of the kinase insert domain was expressed in a baculovirus/insect cell system. Of the 1356 residues of full-length VEGF-R2, VEGF-R2Δ50 contains residues 806-839 and 990-1171, and also one point mutation (E990V) within the kinase insert domain relative to wild-type VEGF-R2. Autophosphorylation of the purified construct was performed by incubation of the enzyme at a concentration of 4 μM in the presence of 3 mM ATP and 40 mM MgCl₂ in 100 mM HEPES, pH 7.5, containing 5% glycerol and 5 mM DTT, at 4 °C for 2 h. After autophosphorylation, this construct has been shown to possess catalytic activity essentially equivalent to the wild-type autophosphorylated kinase domain construct. See Parast et al, *Biochemistry*, 37, 16788-16801 (1998).

FGF-R1 Construct for Assay. The intracellular kinase domain of human FGF-R1 was expressed using the baculovirus vector expression system starting from the endogenous methionine residue 456 to glutamate 766, according to the residue numbering system of Mohammadi et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 977-989 (1996). In addition, the construct also has the following 3 amino acid substitutions. L457V, C488A, and C584S.

LCK Construct for Assay The LCK tyrosine kinase was expressed in insect cells as an N-terminal deletion starting from amino acid residue 223 to the end of the protein at residue 509, with the following two amino acid substitutions at the N-terminus: P233M and C224D.

CHK-1 Construct for Assay C-terminally His-tagged full-length human CHK-1 (FL-CHK-1) was expressed using the baculovirus/insect cell system. It contains 6 histidine residues (6 x His-

tag) at the C-terminus of the 476 amino acid human CHK-1. The protein was purified by conventional chromatographic techniques.

CDK2/Cyclin A Construct for Assay: CDK2 was purified using published methodology (Rosenblatt et al., *J. Mol. Biol.*, 230, 1317-1319 (1993)) from insect cells that had been infected with a baculovirus expression vector. Cyclin A was purified from *E. coli* cells expressing full-length recombinant cyclin A, and a truncated cyclin A construct was generated by limited proteolysis and purified as described previously (Jeffrey et al., *Nature*, 376, 313-320 (1995)).

CDK4/Cyclin D Construct for Assay: A complex of human CDK4 and cyclin D3, or a complex of cyclin D1 and a fusion protein of human CDK4 and glutathione-S-transferase (GST-CDK4), was purified using traditional biochemical chromatographic techniques from insect cells that had been co-infected with the corresponding baculovirus expression vectors.

VEGF-R2 Assay. Coupled Spectrophotometric (FLVK-P) Assay

The production of ADP from ATP that accompanies phosphoryl transfer was coupled to oxidation of NADH using phosphoenolpyruvate (PEP) and a system having pyruvate kinase (PK) and lactic dehydrogenase (LDH). The oxidation of NADH was monitored by following the decrease of absorbance at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) using a Beckman DU 650 spectrophotometer. Assay conditions for phosphorylated VEGF-R2 Δ 50 (indicated as FLVK-P in the tables below) were the following: 1 mM PEP; 250 μM NADH; 50 units of LDH/mL; 20 units of PK/mL, 5 mM DTT; 5 mM poly(E₄Y₁); 1 mM ATP; and 25 mM MgCl₂ in 200 mM HEPES, pH 7.5. Assay conditions for unphosphorylated VEGF-R2 Δ 50 (indicated as FLVK in the tables) were the following: 1 mM PEP; 250 μM NADH; 50 units of LDH/mL; 20 units of PK/mL; 5 mM DTT; 20 mM poly(E₄Y₁), 3 mM ATP; and 60 mM MgCl₂ and 2 mM MnCl₂ in 200 mM HEPES, pH 7.5. Assays were initiated with 5 to 40 nM of enzyme. K_i values were determined by measuring enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

ELISA Assay: Formation of phosphogastrin was monitored using biotinylated gastrin peptide (1-17) as substrate. Biotinylated phosphogastrin was immobilized using streptavidin coated 96-well microtiter plates followed by detection using anti-phosphotyrosine-antibody conjugated to horseradish peroxidase. The activity of horseradish peroxidase was monitored using 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulfonate(6)] diammonium salt (ABTS). Typical assay solutions contained: 2 μM biotinylated gastrin peptide; 5 mM DTT; 20 μM ATP; 26 mM MgCl₂; and 2 mM MnCl₂ in 200 mM HEPES, pH 7.5. The assay was initiated with 0.8 nM of phosphorylated VEGF-R2 Δ 50. Horseradish peroxidase activity was assayed using ABTS, 10 mM. The horseradish peroxidase reaction was quenched by addition of acid (H₂SO₄), followed by absorbance reading at 405 nm. K_i values were determined by measuring enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

FGF-R Assay. The spectrophotometric assay was carried out as described above for VEGF-R2, except for the following changes in concentration: FGF-R = 50 nM, ATP = 2 mM, and poly(E₄Y₁) = 15 mM.

LCK Assay: The spectrophotometric assay was carried out as described above for VEGF-R2, except for the following changes in concentration: LCK = 60 nM, $MgCl_2$ = 0 mM, poly(E4Y1) = 20 mM.

CHK-1 Assay. The production of ADP from ATP that accompanies phosphoryl transfer to the synthetic substrate peptide Syntide-2 (PLARTLSVAGLPGKK) was coupled to oxidation of NADH using phosphoenolpyruvate (PEP) through the actions of pyruvate kinase (PK) and lactic dehydrogenase (LDH). The oxidation of NADH was monitored by following the decrease of absorbance at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) using a HP8452 spectrophotometer. Typical reaction solutions contained: 4 mM PEP; 0.15 mM NADH; 28 units of LDH/mL, 16 units of PK/mL; 3 mM DTT, 0.125 mM Syntide-2; 0.15 mM ATP; 25 mM $MgCl_2$ in 50 mM TRIS, pH 7.5; and 400 mM NaCl. Assays were initiated with 10 nM of FL-CHK-1. K_i values were determined by measuring initial enzyme activity in the presence of varying concentrations of test compounds. The data were analyzed using Enzyme Kinetic and Kaleidagraph software.

HUVEC Proliferation Assay: This assay determines the ability of a test compound to inhibit the growth factor-stimulated proliferation of human umbilical vein endothelial cells ("HUVEC"). HUVEC cells (passage 3-4, Clonetics, Corp.) were thawed into EGM2 culture medium (Clonetics Corp) in T75 flasks. Fresh EGM2 medium was added to the flasks 24 hours later. Four or five days later, cells were exposed to another culture medium (F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 60 $\mu\text{g/mL}$ endothelial cell growth supplement (ECGS), and 10 $\mu\text{g/mL}$ heparin). Exponentially-growing HUVEC cells were used in experiments thereafter. Ten to twelve thousand HUVEC cells were plated in 96-well dishes in 100 μL of rich, culture medium (described above). The cells were allowed to attach for 24 hours in this medium. The medium was then removed by aspiration and 115 μL of starvation media (F12K+1% FBS) was added to each well. After 18 hours, 15 μL of test agent dissolved in 1% DMSO in starvation medium or this vehicle alone was added into each treatment well; the final DMSO concentration was 0.1%. One hour later, 20 μL of 150 ng/mL hrVEGF₁₂₅ in starvation media was added to all wells except those containing untreated controls; the final VEGF concentration was 20 ng/mL. Cellular proliferation was quantified 72 hours later by MTT dye reduction, at which time cells were exposed for 4-5 hours MTT (Promega Corp.). Dye reduction was stopped by addition of a stop solution (Promega Corp.) and absorbance at 570 and 630 nm was determined on a 96-well spectrophotometer plate reader.

Cancer Cell Proliferation (MV522) Assay: To determine whether a protein kinases inhibitor should have therapeutic usefulness in blocking angiogenesis for treating cancer, it is important to demonstrate the inhibitor does not non-specifically block cellular proliferation in cells that do not express the kinase receptor. This is done by performing proliferation assays using cancer cells. The protocol for assessing cellular proliferation in cancer cells is similar to that used for assessments in HUVEC cells. Two thousand lung cancer cells (line MV522, acquired from UCSD) were seeded in growth media (RPMI1640 medium supplemented with 2 mM glutamine and 10% FBS). Cells are allowed to attach for 1 day prior to addition of test agents and/or vehicles. Cells are treated simultaneously with the same test agents used in the HUVEC assay. Cellular proliferation is quantified by MTT dye reduction assay 72 hours after exposure to test agents.

C-Kit potency determination. NCI-H526 (ATCC) cells were used for determining potency against c-Kit by the inhibitor. The cells were grown to sub-confluency and incubated in starvation media for 18 hours. The inhibitor was added and the cells were incubated for 45 min at 37°C in the presence of 2.3% albumin and 1mM Na₃VO₄ (Sigma). SCF, the c-Kit growth factor was added to the culture at a final concentration of 50 ng/mL. Five minutes later the cells were rinsed 2X with cold PBS and lysed with lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% NP40, 1 mM Na₃VO₄ and a protease inhibitor cocktail). Immunoprecipitation was performed using 1mg total protein from each lysate, incubating over night at 4° with 4 µg/mL CD117 ab-3 (K45, Neomarkers). The antibody complex was conjugated to protein A beads the following morning. SDS PAGE and Western Blot analysis was conducted using anti phosphotyrosine antibody 4G10 (Upstate Biotechnology) for phosphorylated receptors, or anti-c-Kit receptor antibody sc-1493 (C-14, Santa Cruz) at 1:1000. The blots were visualized by the chemiluminescent reagents ECL Plus. A phosphorimager (Storm 846, Molecular Dynamics) was used for the quantification of the signals in the blots.

The reduction of c-kit positive cell population in total peripheral blood cells of an animal and mammal may be used as a biomarker for activity of the compound of formula 1.

ENOS and Akt phosphorylation measurement: HUVEC (Clonetics) were used for determining potency against eNOS and Akt by the inhibitor. The cells were grown to sub-confluency and incubated in starvation media for 18 hours. The inhibitor was added and the cells were incubated for 45 min at 37 °C in the presence of 2.3% albumin and 1mM Na₃VO₄ (Sigma). VEGF was added to the culture medium at 50 ng/mL. Five minutes later the cells were rinsed 2X with cold PBS and lysed with lysis buffer (50 mM Tris, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1% NP40, 1mM Na₃VO₄ and a protease inhibitor cocktail). A total protein of 30-40ug was analyzed by the Western method. eNOS and Akt Phosphorylation was assessed by using: Phospho-eNOS (Ser. 1177) #9571 or Phospho-Akt (Ser 473) #9271 antibodies (both from Cell signalling). Protein detection was achieved by using: NOS3 (C-20) sc-654 (Santa Cruz) or Akt antibody #9272 (Cell Signaling). All require an anti rabbit HRP linked secondary antibody used at 1:3000. The blots were visualized by the chemiluminescent substrate Super Signal West Dura (Pierce). An Alpha Imager 8800 from Alpha Innotech was used for the quantification of the signals in the blots.

Mouse PK Assay. The pharmacokinetics (e.g., absorption and elimination) of drugs in mice were analyzed using the following experiment. Test compounds were formulated as a suspension in a 0.5% CMC vehicle or as a solution in a 30:70 (PEG400:acidified H₂O) vehicle. This suspension or solution was administered orally (p.o.) or intraperitoneally (i.p.) to the C3H female mice (n=4). Blood samples were collected via an orbital bleed at time points: 0 hour (pre-dose), 0.5 hr, 1.0 hr, 2.0 hr, and 4.0 hr post dose. Plasma was obtained from each sample by centrifugation at 2500 rpm for 5 min. Test compound was extracted from the plasma by an organic protein precipitation method. For each time bleed 50 µL of plasma was combined with 1.0 mL of acetonitrile, vortexed for 2 min and then spun at 4000 rpm for 15 min to precipitate the protein and extract out the test compound. Next, the acetonitrile supernatant (the extract containing test compound) was poured into new test tubes and evaporated on a hot plate (25 °C) under a stream of N₂ gas. To each tube

-16-

containing the dried test compound extract 125 μ L of mobile phase (60:40, 0.025 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ +2.5 mL/L TEA:acetonitrile) was added. The test compound was resuspended in the mobile phase by vortexing and more protein was removed by centrifugation at 4000 rpm for 5 min. Each sample was poured into an HPLC vial for test Compound Analysis on an Hewlett Packard 1100 series HPLC with UV detection. From each sample, 95 μ L was injected onto a Phenomenex-Prodigy reverse phase C-18, 150 x 3.2 mm column and eluted with a 45-50% acetonitrile gradient run over 10 min. Test-compound plasma concentrations ($\mu\text{g/mL}$) were determined by a comparison to standard curve (peak area vs conc. $\mu\text{g/mL}$) using known concentrations of test compound extracted from plasma samples in the manner described above. Along with the standards and unknowns, three groups (n=4) of quality controls (0.25 $\mu\text{g/mL}$, 1.5 $\mu\text{g/mL}$, and 7.5 $\mu\text{g/mL}$) were run to insure the consistency of the analysis. The standard curve had an $R^2 > 0.99$ and the quality controls were all within 10 % of their expected values. The quantitated test samples were plotted for visual display using Kaleidagraph software and their pharmacokinetic parameters were determined using WIN NONLIN software.

Human Liver Microsome (HLM) Assay Compound metabolism in human liver microsomes was measured by LC-MS analytical assay procedures as follows. First, human liver microsomes (HLM) were thawed and diluted to 5 mg/mL with cold 100 mM potassium phosphate (KPO_4) buffer. Appropriate amounts of KPO_4 buffer, NADPH-regenerating solution (containing B-NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and MgCl_2), and HLM were preincubated in 13 x 100 mm glass tubes at 37 C for 10 min (3 tubes per test compound-triplicate). Test compound (5 μM final) was added to each tube to initiate reaction and was mixed by gentle vortexing, followed by incubation at 37 C. At t=0, 2 h, a 250- μ L sample was removed from each incubation tube to separate 12 x 75 mm glass tubes containing 1 mL ice-cold acetonitrile with 0.05 μM reserpine. Samples were centrifuged at 4000 rpm for 20 min. to precipitate proteins and salt (Beckman Allegra 6KR, S/N ALK98D06, #634). Supernatant was transferred to new 12 x 75 mm glass tubes and evaporated by Speed-Vac centrifugal vacuum evaporator. Samples were reconstituted in 200 μ L 0.1% formic acid/acetonitrile (90/10) and vortexed vigorously to dissolve. The samples were then transferred to separate polypropylene microcentrifuge tubes and centrifuged at 14000 x g for 10 min (Fisher Micro 14, S/N M0017580). For each replicate (#1-3) at each timepoint (0 and 2 h), an aliquot sample of each test compound was combined into a single HPLC vial insert (6 total samples) for LC-MS analysis, which is described below.

The combined compound samples were injected into the LC-MS system, composed of a Hewlett-Packard HP1100 diode array HPLC and a Micromass Quattro II triple quadrupole mass spectrometer operating in positive electrospray SIR mode (programmed to scan specifically for the molecular ion of each test compound). Each test compound peak was integrated at each timepoint. For each compound, peak area at each timepoint (n=3) was averaged, and this mean peak area at 2 h was divided by the average peak area at time 0 hour to obtain the percent test compound remaining at 2 h.

In vitro HUVEC Apoptosis Assays

Quantification of Apoptosis by ELISA: Apoptosis of HUVEC cells was measured using Cell Death Detection Elisa PLUS (catalog #1775425, Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) that quantifies cytoplasmic histone-associated DNA fragments in cell lysates. The procedure was performed with minor modifications to the manufacture's instructions. Briefly, Starved HUVEC cells were treated with various concentrations of Compound A in the presence of VEGF (20 ng/mL). The cytosolic fraction of the cells at various time points was collected and used as an antigen source in a sandwich ELISA with a primary anti-histone mAb coated to the microtiter plate and a secondary anti-DNA mAb coupled to peroxidase. The number of apoptotic cells was determined by adding chromogenic peroxidase substrate and measuring the absorption with a spectrophotometer at 405 nm (reference wavelength 490nm)

Visualization of Apoptosis by TUNEL: In situ detection of apoptotic cell was carried out using the TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. Briefly HUVEC cells grown in 8 well Lab-Tek chamber slides were starved O/N and then treated for 6 hours with various concentrations of Compound A. The cells were then fixed in 4% Paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100 and incubated for 1 hour in a mixture of terminal transferase and nucleotides including Fluorescein-dUTP (Deadend Fluorometric TUNEL system, Promega, catalog # G3250) in accordance with the manufacturer's instructions. The cells were counterstained with Propidium iodide (PI) solution. Positively stained Fluorescein and PI labeled cells were visualized and photographed by fluorescence microscopy.

PDGF mediated Cell Migration Assay: U87MG cells were used in this assay. Six well plates are pre-incubated overnight with 0.5 ng/mL Fibronectin. The following day U87MG cells are plated in each well and allowed to grow to confluence. The cells were incubated overnight with starvation media containing 0.1% FBS. A ~1cm scratch was made using a pipette tip and the cells washed with the starvation media. The plates were then incubated with 0.5 ng/mL Fibronectin for 1 hour and then washed again. The experimental media containing 100 ng/LI rhPDGF BB and Compound A in the starvation media was introduced. Cells were photographed between 0 and 15 hour and the migration was visualized.

Cellular VEGFR-2 and Downstream Molecule Phosphorylation Assay. HUVECs (Clonetics) were cultured to sub-confluency and incubated in starvation media (F12K plus 0.1% FBS) for 18 hours. Compound A was added to the cells in the presence of 2.3% albumin and 1mM Na₃VO₄ (Sigma). Forty-five minutes later, VEGF was added to the culture with a final concentration of 50 ng/mL. Five minutes later the cells were rinsed with cold PBS and lysed with lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 1% NP40, 1 mM Na₃VO₄ and a protease inhibitor cocktail). One milligram of total proteins from lysate was immunoprecipitated using anti-Flk-1 C-1158 (Santa Cruz). The antibody complex was conjugated to protein A beads and SDS PAGE/Western analysis was conducted. phosphorylated VEGFR-2 and the protein was detected by the anti phosphotyrosine antibody 4G10 (Upstate Biotechnology) and anti-Flk-1 C-20 (Santa Cruz), respectively. For eNOS and Akt, the cells were treated the same as above. Western analyses were performed using a total of 30-40µg proteins. eNOS and Akt phosphorylation was probed by using Phospho-eNOS (Ser 1177, #9571) or Phospho-Akt (Ser 473, #9271) antibodies (Cell

Signaling). Proteins were assessed by using NOS3 C-20 (sc-654, Santa Cruz) or Akt antibody #9272 (Cell Signaling). HRP linked anti-rabbit IgG was used as the secondary antibody. All blots were visualized by the chemiluminescent substrate Super Signal West Dura (Pierce) The signal was quantified using an Alpha Imager 8800 from Alpha Innotech

5 Washout Experiments: HUVEC cells were treated as described above. After incubation with Compound A (10 nM) for 45 min and stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 5 min, the supernatant was removed, washed and replace with the starvation media containing VEGF and Na₃VO₄. The cells were further incubated for desired length of time before lysed and processed using immunoprecipitation and Western for phosphorylated and total VEGFR-2 (see above). In
10 another experiment, the cells were treated with VEGF for the entire length of time as above and VEGFR-2 phosphorylation and total VEGFR-2 at desired time points were assessed similarly. Signals during washout were quantified by densitometry. Intensities of maximum stimulation (5 min) from each experiment was normalized to each other and the intensity of phospho-VEGFR-2 at each time point was compared across the two experiments, which allowed to determine VEGFR-2
15 phosphorylation recovery relative to cells that were untreated but VEGF-stimulated

 Tumor Models: For the human MV522 (colon carcinoma) and MDA-MB-231 (breast carcinoma) models, athymic mice (n = 8~12) were implanted (s.c.) with 5 x 10⁶ cells/site; For the murine Lewis Lung carcinoma model, tumor fragments (1-2 mm²) were trocar-implanted in the right flank of B6D2F1 mice. Dosing usually started on day-7 (MV522) or when average tumor size
20 reached 150-200 mm³ (MDA-MB-231).

 The compound of formula 1 was formulated in 0.5% CMC/H₂O and administered PO, BID Docetaxel was formulated in 7% EtOH/3% Polysorbate/90% H₂O and was dosed weekly, intravenously. Treatment usually lasted for 3-4 weeks The geometric length and width of the tumor was measured three times per week using an electronic caliper. Tumor volume was
25 calculated as a product of 0.4 x [Length x (Width)²] Data were reported as mean ± SEM. At end of studies, tumors and tissues were resected, weighed and collected for analysis. Plasma was collected for analysis of drug concentration.

Results are shown in Tables 1-3.

Table 1. Potency and Selectivity of Compound 1

Target	Enzymatic Activity, K _i (nM)	Receptor Phosphorylation, IC ₅₀ (nM) ^a
VEGFR-2 (KDR)	1.1	0.25
VEGFR-1 (Flt-1)	8.3	1.2 ^b
VEGFR-3 (Flt-4)	nd	0.29
PDGFR-β	1.3	2.5
c-Kit	nd	2
FGFR-1	56	218

30 ^a measured by cell proliferation assays, ^b measured in the presence of 2.3% albumin by IP/IB, nd Not determined

Other enzyme screened but were above limit for K_i calculation are cMet, LCK, c-Src, FAK, Pyk2, IRL, BTK, CDK1, CDK2, CDK4, PKA, PKC, PLK and Chk1.

17

Table 2 Study design for the co-administration of Compound 1 and docetaxel in the MDA-MB-231 human breast cancer model.

Compound 1 (mg/kg) ^a	Docetaxel ^b	Dose Selection Rationale
25	0	ED ₉₀
5	0	ED ₅₀
1	0	low dose
0	20	70% MTD for mouse
0	10	calc. equiv human MTD
0	2	low dose
25	20	tolerance and DDI
5	10	additivity and DDI
5	2	additivity and DDI
1	10	additivity and DDI
1	2	additivity and DDI

^a po, bid, daily; ^b iv, once/week

5

Table 3 Combination therapy of docetaxel and Compound 1 produced greater anti-tumor activity in MDA-MB-231 xenograft model.

Compound 1 (mg/kg) ^a	Docetaxel ^b	PR	CR**
0	0	0	0
25	0	3	0
5	0	3	0
1	0	0	0
0	20	4	0
0	10	6	0
0	2	0	0
25	20	12	0
5	10	10	2
1	10	7	2
5	2	0	0
1	2	0	0

^a po, bid, daily; ^b iv, once/week

The combination groups demonstrate the increased incidences of complete and partial tumor regression. Tumor growth rate was reduced to a greater degree when the agents were combined. The combination treatment was equally well tolerated than the single agents alone

10

Example 2

The compound of formula 1, 6-[2-(methylcarbamoyl)phenylsulfanyl]-3-E-[2-(pyridin-2-yl) ethenyl]indazole, was administered in varying doses to patients with solid tumors. Thirty patients (13 male, 17 female) were treated using the compound of formula 1 in an oral dosage, tablet form, on a BID or QD schedule. Cycles were 28 days each. The specific tumor diagnoses were breast (11), thyroid (5), renal cell (5), lung (4) and other (5). Pharmacokinetic data were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Blood samples were taken on day 15 of the cycle at times of ½ hour, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 8 hours and 12 hours from the time of administration.

Pharmacokinetic results (day 15 mean values) are shown in Table 4. The patients were not fasted unless otherwise indicated. The numbers in parentheses are the coefficient of variation expressed as a percentage. In the Table, C_{max} is the maximum observed blood plasma concentration of the compound of formula 1, AUC (0-24) is the 24-hour AUC blood plasma concentration, and T_{1/2} is the half-life as determined from a concentration versus time plot. The entry "# patients with PK" indicates the number of patients for whom pharmacokinetic data were obtained.

Table 4

Dose Schedule and Amount	# patients / # patients with PK	C _{max} (ng/mL)	AUC (0-24) (ng-hr/mL)	T _{1/2} (hr)
5 mg BID	6/6	27.1 (36)	257 (39)	2.2 (16)
5 mg BID fasted	8/6	54.5 (48)	311 (76)	2.7 (39)
15 mg QD	6/6	78.6 (54)	797 (86)	3.5 (46)
20 mg BID	4/3	129.4 (86)	1524 (87)	3.1 (51)

In addition, patients in the first cohort (n = 6) received individualized doses ranging from 10 mg QD to 30 mg BID (PK not shown). Plasma exposures were higher (about 48%) and intra-patient variability was reduced, in the fasted versus fed state. The maximum tolerated dose (MTD) at the present time has been determined to be 5 mg BID fasted. Dose-limiting toxicities (DLTs) at doses greater than the MTD were hypertension (HTN), seizure, elevated liver function tests, pancreatitis, apnea and stomatitis. In addition, 2 responding patients with NSCLC had fatal hemoptysis, one 3 weeks after stopping the compound treatment. Non-dose-limiting proteinuria was also observed. At doses less than or equal to the MTD, the DLT was limited to grade 2 stomatitis in 1 patient. Non-dose-limiting HTN was observed in 7/14 patients and was managed by conventional hypertensive medications. Two durable partial responses by RECIST criteria were observed (in renal cell and adenoid cystic tumor of the maxillary sinus) and stable disease lasting greater than or equal to 4 month (range 4-13+ months) in 5 patients of this heavily pretreated population. Using dceMRI, preliminary analysis of 21 patients was performed to measure vascular effected induced by the compound of formula 1 at baseline, and on days 2, 28 and 56. The

-21-

percentage change in mean K^{trans} (P.S. Tofts, G. Brix, D.L. Buckley, J.L. Evelhoch, E. Henderson, M.V. Knopp, H.B.W. Larsson, T. Lee, N.A. Mayr, G.J.M. Parker, R.E. Port, J. Taylor and R.M. Weisskoff, Estimating Kinetic Parameters from Dynamic Contrast-Enhanced T₁-Weighted MRI of a Diffusible Tracer: Standardized Quantities and Symbols, Journal of Magnetic Resonance Imaging, 10.223-232 (1999)) and initial area under the contrast intensity X time curve (AUC) was computed for each index tumor (n = 1-4 per patient). A tumor vascular response was defined as greater than or equal to 50% decrease in baseline parameter values to day 2. Acute (day 2) decreases in tumor vascular response (greater than or equal to 50% decrease in K^{trans} and AUC) were observed in 6/18 evaluable patients, and 11/18 demonstrated a greater than or equal to 40% decrease in both K^{trans} and AUC. Due to technical issues with the scans, 3/21 image sets were not evaluable. This example shows that the compound of formula 1 is a highly active agent as manifested by clinical response and acute tumor vascular changes.

Example 3

Following oral administration of a 30 mg free base/kg dose of [¹⁴C]-labeled compound of formula 1 to intact or bile duct-cannulated beagle dogs, extensive metabolism was observed. Biotransformation pathways included oxygenation (mono- or di-), glucuronidation, glucosylation, and oxygenation followed by either sulfation or glucosylation. Figure 1 shows the identified metabolites. In plasma, M12 (an N-oxide) is the only metabolite detectable. In urine, M5 (a depyridinyl carboxylic acid) is the major metabolite. The major biliary metabolites include M8 (a sulfate) and M12. The chemical structure of the major fecal metabolite M1 remains unknown.

Excretion patterns for [¹⁴C]-derived radioactivity in beagle dogs following a single oral dose of the compound were similar for males and females, with radioactivity excreted primarily via feces. Mean recoveries for intact males were 85.5% in feces and 5.3% in urine, compared to recoveries of 80.9% in feces and 7.0% in urine for intact females. Bile duct-cannulated male dogs excreted a relatively small fraction of radioactivity in bile (8.3% recovery), with additional radioactivity recovered in feces (52.7%) and urine (11.3%). The combined total of urinary and biliary radioactivity from bile duct-cannulated dogs suggests that approximately 20% of administered radioactivity underwent gastrointestinal absorption. The total mean recoveries in all samples were 92.4% and 92.6% for intact males and females, respectively, and 89.6% for bile duct-cannulated males. All metabolite profiling and structure elucidation were performed using HPLC coupled in-line with radio-HPLC detector (β-RAM) and MS detection with electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources in positive or negative mode.

Example 4

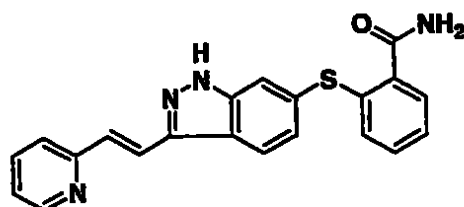
The compound of formula 1 undergoes extensive metabolism in CD-1 mice following single oral administration of the [¹⁴C]-labeled compound. A low percentage of unchanged drug was recovered in urine and feces, and a variety of phase I and phase II metabolites were observed. Biotransformation pathways included oxygenation (mono- or di-), glucuronidation, glucosylation and oxygenation followed by either glucuronidation or glucosylation. The metabolites identified are

-22-

shown in Figure 2. In plasma, unchanged drug and M12 (an *N*-oxide) represented the two major components. M7 (a glucuronide) represented the most significant metabolite in both urine and feces.

The majority of [^{14} C]-derived radioactivity was recovered in feces following a single oral administration of 50 mg free base/kg dose of [^{14} C]AG-013736 to male CD-1 mice.¹ Mean ($n = 2$) recoveries of the radioactivity (% of dose) at 48 hours postdose were 65.8% in feces and 12.7% in urine. The rate of elimination of radioactivity in excreta was rapid with ~72% of the dose recovered within 24 hours postdose. Radioactivity profiling and structure characterization of metabolites was performed using LC-RAM-MS methods.

In addition to the metabolites shown in Figures 1 and 2, other known metabolites include the active des-methyl metabolite shown in formula 1a.



1a

Example 5

Angiogenesis was assessed by measuring tumor microvessel density (MVD) using immunohistochemistry. Frozen tumor sections were stained for vessel surface marker CD-31 and the amount of vessels in several fields of the tissue section were quantified manually. Studies demonstrated that PO BID administration of the compound of formula 1 for 2 to 3 weeks reduced the number of blood vessels in treated tumors by 70% compared with the control tumors. This decrease of microvessel density after treatment was observed across all tumor models used, including the LLC, MV522, and M24met. When delivered continuously via an osmotic Alzet pump in the LLC tumor model, the compound of formula 1 produced a significant growth inhibition. Data from 3 studies indicated that the maximum tumor growth inhibition that can be achieved by this class of agent in the LLC model was 78%. At plasma concentrations as low as 55 ± 17 ng/mL ($N = 3$), 90% of maximum growth inhibition was achieved. This concentration was designated as the biologically active concentration (BAC). The 50% maximum growth inhibition was associated with a plasma concentration of 28 ± 11 ng/mL ($N = 3$). This concentration was designated as the minimal efficacious concentration (MEC). In 1 study group, 70% of MGI produced by continuous infusion of the compound was associated with an $AUC_{(0-24)}$ of 574 ng·hr/mL, whereas in the same study an $AUC_{(0-24)}$ of 720 ng h/mL after PO BID dosing resulted in a 40% maximal growth inhibition (MGI). These results suggest that antitumor efficacy seen in this model is driven by trough concentration and that in mice, a continuous low concentration of the compound may be sufficient to produce maximal antitumor efficacy.

The compound of formula 1 was efficacious as a single agent in the human breast carcinoma xenograft model MDA-MB-231. In preparation for an efficacy study with the

combination of the compound of formula 1 and docetaxel in this model, a preliminary study in naive nude mice was conducted to determine the effect of potential drug-drug interactions on PK and tolerability. Following IV administration of 15 or 30 mg/kg docetaxel once per week for 3 weeks, a decrease in body weight (7% and 11%, respectively) compared with control was identified in docetaxel-treated animals. No difference in body weight was noted between animals treated with docetaxel alone and those given the combination of docetaxel and the compound of formula 1 (30 mg/kg/day for 16 days; PO). Docetaxel administration did not affect the AUC of the compound of formula 1, whereas C_{max} values of AG-013736 were reduced significantly in the combination groups compared with the compound of formula 1 alone

Histologic examination of selected tissues (liver, kidneys, heart, spleen, stomach, small and large intestines, ovaries, sternum, joint) revealed no target organ effects in mice treated with the compound of formula 1 as a single agent in this study. Changes noted in docetaxel-treated mice included ovarian follicular necrosis and minimal to mild bone marrow hypocellularity. The combined treatment of the compound of formula 1 and docetaxel did not exacerbate the effect of docetaxel on the ovary, but an increased intensity of bone marrow hypocellularity was noted (minimal to moderate) in animals given the compound of formula 1/docetaxel combination. In addition, bone marrow hemorrhage was observed in combination-treated animals, likely a secondary effect of the increased intensity of hypocellularity.

the compound of formula 1 and docetaxel were combined for efficacy assessment in the MDA-MB-231 tumor model. The compound of formula 1 alone (25, 5, and 1 mg/kg, PO, BID, given for 3 weeks) resulted in dose-dependent tumor growth inhibition. Docetaxel alone (IV, weekly) at 20 and 10 mg/kg, but not 2 mg/kg, was also efficacious. It appeared that there might be a beneficial therapeutic interaction between the compound of formula 1 and docetaxel. This benefit was more evident when combining the agents at both the high and middle doses. The incidences of partial regression (16% to 97% reduction in tumor size) and complete responses in the high- and middle-dose combination arms were much greater than those in the groups of individual agent alone at the same doses. Due to limited groups and relatively short time frame of the study, this is not a definitive finding. The compound of formula 1 was well-tolerated at all doses. There was a 3% to 7% decline of the average body weight in the high-dose combination group (25 mg/kg compound 1 and 20 mg/kg docetaxel) after the third dose of the chemotherapeutic agent, compared with all the other groups. Pharmacokinetic analysis demonstrated that the AUC values of the compound of formula 1 were not affected in the presence of docetaxel, but values of C_{max} were reduced significantly in the combination groups compared with the compound of formula 1 alone group.

Anti-tumor efficacy of the compound of formula 1 in combination with docetaxel was investigated in the LLC model. The LLC model is highly resistant to docetaxel. At the reported MTD (30 mg/kg weekly dose, iv) little tumor growth delay (TGD) was seen with the cytotoxic agent (TGD = 3.2 days). All mice were euthanized within 28 days of experiment due to large primary tumors. In contrast, single agent compound of formula 1 generated dose-dependent and statistically significant TGD (13.4 days at 10 mg/kg and 15.4 days at 30 mg/kg, PO, BID).

-24-

However, the agent only delayed, but didn't stop, metastasis to the lung. The TGD (20.4 days) of the high dose combination group, but not the low dose combination group (TGD = 15.2 days), was statistically different from either of the single agents alone ($P = 0.0079$ and $P = 0.254$, respectively). More animals (3/10) reached objective end point in the high dose combination group, but not in the low dose combination group. In conclusion, high dose combination therapy of the compound of formula 1 and docetaxel can generate greater delay of primary tumor growth and metastasis than either monotherapy alone, but it does not result in a complete cure.

One study using the MV522 tumor model demonstrated that a single daily (QD) 60 mg/kg PO dose of the compound of formula 1 resulted in a similar tumor growth inhibition effect as did 30 mg/kg PO, BID ($p = 0.154$). In addition, antitumor efficacy did not appear to be compromised when dosed PO, BID at 30 mg/kg for 5 consecutive days followed by 2 dosing holidays, compared with the daily PO BID using the same dose concentration ($p = 0.223$). These results suggest that in this nonclinical tumor model, it might be possible to give the compound of formula 1 with either QD or certain interim dosing scheduling and expect to achieve significant antitumor efficacy.

The amount of time of receptor inhibition and concentrations of the compound of formula 1 required to produce anti-tumor efficacy in the MV522 xenograft model were investigated. The results showed that with PO dosing (QD or BID), an approximately 24-hour daily exposure above the EC_{50} (5 ng/mL) was necessary for a $\geq 50\%$ antitumor efficacy. A minimum of 4-hour daily exposure at plasma concentration of ≥ 40 -60 ng/mL was necessary in order to achieve a 90% tumor growth inhibition. An exposure beyond the above threshold did not warrant additional efficacy. There was a similar body weight loss in either the BID or the QD group; both were under 5%. Thus, given the appropriate dose and time of exposure, the QD regimen may be as effective as the BID regimen.

It was also demonstrated that continuous exposure via the Alzet pumps generated greater antitumor efficacy by the compound of formula 1 as compared with regular periodic dosing. Delivery by the pumps at 10 mg/mL produced a constant average systematic exposure of 30 ng/mL, which resulted in tumor stasis. In contrast, saturating doses (PO, BID), which yielded plasma concentrations of the compound of formula 1 above projected EC_{50} , could only generate tumor growth delay. Thus, continuous systematic exposure of the compound of formula 1 appeared to be more effective than the twice daily oral dosing regimen in treating the tumor.

Anti-tumor efficacy of the compound of formula 1 using an intermittent dosing regimen was also studied. The treatment groups were as follows: daily dosing vehicle, intermittent vehicle, daily dose of 30 mg/kg (BID), and an intermittent dose of 30 mg/kg. The intermittent dosing schedule was as follows: Cycle-1 (Days 12 ~ 18 – dosing on and Days 19 ~ 28 – dosing off), and Cycle 2 (Days 29 ~ 36 – dosing on and Days 37 ~ 44 – dosing off). Dosing started when the average tumor size was 250 mm³; all were given AG-013736 (PO, BID). Overall, there was a significant difference between the intermittent and daily BID dosing, with the continual, daily dosing regimen being more effective in generating growth delay. For the intermittently dosed drug group, tumors regained normal growth rate within 3-4 days after dosing was stopped. However, tumor growth inhibition

-25-

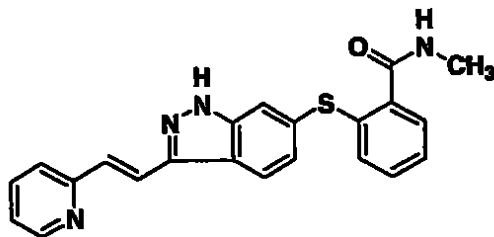
resumed within 2 days of the Cycle-2 dosing. As expected, no regression was seen in any of the groups.

While the invention has been illustrated by reference to specific and preferred embodiments, those skilled in the art will recognize that variations and modifications may be made through routine experimentation and practice of the invention. Thus, the invention is intended not to be limited by the foregoing description, but to be defined by the appended claims and their equivalents.

-26-

We Claim

1. A dosage form for administration to a mammal, the dosage form comprising a compound of formula 1:



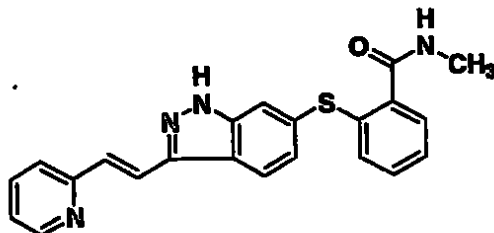
1

a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, or a mixture thereof, in an amount effective to provide a 24-hour AUC blood plasma value of from 25 to 4500 ng-hr/mL of the compound of formula 1 or active metabolites thereof, after administration to the mammal

2. The dosage form of claim 1, wherein the 24-hour AUC blood plasma value is from 100 to 800 ng-hr/mL.

3. The dosage form of claim 1, wherein the dosage form is an oral dosage form.

4. A dosage form comprising a compound of formula 1:



1

a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, or a mixture thereof, in an amount of from 0.5 to 30 mg

5. The dosage form of claim 4, wherein the amount is from 2 to 10 mg.

6. The dosage form of claim 4, wherein the dosage form is an oral dosage form.

7. A method of treating abnormal cell growth in a mammal, the method comprising administering to the mammal the dosage form of any of claims 1-6.

8. The method of claim 7, wherein the dosage form is administered orally

9. The method of claim 7 or 8, wherein the dosage form is administered at a dosage frequency of at least once per day

-27-

10. The method of claim 7 or 8, wherein the dosage form is administered at a dosage frequency of at least twice per day

5 11. The method of any of claims 7-10, wherein the mammal fasts for at least two hours prior to the step of administering, at least two hours after the step of administering, or at least two hours both prior to and after the step of administering

10 12 The method of any of claims 7-11, wherein the abnormal cell growth is cancer

13 The method of claim 12, wherein the cancer is selected from lung cancer, bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, uterine cancer, ovarian cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, colon cancer, breast cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, prostate cancer, chronic or acute leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, and combinations thereof

14 The method of any of claims 7-13, wherein the method further comprises co-administering an anti-tumor agent selected from the group consisting of mitotic inhibitors, alkylating agents, anti-metabolites, intercalating antibiotics, growth factor inhibitors, cell cycle inhibitors, enzymes, topoisomerase inhibitors, biological response modifiers, antibodies, cytotoxics, anti-hormones, anti-androgens and mixtures thereof

15. The method of claim 14, wherein the anti-tumor agent is docetaxel.

30

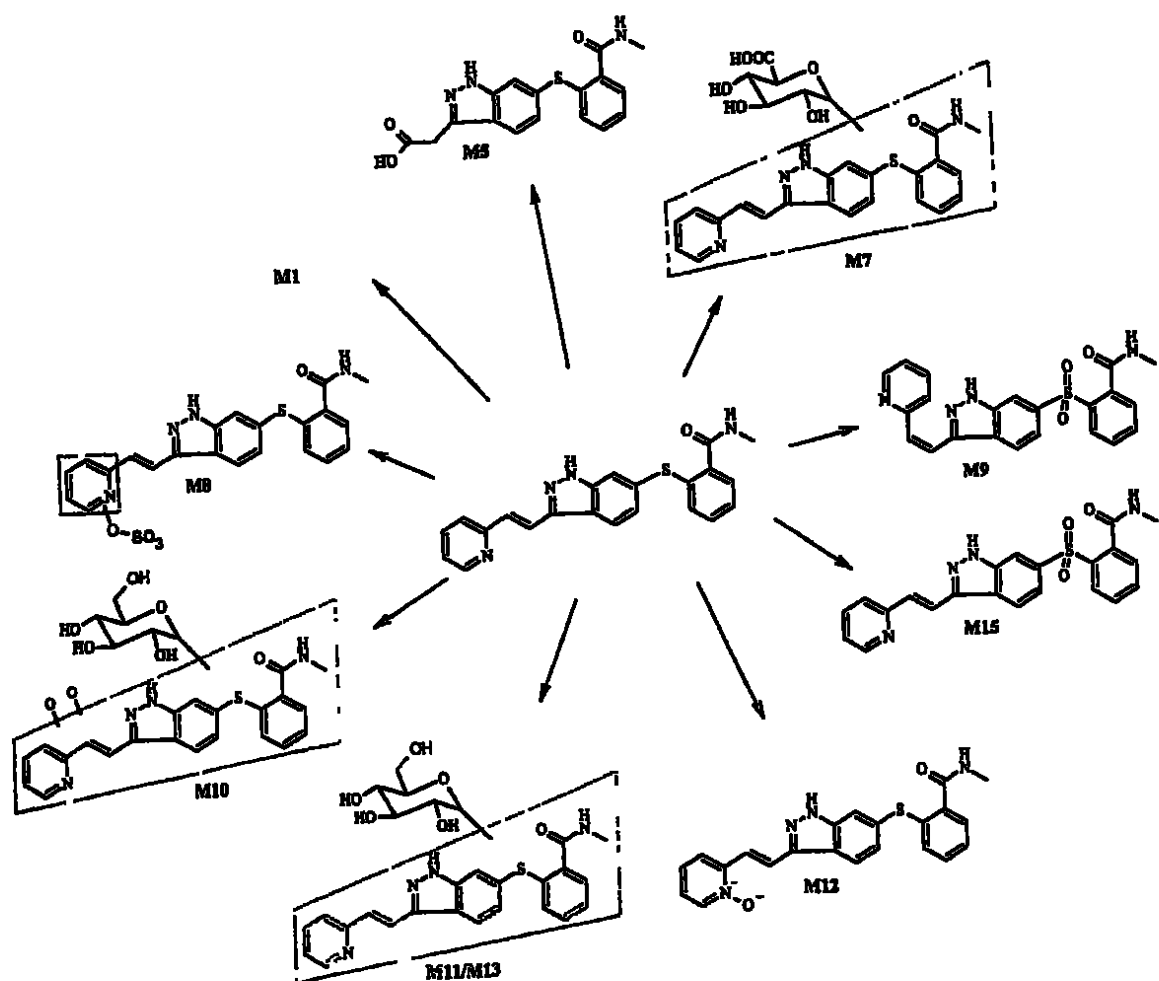


FIG. 1

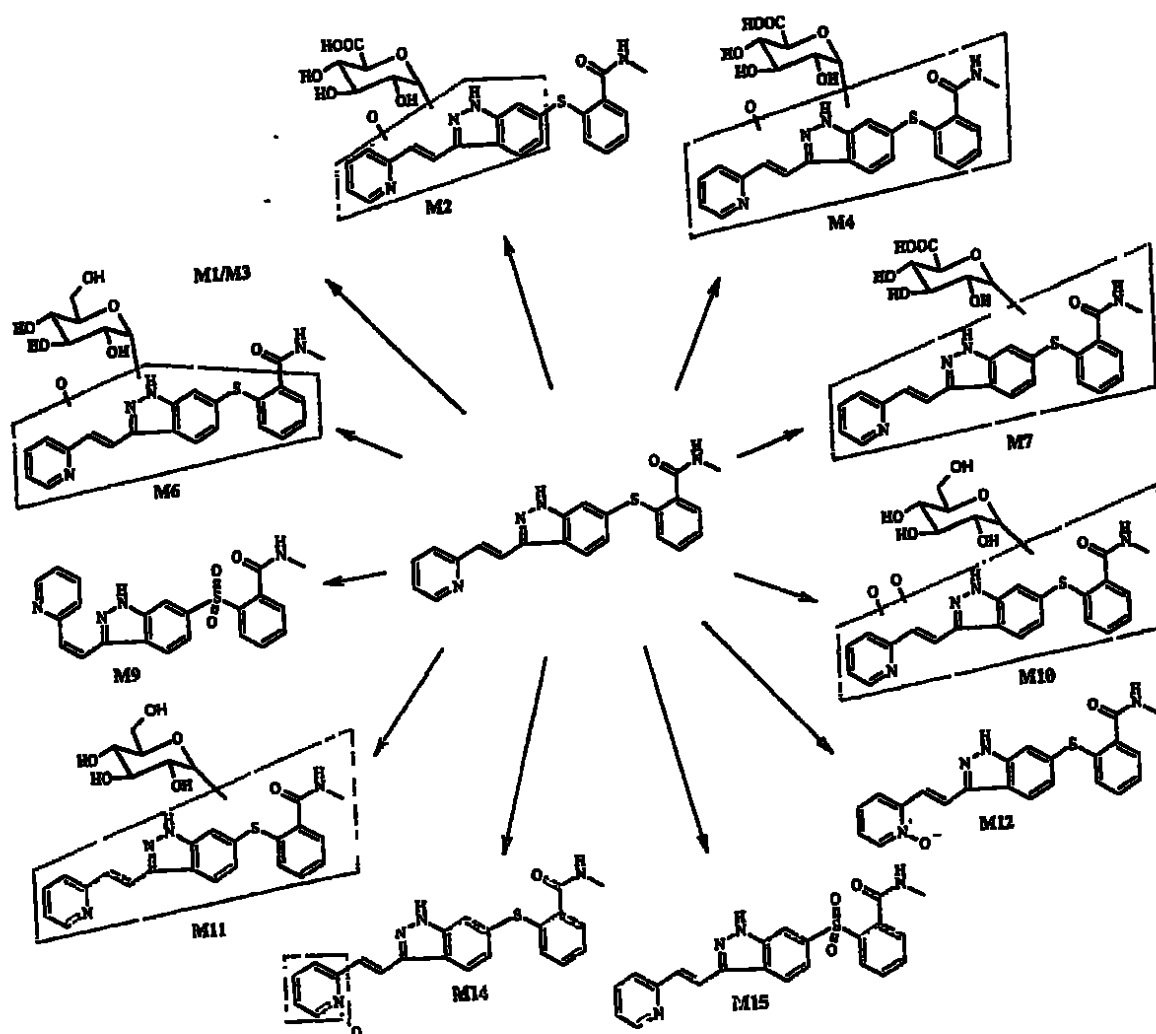


FIG. 2

FORMAS DE DOSIFICACIÓN Y PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO
QUE USAN INHIBIDORES DEL VEGFR

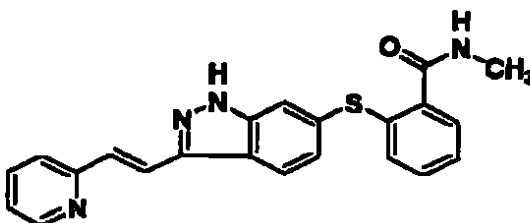
La presente solicitud reivindica las ventajas de la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/460.695, presentada el 3 de Abril de 2003, y la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/491.771, presentada el 31 de Julio de 2003, cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencias en su totalidad.

10

Antecedente de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores del VEGFR que son útiles en el tratamiento del crecimiento celular anormal, tal como el cáncer, en mamíferos. La presente invención también se refiere a un procedimiento para el uso de tales compuestos en el tratamiento del crecimiento celular anormal en mamíferos, en especial humanos, y a composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos.

El compuesto 6-[2-(metilcarbamoil)fenilsulfanil]-3-E-[2-(piridin-2-il)etenil]indazol, representado por la fórmula 1



1

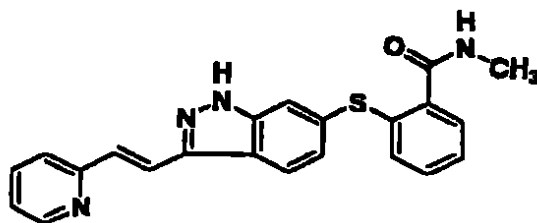
es un inhibidor potente y selectivo de las tirosin-quinazas en VEGFR/PDGFR con una gran actividad preclínica en modelos de injerto heterólogo de cáncer

de colon, melanoma, cáncer de mama y pulmón (Hu-Lowe D, Heller D, Brekken J, Feeley R, Amundson K, Haines M, Troche G, Kim Y, González D, Herrman M, Batugo M, Vekich S, Kania R, McTigue M, Gregory S, Bender S, Shalinsky D, Pharmacological Activities of AG013736, a Small Molecule Inhibitor of VEGF/PDGF Receptor Tyrosin Kinases; Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2002; abstract #5357). Las respuestas vasculares a tumores preclínicos medidas empleando MRI mejorado de contraste dinámico (dceMRI) han mostrado que se corresponden con el índice de crecimiento tumoral (Wilmes LJ, Hylton NM, Wang D, Fleming LM, Gibbs J, Kim Y, Dillon R, Brasch RC, Park JW, Li K-L, Henry RG, Partridge SC, Shalinsky DR, Hu-Lowe D, McShane TM, y Pallavicini MG, AG013736, a Novel VEGFR TK Inhibitor, Suppresses Tumor Growth and Vascular Permeability in Human BT474 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice"; Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003; Abstract #3772).

15

Sumario de la invención

La invención proporciona formas de dosificación y procedimientos de tratamiento que usan un compuesto de fórmula



1

que puede denominarse de forma sistemática como 6-[2-(metilcarbamoil)fenilsulfanil]-3-E-[2-(piridin-2-il)etenil]indazol.

20

En una realización la invención proporciona una forma de dosificación

para la administración a un mamífero, la forma de dosificación comprende el compuesto de fórmula 1, una sal, solvato o precursor farmacéutico farmacéuticamente aceptable del mismo, o una mezcla de los mismos, en una cantidad efectiva para proporcionar un valor en plasma sanguíneo AUC (área
5 bajo la curva) a las 24 horas de no más de 4500 ng·hr/ml del compuesto de fórmula 1 o metabolitos activos del mismo, tras la administración al mamífero. Los valores en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas se pueden determinar como se describe en la descripción detallada del presente documento.

En los aspectos específicos de esta realización, el límite superior del
10 valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas es de no más de 4000 ng·hr/ml o no más de 3000 ng·hr/ml o no más de 2500 ng·hr/ml o no más de 2000 ng·hr/ml o no más de 1500 ng·hr/ml o no más de 1000 ng·hr/ml o no más de 800 ng·hr/ml o no más de 700 ng·hr/ml. Preferiblemente, y en combinación con cualquiera de los citados límites superiores, el valor en plasma sanguíneo AUC
15 a las 24 horas es de al menos 10 ng·hr/ml o al menos 25 ng·hr/ml o al menos 50 ng·hr/ml o al menos 75 ng·hr/ml o al menos 100 ng·hr/ml o al menos 125 ng·hr/ml. Los intervalos contemplados de valores en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas incluyen intervalos desde cualquiera de los límites inferiores mencionados hasta cualquiera de los límites superiores mencionados.
20 Ejemplos no limitativos, específicos, de intervalos preferidos incluyen de 25 a 4500 ng·hr/ml, 50 a 2500 ng·hr/ml, de 75 a 1000 ng·hr/ml, de 100 a 800 ng·hr/ml y de 125 a 700 ng·hr/ml.

En otra realización la invención proporciona una forma de dosificación que comprende el compuesto de fórmula 1 tal como se definió anteriormente,
25 una sal, solvato o precursor farmacéutico farmacéuticamente aceptable del

mismo, o una mezcla de los mismos, en una cantidad de no más de 30 mg. Se debería apreciar que cuando todo o parte del compuesto está en la forma de dosificación como una sal, solvato o precursor farmacéutico, la cantidad es la cantidad equivalente del compuesto de fórmula 1, lo cual es calculado
5 fácilmente por un especialista en la técnica en base a las masas molares.

En los aspectos específicos de esta realización, el límite superior de la cantidad es de no más de 20 mg o no más de 15 mg o no más de 12 mg o no más de 10 mg o no más de 8 mg o no más de 7 mg. Preferiblemente, y en combinación con cualquiera de los límites superiores mencionados, la cantidad
10 es de al menos 0,5 mg o al menos 1 mg o al menos 1,5 mg o al menos 2 mg o al menos 2,5 mg o al menos 3 mg. Los intervalos contemplados incluyen intervalos desde cualquiera de los límites inferiores mencionados hasta cualquiera de los límites superiores mencionados. Ejemplos no limitativos, específicos, de intervalos preferidos incluyen de 0,5 a 30 mg, de 1 a 20 mg, de
15 1,5 a 15 mg, de 2 a 10 mg, de 2,5 a 8 mg y de 3 a 7 mg.

La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, que incluye un humano, mediante la administración al mamífero del compuesto de fórmula 1 como se definió anteriormente, una sal, solvato o precursor farmacéutico farmacéuticamente
20 aceptable del mismo, o una mezcla del mismo, en una cantidad efectiva para proporcionar un valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas de no más de 4500 ng·hr/ml del compuesto de fórmula 1 o metabolitos activos del mismo, después de la administración al mamífero. Los valores en plasma sanguíneo AUC se pueden determinar como se describe en la descripción detallada del
25 presente documento.

En los aspectos específicos de esta realización, el límite superior del valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas es de no más de 4000 ng·hr/ml o no más de 3000 ng·hr/ml o no más de 2500 ng·hr/ml o no más de 2000 ng·hr/ml o no más de 1500 ng·hr/ml o no más de 1000 ng·hr/ml o no más de 800 ng·hr/ml o no más de 700 ng·hr/ml. Preferiblemente, y en combinación con cualquiera de los citados límites superiores, el valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas es de al menos 10 ng·hr/ml o al menos 25 ng·hr/ml o al menos 50 ng·hr/ml o al menos 75 ng·hr/ml o al menos 100 ng·hr/ml o al menos 125 ng·hr/ml. Los intervalos contemplados de valores en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas incluyen intervalos desde cualquiera de los límites inferiores mencionados hasta cualquiera de los límites superiores mencionados. Ejemplos no limitativos, específicos, de intervalos preferidos incluyen de 25 a 4500 ng·hr/ml, de 50 a 2500 ng·hr/ml, de 75 a 1000 ng·hr/ml, de 100 a 800 ng·hr/ml y de 125 a 700 ng·hr/ml.

La invención proporciona además un procedimiento de tratamiento del crecimiento anormal celular en un mamífero, incluyendo un humano, mediante la administración al mamífero del compuesto de fórmula 1 como se definió anteriormente, una sal, solvato o precursor farmacéutico farmacéuticamente aceptable del mismo, o una mezcla de los mismos, en una cantidad de no más de 30 mg por dosis. Se debería apreciar que cuando todo o parte del compuesto está en la forma de dosificación como una sal, solvato o precursor farmacéutico, la cantidad es la cantidad equivalente del compuesto de fórmula 1, la cual es fácilmente calculada por un especialista en la técnica en base a las masas molares.

En los aspectos específicos de esta realización, el límite superior de la

cantidad es de no más de 20 mg o no más de 15 mg o no más de 12 mg o no más de 10 mg o no más de 8 mg o no más de 7 mg. Preferiblemente, y en combinación con cualquiera de los límites superiores mencionados, la cantidad es de al menos 0,5 mg o al menos 1 mg o al menos 1,5 mg o al menos 2 mg o al menos 2,5 mg o al menos 3 mg. Lo intervalos contemplados incluyen intervalos desde cualquiera de los límites inferiores mencionados hasta cualquiera de los límites superiores mencionados. Ejemplos no limitativos, específicos, de intervalos preferidos incluyen de 0,5 a 30 mg, de 1 a 20 mg, de 1,5 a 15 mg, de 2 a 10 mg, de 2,5 a 8 mg y de 3 a 7 mg.

- 10 En una realización específica de cualquiera de los procedimientos de la invención descritos en el presente documento, el crecimiento celular anormal es un cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a estos, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de
- 15 recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello del útero, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides,
- 20 cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, cáncer de vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de las células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), linfoma del CNS primario,
- 25 tumores de la médula espinal, glioma troncoencefálico, adenoma de la

pituitaria, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. En otra realización del mencionado procedimiento el mencionado crecimiento celular anormal es una enfermedad proliferativa benigna, que incluye, pero sin limitarse a estas, psoriasis, hipertrofia prostática benigna o restinosis.

5 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de la migración de células cancerígenas mediada por PDGFR BB en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente aceptable del compuesto de fórmula 1.

10 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de inhibición de la actividad de c-KIT en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente aceptable del compuesto de fórmula 1.

15 En realizaciones específicas adicionales de cualquiera de los procedimientos de la invención descritos en el presente procedimiento, el procedimiento comprende además la administración al mamífero de una cantidad de una o más sustancias seleccionadas entre agentes anti-tumorales, agentes anti-angiogénesis, inhibidores de transducción de señal y agentes anti-proliferativos, tales cantidades son efectivas juntas en el tratamiento del mencionado crecimiento celular anormal. Las mencionadas sustancias incluyen
20 aquellas descritas en la publicación PCT números WO 00/38715, WO 00/38716, WO 00/38717, WO 00/38718, WO 00/38719, WO 00/38730, WO 00/38665, WO 00/37107 y WO 00/38786, las descripciones de los mismos se incorporan al presente documento como referencias en su totalidad.

25 Los ejemplos de agentes anti-tumorales incluyen inhibidores mitóticos, por ejemplo derivados alcaloides de la vinca tales como vinblastina vinorelbina,

vindescina y vincristina; colquinas alocoquina, halicondrina, ácido colquicínico del éter N-benzoiltrimetil-metillico, dolastatina 10, maistansina, rizoxina, taxanos tales como el paclitaxel (TaxolTM), docetaxel (TaxotereTM), 2'-N-[3-(dimetilamino)propil]glutaramato (derivado del TaxolTM), tiocolquicina, 5 tritilcisteína, teniposida, metotrexato, azatioprina, fluorouracilo, citoquina arabinosida, 2,2'-difluorodexoicitidina (gemcitabina), adriamicina y mitamicina. Agentes de alquilación, por ejemplo cis-platina, carboplatín oxiplatina, iproplatina, éster etílico de N-acetil-DL-sarcosil-L-leucina (Asaley o Asalex), éster dietílico (diaziquona) y 2,5-bis(1-azirdinil)-3,6-dioxodietílico del ácido 1,4- 10 ciclohexadien-1,4-dicarbámico, 1,4-bis(metanosulfonilo)butano (bisulfano o leucosulfano) clorozotocina, clomesona, cianomorfolinodoxorubicina, ciclodisona, dianhidroglactitol, fluorodopano, hepsulfam, mitomicina C, hicanteonemitomicina C, mitozolamida, diclorhidrato de 1-(2-cloroetil)-4-(3-cloropropil)-piperazina, piperazindiona, piprobromano, porfiromicina, mostaza 15 espirohidantoina, teroxirona, tetraplatina, tiotepa, trietilenmelamina, mostaza uracilnitrogenada, clorhidrato de bis(3-mesiloxipropil)amina, mitomicina, agentes de nitrosoureas tales como ciclohexil-cloroetilnitrosourea, metilciclohexil-cloroetilnitrosourea, 1-(2-cloroetil)-3-(2,6-dioxo-3-piperidil)-1-nitroso-urea, bis-(2-cloroetil)nitrosourea, procarbazona, dacarbazona, 20 compuestos relacionados con la mostaza nitrogenada tales como la mecloroetamina, ciclofosfamida, ifosamida, melfalano, cloroambucilo, fosfato de estramustinsodio, stroptozolna y temozolamida. Anti-metabolitos de ADN, por ejemplo el 5-fluorouracilo, citosinarabinosida, hidroxiaurea, 2-[(3-hidroxi-2-pirinodinil)metilen]-hidrazincarbotoamida, deoxifluorouridina, tiosemicarbazona 25 de 5-hidroxi-2-formilpiridina, alfa-2'-deoxi-6-tioguanosina, glicinato de

afidicolina, 5-azadeoxicitidina, deoxiribosida de beta-tioguanidina, ciclocitidina, guanazol, glicodialdehído de inosina, macbecina II, pirazolimidazol, cladribina, pentostatina, tioguanidina, mercaptopurina, bleomicina, 2-clorodeoxiadenosina, inhibidores de trimidilatosintasa tales como compuestos disódicos raltitrexados y pemetrexados, clofarabina, floxuridina y fludarabina. Anti-metabolitos de ADN/ARN, por ejemplo, L-alanosina, 5-azacitidina, acivicina, aminopterina y derivados de los mismos tales como el ácido N-[2-cloro-5-[[[2, 4-diamino-5-metil-6-quinazolinil)metil]amino]benzoil]-L-aspártico, ácido N-[4-[[2, 4-diamino-5-etil-6-quinazolinil)metil]amino]benzoil]-L-aspártico, N-[2-cloro-4-[[[2,4-diaminopteridinil)metil]amino]benzoil]-L-aspártico, anfitol de Baker soluble, lawsone diloroalflica, brequinar, ftoraf, dihidro-5-azacitidina, metotrexato, sal tetrasódica del ácido N-(fosfonoacetil)-L-aspártico, pirazofurano, trimetrexato, plicamicina, actinomicina D, criptoficina y análogos tales como la criptoficina-52 o, por ejemplo, uno de los anti-metabolitos preferidos descritos en la solicitud de patente europea nº 239362 tales como el ácido N-(5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoíl)-L-glutámico; inhibidores del factor de crecimiento; inhibidores del ciclo celular; antibióticos para intercalación, por ejemplo adriamicina y bleomicina; proteínas, por ejemplo interferona; y antihormonas, por ejemplo anti-estrógenos tales como NolvadexTM (tamoxifeno) o, por ejemplo anti-andrógenos tales como CasodexTM (4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil)propionanilida). El mencionado tratamiento conjunto se puede conseguir por medio de dosificación simultánea, secuencial o por separado de los componentes individuales del tratamiento.

25 Los agentes anti-angiogénesis incluyen inhibidores de MMP-2

(metaloproteinasa de matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9), e inhibidores de la COX-II (ciclooxigenasa II). Ejemplos de inhibidores de la COX-II útiles incluyen CELEBREXTM (alecoxib), valdecoxib y rofecoxib. Ejemplos de inhibidores de metaloproteinasa de matriz útiles se describen en el

5 documento WO 96/33172 (publicado el 24 de Octubre de 1996), documento WO 96/27583 (publicado el 7 de Marzo de 1996), solicitud de patente europea nº 97304971,1 (presentada el 8 de Julio de 1997), solicitud de patente europea nº 99308617,2 (presentada el 29 de Octubre de 1999), documento WO 98/07697 (publicado el 26 de Febrero de 1998), documento WO 98/03516

10 (publicado el 29 de Enero de 1998), documento WO 98/34918 (publicado el 13 de Agosto de 1998), documento WO 98/34915 (publicado el 13 de Agosto de 1998), documento WO 98/33768 (publicado el 6 de Agosto de 1998), documento WO 98/30566 (publicado el 16 de Julio de 1998), publicación de patente europea 606.046 (publicada el 13 de Julio de 1994), publicación de

15 patente europea 931.788 (publicada el 28 de Julio de 1999), documento WO 90/05719 (publicado el 31 de Mayo de 1990), documento WO 99/52910 (publicado el 21 de Octubre de 1999), documento WO 99/52889 (publicado el 21 de Octubre de 1999), documento 99/29667 (publicado el 17 de Junio de 1999), solicitud de patente internacional PCT nº PCT/IB98/01113 (presentada

20 el 21 de Julio de 1998), solicitud de patente europea nº 99302232,1 (presentada el 25 de Marzo de 1999), solicitud de patente de Gran Bretaña número 9912961,1 (presentada el 3 de Junio de 1999), solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/148.464 (presentada el 12 de Agosto de 1999), patente de Estados Unidos 5.863.949 (expedida el 26 de Enero de 1999), patente de

25 Estados Unidos 5.861.510 (expedida el 19 de Enero de 1999) y publicación de

patente europea 780.386 (publicada el 25 de Junio de 1997), todas ellas se incorporan al presente documento como referencias en su totalidad. Los inhibidores de MMP-2 y MMP-9 son aquellos que presentan poca o ninguna actividad de inhibición de la MMP-1. Más preferiblemente, son aquellos que

5 inhiben de forma selectiva la MMP-2 y/o la MMP-9 respecto a otras metaloproteinasas de matriz (es decir, MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13).

Ejemplos de inhibidores de MMP incluyen el AG-3340, RO 32-3555, RS 13-08030 y los compuestos citados en la siguiente lista:

- 10 Ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoíl-ciclopentil)-amino]-propiónico;
- Hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]-octan-3-carboxílico;
- Hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-
- 15 bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidina-2-carboxílico;
- Hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfinilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico;
- Ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfinil]-(1-hidroxicarbamoíl-ciclobutil)-amino]-propiónico;
- 20 Hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfinilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico;
- Hidroxiamida del ácido 3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfinilamino]-tetrahidro-piran-3-carboxílico;
- Hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-
- 25 bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidina-2-carboxílico;

Ácido 3[[4-(4-fluoro-4-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil)-amino]-propiónico;

Ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfinil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahydro-piran-4-il)-amino]-propiónico;

5 Hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]-octan-3-carboxílico;

Hidroxiamida del ácido 3-endo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]-octan-3-carboxílico; y

10 Hidroxiamida del ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfinilamino]-tetrahydro-furan-3-carboxílico;

y las sales, solvatos y precursores farmacéuticos farmacéuticamente aceptables de los mencionados compuestos.

Los ejemplos de inhibidores de transducción de señal incluyen agentes que pueden inhibir las respuestas del EGFR (receptor del factor de crecimiento de la epidermis), tales como anticuerpos del EGFR, anticuerpos del EGF y moléculas que sean inhibidores del EGFR; inhibidores del VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular); e inhibidores del receptor erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se unen al receptor erbB2, por ejemplo, HERCEPTIN™ (Genentech, Inc. de South San Francisco, California, Estados Unidos).

Los inhibidores del EGFR se describen, por ejemplo, en el documento WO 95/19970 (publicado el 27 de Julio de 1995), documento WO 98/14451 (publicado el 9 de Abril de 1998), documento WO 98/02434 (publicado el 22 de Enero de 1998) y la patente de Estados Unidos 5.747.498 (expedida el 5 de Mayo de 1998). Los agentes inhibidores del EGFR incluyen, pero sin limitarse a

estos, los anticuerpos monoclonales C225 y los anti-EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated of New York, Nueva York, Estados Unidos), los compuestos ZD-1839 (AstraZeneca), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), MXD-447 (Medarex Inc. of Annandale, Nueva Jersey, Estados Unidos), y OLX-103
5 (Merck & Co. de Whitehouse Station, Nueva Jersey, Estados Unidos), VRCTC-310 (Ventech Research) y la toxina de fusión EGF (Seragen Inc. de Hopkinton, Massachussets).

Los inhibidores del VEGF, por ejemplo el SU-5416 y el SU-6668 (Sugen Inc., de South San Francisco, California, Estados Unidos), se pueden combinar
10 también o administrar conjuntamente con un compuesto de fórmula 1. Los inhibidores del VEGF se describen, por ejemplo, en el documento WO 99/24440 (publicado el 20 de Mayo de 1999), la solicitud internacional PCT PCT/IB99/00797 (presentada el 3 de Mayo de 1999), en el documento WO 95/21613 (publicado el 17 de Agosto de 1995), documento WO 99/61422
15 (publicada el 2 de Diciembre de 1999), patente de Estados Unidos 5.834.504 (expedida el 10 de Noviembre de 1998), documento WO 98/50356 (publicado el 12 de Noviembre de 1998), patente de Estados Unidos 5.883.113 (expedida el 16 de Marzo de 1999), patente de Estados Unidos 5.886.020 (expedida el 23 de Marzo de 1999), patente de Estados Unidos 5.792.783 (expedida el 11 de
20 Agosto de 1998), documento WO 99/10349 (publicado el 4 de Marzo de 1999), documento WO 97/323856 (publicado el 12 de Septiembre de 1997), documento WO 97/22596 (publicado el 26 de Junio de 1997), documento WO 98/54093 (publicado el 3 de Diciembre de 1998), documento WO 98/02438 (publicado el 22 de Enero de 1998), documento WO 99/16755 (publicado el 8
25 de Abril de 1999) y el documento WO 98/02437 (publicado el 22 de Enero de

1998), todos ellos se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad. Otros ejemplos de inhibidores del VEGF específicos son el IM862 (Cytran Inc. de Kirkland, Washington, Estados Unidos); bevacizumab anticuerpo monoclonal anti-VEGF (Genentech, Inc. de South San Francisco, California); y angiozima™, un ribozima de Ribozyme (Boulder, Colorado) y Chiron (Emeryville, California).

Los inhibidores del receptor ErbB2, tales como el GW-282974 (Glaxo Wellcome pic) y lo anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc. de Woodlands, Texas, Estados Unidos) y 2B-1 (Chiron), se pueden administrar en combinación con un compuesto de fórmula 1. Tales inhibidores del erbB2 incluyen aquellos descritos en el documento WO 98/02434 (publicado el 22 de Enero de 1998), documento WO 99/35146 (publicado el 15 de Julio de 1999), WO 99/35132 (publicado el 15 de Julio de 1999), documento WO 98/02437 (publicado el 22 de Enero de 1998), WO 97/13760 (publicado el 17 de Abril de 1997), documento WO 95/19970 (publicado el 27 de Julio de 1995), patente de Estados Unidos 5.587.458 (expedida el 24 de Diciembre de 1996), y la patente de Estados Unidos 5.877.305 (expedida el 2 de Marzo de 1999), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Los inhibidores del receptor erbB2 útiles en la presente invención se describen también en la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/117.341, presentada el 27 de Enero de 1999 y en la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/117.346, presentada el 27 de Enero de 1999, ambas se incorporan al presente documento como referencias en su totalidad.

Otros agentes antiproliferativos que se pueden emplear incluyen

inhibidores del enzima farnesil-protein-transferasa e inhibidores del receptor tirosin-quinasa PDGFr, incluyendo los compuestos descritos y reivindicados en las siguientes solicitudes de patentes de Estados Unidos: 09/221946 (presentada el 28 de Diciembre de 1998); 09/454058 (presentada el 2 de Diciembre de 1999); 09/501163 (presentada el 9 de Febrero de 2000); 09/539930 (presentada el 31 de Marzo de 2000); 09/202796 (presentada el 22 de Mayo de 1997); 09/384339 (presentada el 26 de Agosto de 1999); y 09/383755 (presentada el 26 de Agosto de 1999); y los compuestos descritos y reivindicados en las siguientes solicitudes de patente provisional de Estados Unidos: 60/168207 (presentada el 30 de Noviembre de 1999); 60/170119 (presentada el 10 de Diciembre de 1999); 60/177718 (presentada el 21 de Enero de 2000); 60/168217 (presentada el 30 de Noviembre de 1999) y 60/200834 (presentada el 1 de Mayo de 2000). Cada una de las anteriores solicitudes de patente y solicitudes de patente provisional se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

El compuesto de fórmula 1 se puede emplear también con otros agentes útiles en el tratamiento del crecimiento celular anormal o cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a estos, agentes capaces de mejorar las respuestas inmunes anti-tumorales, tales como los anticuerpos CTLA4 (antígeno 4 del linfocito citotóxico) y otros agentes capaces de bloquear el CTLA4; y agentes anti-proliferativos tales como otros inhibidores de farnesil-protein-transferasa. Los anticuerpos CTLA4 específicos que se pueden emplear en la presente invención incluyen aquellos que se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos 60/113.647 (presentada el 23 de Diciembre de 1998) la cual se incorpora como referencia al presente documento en su totalidad.

En otra realización la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula 1 o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente efectiva de docetaxel.

- 5 En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, incluyendo un humano, mediante la administración al mamífero del compuesto de fórmula 1, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente efectiva de docetaxel. El compuesto de fórmula 1 y
10 el docetaxel se pueden administrar de forma separada o en la misma composición, y se pueden administrar con el mismo programa de dosificación o en diferentes programas de dosificación como se desee.

Definiciones

- 15 "Crecimiento celular anormal", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra forma, se refiere al crecimiento celular que es independiente de los mecanismos de regulación normales (por ejemplo, pérdida de inhibición por contacto). Esto incluye el crecimiento anormal de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan mediante la
20 expresión de una tirosin-quinasa mutada o sobreexpresión de un tirosin-quinasa receptor; (2) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en la que tiene lugar la activación aberrante de tirosin-quinasa; y (4) cualquier tumor que prolifere mediante los tirosin-quinasa receptores.

- El término "tratar", tal como se usa en el presente documento, a menos
25 que se indique de otra forma, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o

prevenir el trastorno o afección al que tal término aplica, o uno o más síntomas del mencionado trastorno o afección. El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra forma, se refiere al acto de tratar tal como se definió anteriormente "tratar".

5 La frase "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s)", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra forma, incluye sales de grupos ácido y básicos que pueden estar presentes en un compuesto. Los compuestos que son básicos por naturaleza son capaces de formar una amplia variedad de sales con varios ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos que se
10 pueden emplear para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de tales compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición de ácidos no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como las sales de acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro,
15 edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, clavulanato, citrato, diclorhidrato, edetato, edisliato, estolato, esilato, etilsuccinato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato,
20 nitrato, oleato, oxalato, pamoato (embonado), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, tannato, tartrato, teoclato, tosilato, trietiododa y valerato.

El término "profármaco", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra forma, significa compuestos que son precursores
25 de fármacos, que tras la administración, liberan el fármaco *in vivo* mediante

algún proceso químico o fisiológico (por ejemplo, un profármaco que se lleva a pH fisiológico se transforma en la forma de fármaco deseada).

La presente invención también incluye compuestos marcados isotópicamente, los cuales son idénticos a los mencionados en la fórmula 1, sino fuera por el hecho de que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que presenta una masa atómica o un número másico distinto de la masa atómica o número másico que normalmente se encuentra en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl respectivamente. Los compuestos de la presente invención, precursores farmacológicos de los mismos, y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mencionados compuestos o de los mencionados precursores farmacológicos que contienen los isótopos anteriormente mencionados y/o otros isótopos de otros átomos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H y ^{14}C , son útiles en ensayos de distribución en fármaco y/o tejido sustrato. Los isótopos de tritio, es decir, de ^3H y carbono-14, es decir, de ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tal como el deuterio, es decir, el ^2H puede dar lugar a ciertas ventajas terapéuticas como consecuencia de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media *in vivo* mayor o requerimientos de dosificación reducida y, de ahí, que puedan ser preferidos en algunas circunstancias. Los compuestos marcados isotópicamente de fórmula

1 de la presente invención y los precursores farmacológicos se pueden preparar por lo general llevando a cabo los procedimientos descritos para el compuesto no marcado, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente disponible.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra metabolitos del compuesto de fórmula 1 identificados en perros tras una dosis oral única del compuesto marcado con ^{14}C .

La figura 2 muestra metabolitos del compuesto de fórmula 1 identificados
10 en ratas tras una dosis oral única del compuesto marcado con ^{14}C .

Descripción detallada de la invención

El compuesto de fórmula 1 se puede preparar como se describe en la patente de Estados Unidos nº 6.531.491 y 6.534.424 (expedidas el 11 de
15 Marzo de 2003 y 18 de Marzo de 2003, respectivamente), las cuales se incorporan al presente documento como referencias en su totalidad. Se pueden preparar ciertos materiales de partida de acuerdo con procedimientos familiares para los especialistas en la técnica y se pueden hacer ciertas modificaciones sintéticas de acuerdo con procedimientos familiares para los especialistas en la
20 técnica.

El compuesto de fórmula 1 es capaz de formar una amplia variedad de sales diferentes con varios ácidos orgánicos e inorgánicos. Si bien tales sales deber ser farmacéuticamente aceptables para la administración a mamíferos, es frecuentemente deseable en la práctica aislar inicialmente el compuesto de
25 fórmula 1 de la mezcla de reacción como una sal farmacéuticamente no

aceptable y luego simplemente transformar esta última en el compuesto básico libre mediante tratamiento con un reactivo alcalino y a continuación transformar esta última base libre en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido de los compuestos básicos de la presente invención se preparan fácilmente mediante tratamiento del compuesto básico con una cantidad sustancialmente equivalente del ácido mineral u orgánico seleccionado en un medio disolvente acuoso o en un disolvente orgánico adecuado, tal como metanol o etanol. Tras evaporación cuidadosa del disolvente, se obtiene fácilmente la sal sólida deseada. La sal ácida deseada se puede precipitar también a partir de una solución de la base libre en un disolvente orgánico mediante la adición a la solución de un ácido mineral u orgánico apropiado.

La administración del compuesto de fórmula 1 se puede efectuar por cualquier procedimiento que permita la liberación del compuesto en el lugar de acción. Estos procedimientos incluyen administración por rutas orales, rutas intraduodenales, inyección parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intravascular o infusión), tópica y rectal.

El compuesto puede, por ejemplo, ser proporcionado en una forma adecuada para la administración oral, tal como un comprimido, cápsula, píldora, polvo, formulación para liberación sostenida, solución, suspensión, para inyección parenteral como una solución estéril, suspensión o emulsión, para la administración tópica como un ungüento o crema o para la administración rectal como un supositorio. El compuesto puede estar en formas de dosificación unitarias adecuadas para administración única de dosificaciones precisas. Preferiblemente, las formas de dosificación incluyen un

vehículo o excipiente farmacéutico convencional y el compuesto de fórmula 1 como un ingrediente activo. Además, las formas de dosificación pueden incluir otros agentes medicinales o farmacéuticos, vehículos, adyuvantes etc.

Formas de administración parenteral e inyectables incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones de propilenglicol o dextrosa acuosas. Las mencionadas formas de dosificación se pueden tamponar de forma adecuada si se desea.

Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes o cargas inertes, agua y varios disolventes orgánicos. La composición farmacéutica puede, si se desea, contener ingredientes adicionales tales como aromatizantes, aglutinantes, excipientes y similares. Por tanto, para administración oral, se pueden emplear comprimidos que contienen varios excipientes, tales como ácido cítrico junto con varios disgregantes tales como el almidón, ácido alginico y ciertos silicatos complejos y con agentes aglutinantes tales como sacarosa, gelatina y goma arábiga. De forma adicional, son frecuentemente útiles los agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio, el laurilsulfato de sodio y el talco para los fines de formación de comprimidos. Las composiciones sólidas de tipo similar se pueden emplear también en cápsulas de gelatina rellenas blanda y dura. Los materiales preferidos para este fin incluyen lactosa o azúcar de la leche y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas o elixires para la administración oral se puede combinar en estos el compuesto activo con varios agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes y, si se desea, agentes emulsionantes o agentes de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina o combinaciones de los

mismos.

En las realizaciones preferidas de las formas de dosificación de la invención, la forma de dosificación es una forma de dosificación oral, más preferiblemente, un comprimido o una cápsula.

- 5 En las realizaciones preferidas de los procedimientos de la invención, el compuesto de fórmula 1 se administra de forma oral, tal como, por ejemplo, empleando una forma de dosificación oral tal como se describe en el presente documento.

- 10 Los procedimientos incluyen la administración del compuesto de fórmula 1 empleando cualquier régimen de dosificación deseado. En una realización específica, se administra el compuesto una vez al día (quaque die, o QD), preferiblemente dos veces al día (bis in die, o BID), aunque está dentro del alcance de la invención una administración más o menos frecuente. El compuesto se puede administrar al mamífero, incluyendo un ser humano,
- 15 preferiblemente en un estado de ayunas (sin alimento o bebida en las dos horas anteriores y posteriores a la administración). En una realización particularmente preferida la dosificación es BID, en ayunas.

- Son conocidos los procedimientos de preparación de distintas formas de dosificación con una cantidad específica del compuesto de fórmula 1 o se
- 20 harán aparentes para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 15^o edición (1975).

- Se pueden determinar los valores en plasma sanguíneo AUC mediante medida directa de las concentraciones en plasma sanguíneo del compuesto de
- 25 fórmula uno o metabolitos activos del mismo, tal como mediante cromatografía

líquida – tandem de espectrometría de masas (CL – EM/EM) a varios intervalos de tiempo, y calculando el área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo. Los procedimientos adecuados para el cálculo del AUC son bien conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante el empleo de

5 aproximación por trapecios,

$$AUC_{(0-t)} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$$

en donde n es el número de puntos de datos y t y C_i son el tiempo y la concentración (valores x e y) del i-ésimo punto de datos. Los valores AUC a las 24 horas se pueden determinar mediante la normalización de las

10 concentraciones en plasma sanguíneo medidas de acuerdo con el programa de dosificación. Se añade bisulfito de sodio como un estabilizador a la solución de reconstitución para la preparación de los patrones de concentración.

El compuesto de fórmula 1 presenta propiedades ventajosas relativas a la modulación y/o inhibición de la actividad de la quinasa asociada con VEGF-

15 R, FGF-R, complejos CDK, CHK1, CSF-R y/o LCK.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, el compuesto de fórmula 1 es capaz de inducir la apoptosis en células HUVEC in vitro, inhibiendo la fosforilación de Akt y eNOS mediada por el VEGF en células HUVEC, demostrando un efecto inhibitorio sobre la fosforilación del VEGFR-2 en células

20 HUVEC tras resistencia al compuesto, e inhibiendo la migración de células cancerígenas inducida por el PDGF BB sobre la fibronectina de la proteína matriz. El compuesto de fórmula 1 puede presentar actividad frente a la progresión del tumor conducida por el PDGFR inhibiendo la migración e invasión.

El compuesto de fórmula 1 también muestra actividad más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral cuando se combina con el TaxolTM, más preferiblemente con el docetaxel. Se observa regresión tumoral más significativa con la terapia conjunta que con cualquier agente solo.

5 La presente invención se refiere además a procedimientos de modulación o inhibición de la actividad de la proteína quinasa, por ejemplo en tejido de mamífero, mediante la administración del compuesto de fórmula 1. La actividad del compuesto de la invención como un modulador de la actividad de la proteína quinasa, tal como la actividad de las quinasas, se puede medir
10 mediante cualquiera de los procedimientos disponibles por parte de los especialistas en la técnica, incluyendo ensayos *in vivo* y/o *in vitro*. Ejemplos de ensayos adecuados para las medidas de actividad incluyen aquellos descritos por Parast C. y col., *BioChemistry*, 37, 16788 – 16801 (1998); Jeffrey y col., *Nature*, 376, 313 – 320 (1995); publicación internacional WIPO n° 97/34876; y
15 publicación internacional WIPO n° 96/14843. Estas propiedades se pueden ensayar, por ejemplo, mediante el uso de uno o más protocolos de ensayo biológicos descritos en los ejemplos siguientes.

Los ejemplos y preparaciones proporcionados a continuación ilustran y ejemplifican además las formas de dosificación y procedimientos de la presente
20 invención. Se ha de entender que el alcance de la presente invención no se limita en modo alguno por el alcance de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se prueba el compuesto de fórmula 1 en cuanto: (1) eficacia *in vivo* bajo distinta programación: dosificación *sid*, descanso de dosis durante el fin de
25 semana e intermitente; (2) eficacia cuando se combina con docetaxel en

modelos de injerto heterólogo; (3) fosforilación eNOS y Akt in vitro en células del endotelio; (4) la concentración de Nitro Oxide y productos relacionados en cultivo celular e in vivo y (5) uso de una señal c-kit en células sanguíneas completas como un biomarcador potencial para el compuesto.

5 PRUEBAS BIOLÓGICAS: ENSAYOS CON ENZIMA

La estimulación de la proliferación celular mediante factores de crecimiento tales como el VEGF, FGF y otros depende de su inducción de autofosforilación de cada una de sus tirosin-quinasa del receptor respectivas. Por tanto, la capacidad de un inhibidor de la proteína quinasa para bloquear la proliferación celular inducida por estos factores de crecimiento se correlaciona directamente con su capacidad para bloquear la autofosforilación del receptor. Para medir la actividad de inhibición de la proteína quinasa de los compuestos se idean las siguientes construcciones.

Construcción del VEGF-R2 para ensayo: este diseño determina la capacidad de un compuesto a prueba para inhibir la actividad de la tirosin-quinasa. Se expresa una construcción (VEGF-R2Δ50) del dominio citosólico del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF-R2) exento de 50 residuos centrales de los 68 residuos del dominio de inserción de la quinasa en un sistema celular de baculovirus / insecto. De los 1356 residuos del VEGF-R2 de cadena completa, el VEGF-R2Δ50 contiene 806 – 839 y 990 – 1171 residuos, y también una mutación puntual (E990V) dentro del dominio de inserción de la quinasa respecto del VEGF-R2 tipo salvaje. Se lleva a cabo la autofosforilación de la construcción purificada mediante la incubación del enzima a una concentración de 4 μM en presencia de ATP 3 mM y MgCl₂ 40 mM en HEPES 100 mM, pH 7,5, que contiene glicerol al 5% y DTT 5 mM a 4°

C durante 2 horas. Después de la autofosforilación esta construcción ha mostrado que posee una actividad catalítica esencialmente equivalente respecto de la construcción del dominio de la quinasa autofosforilada tipo salvaje. Véase Parast y col., *BioChemistry*, 37, 16788 – 16801 (1998).

- 5 Construcción de FGF-R1 para ensayo: el dominio de la quinasa intracelular del FGF-R1 humano se expresa empleando el sistema de expresión del vector baculovirus partiendo del residuo de metionina endógeno 456 hasta el glutamato 766, de acuerdo con el sistema de numeración de residuos de Mohammadi y col., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 977 – 989 (1996). Además,
10 la construcción también presenta las siguientes sustituciones de 3 aminoácidos: L457V, C488A y C584S.

- Construcción LCK para ensayo: la tirosin-quinasa LCK se expresa en células de insecto como una delección del terminal de N partiendo del residuo de aminoácido 223 hasta el final de la proteína en el residuo 509, con las
15 siguientes sustituciones de aminoácido en el término N: P233M y C224D.

- Construcción CHK-1 para ensayo: se expresa la CHK-1 humana de longitud completa marcada con His con terminal en C (FL-CHK-1) empleando el sistema celular baculovirus / insecto. Contiene 6 residuos de histidina (6 veces la etiqueta His) en el término C de la CHK-1 humana del aminoácido
20 476. Se purifica la proteína mediante técnicas cromatográficas convencionales.

- Construcción CDK2 / ciclina A para ensayo: se purifica CDK2 empleando metodologías publicadas (Rosenblatt y col., *J. Mol. Biol.*, 230, 1317 – 1319 (1993)) de células a partir de células de insecto que han sido infectadas con un vector de expresión de baculovirus. Se purifica la ciclina A a partir de células de
25 *E. coli* que expresan la ciclina A recombinante de longitud completa, y se

genera una construcción de ciclina A truncada mediante proteólisis limitada y se purifica como se describe previamente (Jeffrey y col., *Nature*, 376, 313 – 320 (1995)).

Construcción CDK4 / ciclina D para ensayo: se purifica un complejo de CDK4 humana y ciclina D3 o un complejo de ciclina D1 y una proteína de fusión de CDK4 humana y glutatona-S-transferasa (GST-CDK4) empleando técnicas cromatográficas bioquímicas tradicionales a partir de células de insecto que se han co-infectado con los correspondientes vectores de expresión de baculovirus.

10 **Ensayo VEGF-R2: Ensayo espectrofotométrico acoplado (FLVK-P)**

La producción de ADP a partir de ATP que acompaña a la fosforiltransferasa se acopla con la oxidación de NADH empleando fosfoenolpiruvato (PEP) y un sistema que presenta piruvato quinasa (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH). La oxidación del NADH se controla siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) empleando un espectrofotómetro Beckman DU 650. Las condiciones del ensayo para VEGF-R2 Δ 50 fosforilado (indicado como FLVK-P en las tablas siguientes) son como siguen: PEP 1 mM; NADH 250 μM ; 50 unidades de LDH/ml; 20 unidades de PK/ml; DTT 5 mM; poli(E₄Y₁) 5,1 mM; ATP 1 mM; y MgCl₂ 25 mM en HEPES 200 mM, pH 7,5. Las condiciones del ensayo para VEGF-R2 Δ 50 no fosforilado (indicado como FLVK en las tablas) fueron las siguientes: PEP 1 mM; NADH 250 μM ; 50 unidades de LDH/ml; 20 unidades de PK/ml; DTT 5 mM; poli(E₄Y₁) 20 mM; ATP 3 mM; y MgCl₂ 60 mM y MnCl₂ en HEPES 200 mM, pH 7,5. Se inician los ensayos con 5 a 40 mM de enzima. Se determinan los valores K_i mediante la medida de la actividad de la enzima en presencia de

concentraciones variables de compuestos de prueba. Los datos se analizaron empleando un soporte lógico Enzyme Kinetic and Kaleidagraph.

Ensayo ELISA: se controla la formación de fosfogastrina empleando péptido de gastrina biotinilado (1 – 17) como sustrato. Se inmoviliza la fosfogastrina biotinilada empleando placas de microtítulos de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina con detección que emplea anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano rustidazo. La actividad de la peroxidasa de rábano rustidano se controla empleando sal de diamonio de 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolinsulfonato (6)] (ABTS). Las soluciones de ensayo típicas contenían: péptido de gastrina biotinilada 2 μ M; DTT 5 mM; ATP 20 μ M, MgCl₂ 26 mM; y MnCl₂ 2 mM en HEPES 200 mM, pH 7,5. Se inicia el ensayo con 0,8 nM de VEGF-R2 Δ 50 fosforilado. Se ensaya la actividad de la peroxidasa de rábano rustidano empleando ABTS, 10 mM. Se desactiva la reacción de la peroxidasa de rábano rustidano mediante la adición de ácido (H₂SO₄), seguido de lectura de la absorbancia a 405 nm. Se determinan los valores K_i midiendo la actividad de la enzima en presencia de concentraciones variables de compuestos de prueba. Se analizan los datos empleando el soporte lógico Enzyme Kinetic and Kaleidagraph.

Ensayo FGF-R: se lleva a cabo el ensayo espectrofotométrico tal como se describe anteriormente para el VEGF-R2, a excepción de los siguientes cambios en la concentración: FGF-R = 50 nM, ATP = 2 mM y poli(E4Y1) = 15 mM.

Ensayo LCK: se lleva a cabo el ensayo espectrofotométrico como se describe anteriormente para el VEGF-R2, a excepción de los siguientes cambios en la concentración: LCK = 60 nM, MgCl₂ = 0 mM, poli(E4Y1) = 20

mM.

Ensayo CHK-1: la producción de ADP a partir de ATP que acompaña la transferencia del fosforilo al sustrato sintético péptido Syntide-2 (PLARTLSAVAGLPGKK) se acopló a la oxidación de NADH empleando fosfoenolpiruvato (PEP) mediante las acciones de la piruvato quinasa (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH). Se controla la oxidación del NADH siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm ($340 = 6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) empleando un espectrofotómetro HP8452. Las soluciones de reacción típicas contenían: PEP 4 mM; NADH 0,15 mM; 28 unidades de LDH/ml; 16 unidades de PK/ml; DTT 3 mM; Syntide-2 0,125 mM; ATP 0,15 mM; MgCl_2 25 mM en TRIS 50 mM, pH 7,5; y NaCl 400 mM. Se inicial los ensayos con 10 nM de FL-CHK-1. Se determinan los valores K_i mediante la medida de la actividad del enzima inicial en presencia de concentraciones variables de compuestos de prueba. Los datos se analizaron empleando un soporte lógico Enzyme Kinetic and Kaleidagraph.

Ensayo de proliferación en HUVEC: este ensayo determina la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la proliferación estimulada por el factor de crecimiento de células del endotelio de la vena umbilical humana ("HUVEC"). Las células HUVEC (pasaje 3 – 4, Clonetics, Corp.) se descongelan en medio de cultivo EGM2 (Clonetics Corp.) en frascos T75. Se añade medio EGM2 fresco a los frascos 24 horas después. Cuatro o cinco días después se exponen las células a otro medio de cultivo (medio F12K complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, suplemento de crecimiento de células endoteliales (ECGS) 60 $\mu\text{g/ml}$ y heparina 10 $\mu\text{g/m}$). Se emplean células HUVEC de crecimiento exponencial en los siguientes

experimentos. Se colocan de diez a doce mil células HUVEC en platos de 96 pocillos en 100 µl de medio de cultivo rico (descrito anteriormente). Se deja que las células se adapten durante 24 horas a este medio. El medio se elimina luego mediante aspiración y se añaden 115 µl de medio de inanición (F12K + PBS al 1%) a cada pocillo. Después de 18 horas se disuelven 15 µl del agente de prueba en DMSO al 1% en el medio de inanición o se añade este vehículo solo en cada pocillo de tratamiento; la concentración en DMSO final fue de un 0,1%. Una hora después, se añaden 20 µl de hrVEGF₁₆₅ 150 ng/ml en medio de inanición a todos los pocillos excepto aquellos que contuviesen controles no tratados; la concentración en VEGF final fue de 20 ng/ml. Se cuantifica la proliferación celular 72 horas después mediante reducción del tinte por MTT, en ese momento se exponen las células durante 4 – 5 horas a MTT (Promega Corp.). La reducción de tinte se detiene mediante la adición de una solución de parada (Promega Corp.) y se determina la absorbancia a 570 y 630 nm en un lector de placa espectrofotométrico de 96 pocillos.

Ensayo de proliferación de células cancerígenas (MV522): para determinar si un inhibidor de proteína quinasa presenta utilidad terapéutica en cuanto al bloqueo de la angiogénesis para el tratamiento del cáncer, es importante el demostrar que el inhibidor no bloquea de forma no específica la proliferación celular en células que no expresan el receptor de la quinasa. Esto se realiza desarrollando ensayos de proliferación empleando células cancerígenas. El protocolo para la determinación de la proliferación celular en células cancerígenas es similar al empleado para la determinación en células HUVEC. Se siembran dos mil células cancerígenas del pulmón (línea MV522, adquiridas de UCSD) en medio de crecimiento (medio RPMI1640

complementado con glutamina 2 mM y FBS al 10%). Se deja que las células se adapten durante 1 día antes de la adición de los agentes de prueba y/o vehículos. Se tratan las células de forma simultánea con los mismos agentes de prueba empelados en el ensayo de HUVEC. Se cuantifica la proliferación celular mediante el ensayo de reducción de tinte por MTT tras exposición a los agentes de prueba.

Determinación de la potencia de c-kit: se emplean células NI-H526 (ATCC) para la determinación de la potencia frente al c-kit mediante el inhibidor. Las células crecen hasta sub-confluencia y se incuban en medio de inanición durante 18 horas. Se añade el inhibidor y se incuban las células durante 45 minutos a 37° C en presencia de albúmina al 2,3% y Na₃VO₄ 1 mM (Sigma). Se añade SCF, el factor de crecimiento del c-kit al cultivo a una concentración final de 50 ng/ml. Cinco minutos después se lavan las células dos veces con PBS frío y se lisan con tampón de lisado (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, NP40 al 1%, Na₃VO₄ 1 mM y un cóctel inhibidor de la proteasa). Se lleva a cabo la inmunoprecipitación empleando 1 mg de proteína total de cada lisado, se incuba durante la noche a 4° con CD117 ab-3 4 µg/ml (K45, Neomarkers). La mañana siguiente se conjuga el complejo del anticuerpo con las perlas de proteína A. Se realizan análisis SDS PAGE y Western Blot empleando anticuerpo 4G10 anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology) para los receptores fosforilados, o anticuerpo sc-1493 del receptor anti c-kit (C-14, Santa Cruz) a 1:1000. Se visualizan las manchas mediante reactivos de quimioluminiscencia ECL Plus. Se emplea un fosforimager (Store 846, Molecular Dynamics) para la cuantificación de las señales en las manchas.

Se puede emplear la reducción de la población celular positiva de c-kit

en células sanguíneas periféricas completas de un animal y mamífero como un biomarcador de la actividad del compuesto de fórmula 1.

Medida de la fosforilación de ENOS y Akt: se emplean células HUVEC (Clonetics) para la determinación de la potencia frente a eNOS y Akt por parte del inhibidor. Las células crecen hasta sub-confluencia y se incuban en medio de inanición durante 18 horas. Se añade el inhibidor y se incuban las células durante 45 minutos a 37° C en presencia de albúmina al 2,3% y Na₃VO₄ 1 mM (Sigma). Se añade VEGF al medio de cultivo a 50 ng/ml. Cinco minutos después se lavan las células dos veces con PBS frío y se lisan con tampón de lisado (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, NP40 al 1%, Na₃VO₄ 1 mM y un cóctel inhibidor de la proteasa). Se analiza una proteína total de 30 – 40 µg mediante el procedimiento de Western. Se analiza la fosforilación de eNOS y Akt empleando: anticuerpos de Phospho-eNOS (Ser 1177) #9571 o Phospho-Akt (Ser. 473) #9271 (ambos de Cell signaling). Se lleva a cabo la detección de la proteína mediante el empleo de: NOS3 (C-20) sc-654 (Santa Cruz) o anticuerpo de Akt #9272 (Cell Signaling). Todo requiere un anticuerpo secundario unido a HRP anti-conejo empleado a 1:3000. Se visualizan las manchas mediante el sustrato de quimioluminiscencia Super Signal West Dura (Pierce). Se emplea un Alpha Imager 8800 de Alpha Innotech para la cuantificación de las señales en las manchas.

Ensayo PK en ratón: se analizan los parámetros farmacocinéticos (por ejemplo absorción y eliminación) de fármacos en ratas empleando el siguiente experimento. Se formulan compuestos de prueba como una suspensión en un vehículo de CMC al 0,5% o como una solución en un vehículo (PEG 400:H₂O acidificada) 30:70. Esta suspensión o solución se administra de forma oral (p.

o.) o intraperitoneal (i. p.) a ratas hembra C3H (n = 4). Se toman muestras de sangre mediante una vía orbital en diferentes momentos: 0 horas (previa a la dosis), 0,5 hr, 1,0 hr, 2,0 hr y 4,0 hr después de la dosis. Se obtiene el plasma de cada muestra mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se
5 extrae el compuesto de prueba del plasma mediante un procedimiento de precipitación de proteínas orgánicas. Para cada tiempo se combinan 50 µl de plasma con 1,0 ml de acetonitrilo, se agita durante 2 minutos y luego se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos para precipitar la proteína y extraer el compuesto de prueba. A continuación se vierte el sobrenadante de
10 acetonitrilo (el extracto que contiene el compuesto de prueba) en nuevos tubos de ensayo y se evapora sobre una placa caliente (25° C) con una corriente de gas N₂. A cada tubo que contenía el extracto de compuesto de prueba seco se añade 125 µl de fase móvil (60:40, NH₄H₂PO₄ 0,025 M, +2,5 ml/l TEA:acetonitrilo). Se suspende nuevamente el compuesto de prueba en la fase
15 móvil mediante agitación y se elimina más proteína mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. Se vierte cada muestra en un vial de HPLC para análisis del compuesto de prueba en un equipo HPLC serie 1100 de Hewlett Packard con detección UV. Para cada muestra se inyectan 95 µl en una columna de 150 x 3,2 mm C-18 de fase inversa Phenomenex – Prodigy y se
20 eluye con un gradiente de acetonitrilo de un 45 – 50% durante 10 minutos. Se determinan las concentraciones (µg/ml) en plasma del compuesto de prueba mediante una comparación con la curva patrón (área de pico frente a concentración en µg/ml) empleando concentraciones conocidas del compuesto de prueba extraído de las muestras de plasma en la forma descrita
25 anteriormente. Junto con los patrones y las muestras desconocidas, se

experimentan tres grupos ($n = 4$) de controles de calidad ($0,25 \mu\text{g/ml}$, $1,5 \mu\text{g/ml}$ y $7,5 \mu\text{g/ml}$) para asegurar la consistencia del análisis. La curva patrón presentaba un $R^2 > 0,99$ y los controles de calidad estaban todos dentro de un 10% de sus valores esperados. Las muestras de prueba cuantificadas se representaron para su visualización empleando el soporte lógico Kaleidagraph y se determinaron sus parámetros farmacocinéticos empleando el soporte lógico WIN NONLIN.

Ensayo del microsoma de hígado humano (HLM): se mide el metabolismo del compuesto en microsomas de hígado humano mediante protocolos de ensayo analítico por CL – EM como sigue. En primer lugar se descongelan microsomas de hígado humano (HLM) y se diluyen hasta 5 mg/ml con tampón de fosfato de potasio (KPO_4) 100 mM frío. Se incuban previamente cantidades apropiadas de tampón KPO_4 , solución de regeneración de NADPH (que contiene B-NADP, glucosa-6-fosfato, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato y MgCl_2), y HLM en tubos de vidrio de $13 \times 100 \text{ mm}$ a 37°C durante 10 minutos (3 tubos por compuesto de prueba – triplicado). Se añade el compuesto de prueba ($5 \mu\text{M}$ final) a cada tubo para iniciar la reacción y se mezcla mediante agitación vigorosa, seguido de incubación a 37°C . A $t = 0, 2 \text{ h}$ se retira una muestra de $250 \mu\text{l}$ de cada tubo de incubación a tubos de vidrio de $12 \times 75 \text{ mm}$ a parte que contienen 1 ml de acetonitrilo enfriado con hielo con reserpina $0,05 \mu\text{M}$. Se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 20 minutos para precipitar las proteínas y sal (Beckman Allegra 6KR, S/N ALK98D06, #634). Se transfiere el sobrenadante a nuevos tubos de vidrio de $12 \times 75 \text{ mm}$ y se evapora mediante un evaporador a vacío centrífugo Speed-Vac. Se reconstituyen las muestras en $200 \mu\text{l}$ de ácido fórmico / acetonitrilo al 0,1% (90/10) y se agita

vigorosamente hasta que se disuelve. Se transfieren luego las muestras a tubos de microcentrífuga de polipropileno a parte y se centrifugan a 14000 x g durante 10 minutos (Fisher Micro 14, S/N M0017580). Para cada réplica (# 1 – 3) en cada momento (0 y 2 horas) se combina una muestra alícuota de cada compuesto de prueba en un vial de HPLC simple (6 muestras en total) para el análisis por CL – EM, lo que se describe a continuación.

Se inyectan las muestras de compuesto combinadas en el sistema CL – EM, constituido por un equipo HPLC con dispositivo diodo HP1100 de Hewlett Packard y un espectrómetro de masas triple cuádruple de Micromass Quattro II que opera en modo SIR por electropulverización positiva (programado para barrer específicamente el ion molecular de cada compuesto de prueba. Cada pico de compuesto de prueba se integra a cada tiempo. Para cada compuesto, se promedia el área de pico en cada tiempo ($n = 3$), y esta área de pico medio a las 2 horas se divide por el área de pico promedio a tiempo 0 horas para obtener el compuesto de prueba en porcentaje que queda a las dos horas.

Ensayos de apoptosis en HUVEC *in vitro*

Cuantificación de la apoptosis mediante ELISA: se mide la apoptosis de las células HUVEC empleando Cell Death Detection Elisa PLUS (catálogo #1775425, Roche Biochemicals, Mannheim, Alemania) que cuantifica los fragmentos de ADN asociados a la histona citoplásmica en lisados celulares. Se lleva a cabo el procedimiento con pequeñas modificaciones respecto de las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tratan las células HUVEC sometidas a inanición con varias concentraciones de compuesto A en presencia del VEGF (20 ng/ml). Se recoge la fracción citosólica de las células a varios puntos de tiempo y se emplea como una fuente de antígeno en un

sándwich ELISA con una anti-histona mAb primaria recubierta en la placa de microtítulos y un anti-ADN mAb secundario acoplado a peroxidasa. El número de células apoptóticas se determina mediante la adición de sustrato de peroxidasa cromogénico y midiendo la absorción con un espectrofotómetro a 405 nm (longitud de onda de referencia 490 nm).

Visualización de la apoptosis por TUNEL: la detección in situ de células apoptóticas se lleva a cabo empleando técnica de marcado final dUTP nick mediado por TdT (TUNEL). Brevemente, las células HUVEC, criadas en portaplacas de cámara Lab-Tek de 8 pocillos, se sometieron a inanición L/N y se trataron luego durante 6 horas con varias concentraciones del compuesto A. Se fijaron las células luego en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 y se incuban durante 1 hora en una mezcla de transferasa terminal y nucleótidos que incluyen fluoresceína – dUTP (Deadend Fluorometric TUNEL system, Promega, catálogo # G3250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se contratintaron con solución de yoduro de propidio (PI). Se visualizaron las células marcadas tintadas positivamente con fluoresceína y con PI y se fotografiaron mediante microscopía de fluorescencia.

Ensayo de migración de células mediada por PDGF: se emplean células U87MG es este ensayo. Se incuban previamente placas de seis pocillos durante la noche con fibronectina 0,5 ng/ml. Al día siguiente se colocan las células U87MG en cada pocillo y se dejan crecer hasta confluencia. Se incuban las células durante la noche con medio de inanición que contiene FBS al 0,1%. Se hace una marca de aprox. 1 cm empleado un golpe de pipeta y se lavan las células con el medio de inanición. Se incuban luego las placas con 0,5 ng/ml de

fibronectina durante una hora y luego se lavan de nuevo. Se introduce el medio experimental que contiene 100 ng/l de rhPDGF BB y compuesto A en el medio de inanición. Se fotografiaron las células entre 0 y 15 horas y se visualizó la migración.

- 5 Ensayo de fosforilación de molécula aguas abajo y VEGFR-2 celular: se cultivan células HUVEC (Clonetics) hasta sub-confluencia y se incuban en medio de inanición (F12K más PBS al 0,1%) durante 18 horas. Se añade el compuesto A a las células en presencia de albúmina al 2,3% y Na_3VO_4 1 mM (Sigma). Cuarenta y cinco minutos después se añade VEGF al cultivo con una
- 10 concentración final de 50 ng/ml. Cinco minutos después se lavan las células con PBS frío y se lisan con tampón de lisado (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, NP40 al 1%, Na_3VO_4 1 mM y un cóctel de inhibidor de la proteasa). Se inmunoprecipita un miligramo de proteínas totales del lisado empleando anti-Flk-1 C-1158 (Santa Cruz). Se conjuga el complejo anticuerpo
- 15 con las esferas de proteína A y se lleva a cabo el análisis SDS PAGE / Western, se detecta el VEGFR-2 y la proteína fosforilados mediante el anticuerpo 4G10 anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology) y anti-Flk-1 C-20 (Santa Cruz) respectivamente. Para eNOS y Akt se trataron las células igual que anteriormente. Se llevaron a cabo análisis Western empleando un total de
- 20 30 – 40 μg de proteínas. Se probó la fosforilación de eNOS y Akt mediante el empleo de anticuerpos Phospho-eNOS (Ser 1177, #9571) o Phospho-Akt (Ser 473, #9271) (Cell Signaling). Se analizaron las proteínas mediante el empleo de anticuerpos #9272 NOS3 C-20 (sc-654, Santa Cruz) o Akt (Cell Signaling). Se emplea IgG anti-conejo unido a HRP como el anticuerpo secundario. Todas
- 25 las manchas se visualizaron mediante el sustrato de quimioluminiscencia Super

Signal West Dura (Pierce). La señal se cuantifica empleando un Alpha Imager 8800 de Alpha Innotech.

Experimentos de arrastre por lavado: se trataron células HUVEC como se describió anteriormente. Tras la incubación con compuesto A (10 nM) durante 45 minutos y estimulado con el VEGF (50 ng/ml) durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante, se lava y se reemplaza con el medio de inanición que contiene VEGF y Na_3VO_4 . Se incuban las células adicionalmente durante un periodo de tiempo deseado antes de ser lisadas y procesadas mediante inmunoprecipitación y Western para fosforilación y VEGFR-2 total (véase anteriormente). En otro experimento se tratan las células con VEGF durante todo el periodo de tiempo anterior y se analiza la fosforilación de VEGFR-2 y VEGFR-2 total en los tiempos deseados de forma similar. Se cuantifican las señales durante el arrastre por lavado mediante densitometría. Las intensidades de estimulación máxima (5 minutos) de cada experimento se normaliza respecto a cada una de las otras y se compara la intensidad del fosfo-VEGFR-2 a cada tiempo en los dos experimentos, lo cual permite determinar la recuperación de fosforilación del VEGFR-2 respecto de las células que no estaban tratadas pero si estimuladas con VEGF.

Modelos de tumor: para modelos MV522 (carcinoma de colon) y MDA-MB-231 (carcinoma de mama) humanos, se implantan (s. c.) ratas atímicas ($n = 8 - 12$) con 5×10^6 células/lugar; para el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis murino, se implantan troncalmente fragmentos de tumor ($1 - 2 \text{ mm}^2$) en el flanco derecho de ratas B6D2F1. Comienza la dosificación normalmente en el día 7 (MV522) o cuando el tamaño de tumor medio llegaba a $150 - 200 \text{ mm}^3$ (MDA-MB-231).

Se formula el compuesto de fórmula 1 en CMC/H₂O al 0,5% y se administra BID por vía oral. Se formula docetaxel en EtOH al 7% / polisorbato al 3% / H₂O al 90% y se dosifica semanalmente de forma intravenosa. Normalmente el tratamiento dura entre 3 y 4 semanas. Se mide la longitud y anchura geométrica del tumor tres veces a la semana empleando un micrómetro electrónico. Se calcula el volumen del tumor como un producto de 0,4 x [longitud x (anchura)²]. Los datos se dan como una media ± SEM. Al final de los estudios se re-seccionan los tumores y tejidos, se pesan y se recogen para su análisis. Se recoge el plasma para el análisis de la concentración de fármaco.

Los resultados se muestran en las tablas 1-3.

Tabla 1. Potencia y selectividad del compuesto 1

Diana	Actividad enzimática, K _i (nM)	Fosforilación del receptor CI ₅₀ (nM) ^a
VEGFR-2 (KDR)	1,1	0,25
VEGFR-1 (Flt-1)	8,3	1,2 ^b
VEGFR-3 (Flt-4)	nd	0,29
PDGFR-β	1,3	2,5
c-Kit	nd	2
FGFR-1	56	218

^a medido mediante ensayos de proliferación celular; ^b medido en presencia de albúmina al 2,3% por IP/IB, nd: no determinado.

15

Otros enzimas seguidos pero que estaban por encima de límite para el cálculo de K_i son: cMet, LCK, c-Src, FAK, Pyk2, IRL, BTK, CDK1, CDK2,

CDK4, PKA, PKC, PLK y Chk1.

Tabla 2. Diseño del estudio para la administración conjunta de compuesto 1 y docetaxel en el modelo de cáncer de mama humano MDA-MB-231

Compuesto 1 (mg/kg) ^a	Docetaxel ^b	Selección de dosis racional
25	0	DE ₉₀
5	0	DE ₉₀
1	0	Dosis baja
0	20	MTD al 70% para ratón
0	10	MTD humana cálc. Equiv.
0	2	Dosis baja
25	20	Tolerancia y DDI
5	10	Aditividad y DDI
5	2	Aditividad y DDI
1	10	Aditividad y DDI
1	2	Aditividad y DDI

5 ^a por vía oral, bid, diaria; ^b por vía intravenosa, una vez a la semana

62

Tabla 3. Terapia de combinación de docetaxel y compuesto 1 produjo mayor actividad anti-tumor en el modelo de injerto heterólogo MDA-MB-231

Compuesto 1 (mg(kg) ^a)	Docetaxel ^b	PR*	CR**
0	0	0	0
25	0	3	0
5	0	3	0
1	0	0	0
0	20	4	0
0	10	6	0
0	2	0	0
25	20	12	0
5	10	10	2
1	10	7	2
5	2	0	0
1	2	0	0

^a por vía oral, bid, diaria; ^b por vía intravenosa, una vez a la semana

Los grupos de combinación demuestran las incidencias crecientes de regresión tumoral completa y parcial. El ritmo de crecimiento tumoral se reduce en un mayor grado cuando los agentes se combinaban. El tratamiento de combinación era igual de bien tolerado que con solo los agentes individuales.

Ejemplo 2

El compuesto de fórmula 1, 6-[2-(metilcarbamoil)fenilsulfanil]-3-E-[2-(piridin-2-il)etenil]indazol, se administra en dosis variantes a pacientes con

tumores sólidos. Se tratan 30 pacientes (14 hombres, 17 mujeres) empleando el compuesto de fórmula 1 en una forma de comprimido para dosificación oral, en un programa BID o QD. Los ciclos fueron de 28 días cada uno. Los diagnósticos de tumor específicos fueron de mama (11), tiroides (5), células renales (5), pulmón (4) y otros (5). Se midieron los datos farmacocinéticos mediante cromatografía líquida – tándem de espectrometría de masas (CL – EM/EM). Se tomaron muestras de sangre en el día 15 del ciclo en tiempos ½ hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 12 horas desde el momento de la administración.

10 Se muestran en la tabla 4 los resultados farmacocinéticos (valores medios de 15 días). Los pacientes no se mantuvieron en ayunas a menos que se indique de otra forma. Los números en paréntesis son el coeficiente de variación expresado como un porcentaje. En la tabla, C_{max} es la máxima concentración en plasma sanguíneo observada del compuesto de fórmula 1, 15 AUC (0 – 24) es la concentración en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas, y $T_{1/2}$ es la vida media determinada a partir de una representación de la concentración frente al tiempo. La entrada "# pacientes con PK" indica el número de pacientes para los que se obtuvieron los datos farmacocinéticos.

20

25

Tabla 4

Programa de dosis y cantidad	# pacientes / # pacientes con PK	C _{max} (ng/ml)	AUC (0-24) (ng hr/ml)	T _{1/2} (hr)
5 mg BID	6/6	27,1 (36)	257 (39)	2,2 (16)
5 mg BID en ayunas	8/6	54,5 (48)	311 (76)	2,7 (39)
15 mg QD	6/6	78,6 (54)	797 (96)	3,5 (46)
20 mg BID	4/3	129,4 (86)	1524 (87)	3,1 (51)

Además, los pacientes en el primer cohorte (n = 6) recibieron dosis individualizadas que varían de 10 mg QD hasta 30 mg BID (PK no mostrado).

- 5 Las exposiciones del plasma fueron mayores (aproximadamente 49%) y se redujo la variabilidad intrapaciente, en el estado en ayunas frente al estado alimentado. La dosis tolerada máxima (MTD) en este momento se determinó que es de 5 mg BID en ayunas. Las toxicidades limitativas de la dosis (DLT) a dosis superiores a la MTD fueron hipertensión (HTN), asimiento, ensayos de
- 10 función del hígado, preeatititis, apnea y estomatitis. Además, dos pacientes que respondieron con NSCLC presentaban hemoptisis fatal tres semanas después de detener el tratamiento con compuesto. También se observó proteinuria no limitante de la dosis. A dosis menores a o igual a la MTD, la DLT se limitaba a estomatitis de grado 2 en el paciente 1. Se observó HTN no limitativa de la
- 15 dosis en 7/14 pacientes y se trató mediante medicaciones hipertensivas convencionales. Se observaron dos respuestas parciales duraderas según criterios RECIST (en células renales y tumor cístico adenoide del sinus maxilar)

y enfermedad estable de más de o de 4 meses (intervalo de 4 – 13+ meses) en 5 pacientes de esta población fuertemente pre-tratada. Empleando dceMRI se llevaron a cabo análisis preliminares de 21 pacientes para medir el efecto vascular inducido por el compuesto de fórmula 1 en el basal, y en los días 2, 28 y 56. El porcentaje varía en K^{trans} media (P. S. Tofts, G. Brix, D.L. Buckley, J.L. Evelhoch, E. Henderson, M.V. Knopp, H.B.W. Larsson, T. Lee, N.A. Mayr, G.J.M. Parker, R.E. Port, J Taylor y R.M. Weisskoff, Estimating Kinetic Parameters from Dynamic Contrast-Enhanced T_1 -Weighted MRI of a Diffuseable Tracer: Standardized Quantities and Symbols, Journal of Magnetic Resonance Imaging, 10:223 – 232 (1999)) y el área inicial bajo la curva de intensidad de contraste frente al tiempo (IAUC) se calculó para cada tumor (n = 1 – 4 por paciente). Se definió una respuesta vascular al tumor como superior o igual a un 50% de disminución en los valores de los parámetros en el basal en el día 2. Las disminuciones agudas (día 2) en respuestas vasculares al tumor (superiores a o igual a un 50% de disminución en K^{trans} y IAUC) se observaron en 6/18 pacientes evaluables, y 11/18 demostraron una disminución superior a o igual a un 40% tanto en K^{trans} como en IAUC. Debido a causas técnicas con los barridos, 3/21 conjuntos de imágenes no fueron evaluables. Este ejemplo muestra que el compuesto de fórmula 1 es un agente altamente activo como se manifiesta mediante la respuesta clínica y los cambios vasculares en tumores agudos.

Ejemplo 3

Después de la administración oral de 30 mg de base libre / kg de dosis de compuesto marcado con $[^{14}C]$ de fórmula 1 a perros sabuesos intactos o con drenaje en la bilis, se observa un metabolismo extensivo. Las trayectorias de

biotransformación incluyeron la oxigenación (mono- o di), gluconidación, glucosilación y oxigenación seguido de sulfación o glucosilación. La figura 1 muestra los metabolitos identificados. En el plasma, el M12 (un N-óxido) es el único metabolito detectable. En la orina, el M5 (un ácido depiridinilcarboxílico) es el metabolito principal. Los metabolitos principales biliares incluyen el M8 (un sulfato) y el M12. La estructura química del metabolito fecal principal M1 es desconocida.

Los modelos de excreción para la radiactividad derivada del [^{14}C] en perros sabuesos tras una dosis oral única del compuesto fueron similares para machos y hembras, con radiactividad excretada primariamente mediante las heces. Las recuperaciones medias para machos intactos fueron de un 85,5% en las heces y de un 5,3% en la orina, en comparación con las recuperaciones medias de un 80,9% en las heces y de un 7,0% en la orina para hembras intactas. Los perros macho con drenaje en la bilis excretaron una fracción relativamente pequeña de radiactividad en la bilis (recuperación de un 8,3%), con radiactividad adicional recuperada en las heces (52,7%) y orina (11,3%). La radiactividad biliar y urinaria total combinada de los perros con drenaje en la bilis sugiere que aproximadamente un 20% de la radiactividad administrada sufre absorción gastrointestinal. Las recuperaciones medias totales en todas las muestras fueron de un 92,4% y de un 92,6% para machos y hembras intactos, respectivamente, y de un 89,6% para los machos con drenaje en la bilis. Todos los perfiles y elucidación de la estructura de los metabolitos se llevaron a cabo empleando HPLC acoplado en línea con detector de HPLC radiológico (β -RAM) y detección de EM con electropulverización (ESI) y fuentes de ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo positivo y

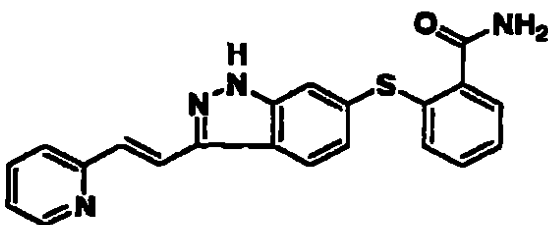
negativo.

Ejemplo 4

El compuesto de fórmula 1 sufre un metabolismo extensivo en ratas CD-1 tras la administración oral única de compuesto marcado con [^{14}C]. Se recupera un bajo porcentaje de fármaco no modificado en la orina y heces, y se observa una variedad de metabolitos de fase I y fase II. Las trayectorias de biotransformación incluyeron la oxigenación (mono- o di-), glucuronidación, glucosilación y oxigenación seguida de glucuronidación o glucosilación. Se muestran en la figura 2 los metabolitos identificados. En el plasma, el fármaco no modificado y M12 (un N-óxido) representaron los dos componentes principales. M7 (una glucuronida) representó el metabolito más significativo tanto en la orina como en las heces.

La mayoría de la radiactividad derivada del [^{14}C] se recuperó en las heces tras una administración oral única de 50 mg de base libre / kg de dosis de [^{14}C]-AG-013736 a ratas machos CD-1¹. Las recuperaciones medias (n = 2) de radiactividad (% de dosis) a las 48 horas tras la dosis fueron de un 65,8% en las heces y de un 12,7% en la orina. La velocidad de eliminación de radiactividad en la excreción fue rápida con aproximadamente un 72% de la dosis recuperada en las 24 horas tras la dosis. El perfil de radiactividad y la caracterización de la estructura de los metabolitos se lleva a cabo empleando procedimientos de CL – RAM – EM.

Además de los metabolitos mostrados en las figuras 1 y 2, otros metabolitos conocidos incluyen los metabolitos de des-metilo activo mostrado en la fórmula 1a.



1a

Ejemplo 5

Se analiza la angiogénesis mediante la medida de la densidad en microvasos del tumor (MVD) empleando inmunohistoquímica. Se someten a
5 tintado las secciones tumorales congeladas con un marcador de superficie de vasos CD-31 y se cuantifica de forma manual la cantidad de vasos en distintas zonas de la sección del tejido. Los estudios demostraron que la administración por vía oral BID del compuesto de fórmula 1 durante 2 a 3 semanas redujeron el número de vasos sanguíneos en tumores tratados en un 70% en
10 comparación con los tumores control. Se observa esta disminución de la densidad en los microvasos tras el tratamiento en todos los modelos de tumor empleados, incluyendo el LLC, MV522 y M24met. Cuando se libera de forma continua mediante una bomba Alzet osmótica en el modelo de tumor LLC, el compuesto de fórmula 1 produce una inhibición del crecimiento significativa.

15 Los datos de tres estudios indicaron que la inhibición de crecimiento tumoral máxima que se puede conseguir mediante esta clase de agente en el modelo LLC era de un 78%. A concentraciones de plasma tan bajas como 55 ± 17 ng/ml (N = 3), se consigue una inhibición del crecimiento máxima de un 90%. Esta concentración se designa como la concentración biológicamente activa
20 (BAC). La inhibición de crecimiento máxima al 50% se asocia con una concentración en plasma de 28 ± 11 ng/ml (N = 3). Esta concentración se

designa como la concentración de eficacia mínima (MEC). En el grupo de estudio 1, se asocia un 70% del MGI producido mediante infusión continua del compuesto con una AUC (0-24) de 574 ng hr/ml, mientras que en el mismo estudio una AUC₍₀₋₂₄₎ de 720 mg h/ml tras dosificación por vía oral BID dio lugar a una inhibición de crecimiento máxima de un 40% (MGI). Estos resultados sugieren que la eficacia anti-tumor vista en este modelo se consigue por medio de la concentración y en las ratas puede ser suficiente una concentración baja continua del compuesto para producir la eficacia anti-tumor máxima.

El compuesto de fórmula 1 fue eficaz como un agente único en el modelo de injerto heterólogo del carcinoma de mama humano MDA-MB-231. En la preparación para un estudio de eficacia con la combinación del compuesto de fórmula 1 y docetaxel en este modelo, se lleva a cabo un estudio preliminar en ratas desnudas para determinar el efecto de interacciones fármaco – fármaco potenciales sobre el PK y la tolerabilidad. Tras la administración intravenosa de 15 ó 30 mg/kg de docetaxel una vez a la semana durante 3 semanas se identifica una disminución en el peso corporal (7% y 11% respectivamente) en comparación con el control en los animales tratados con docetaxel. No se observa diferencia en el peso corporal entre animales tratados con docetaxel solo y aquellos a los que se administró docetaxel y el compuesto de fórmula 1 (30 mg/kg/día durante 16 días; por vía oral). La administración de docetaxel no afectó a la AUC del compuesto de fórmula 1, mientras que los valores de C_{max} de AG-013736 se redujeron de forma significativa en los grupos de combinación en comparación con el compuesto de fórmula 1 solo.

El examen histológico de tejidos seleccionados (hígado, riñones,

corazón, bazo, estómago, intestino delgado y grueso, ovarios, esternón, articulación) no reveló efectos sobre el órgano diana en ratas tratadas con el compuesto de fórmula 1 como un agente único en el presente estudio. Los cambios observados en ratas tratadas con docetaxel incluyeron necrosis folicular en ovarios e hipocelularidad de la médula ósea de mínima a suave. El tratamiento combinado del compuesto de fórmula 1 y docetaxel no exacerbó el efecto de docetaxel sobre el ovario, pero se observó una intensidad aumentada de la hipocelularidad de la médula ósea (de mínima a moderada) en animales a los que se administró la combinación de compuesto de fórmula 1 / docetaxel. Además se observa hemorragia de la médula ósea en animales tratados con la combinación a modo de un efecto secundario de la intensidad aumentada de hipocelularidad.

El compuesto de fórmula 1 y docetaxel se combinaron para asegurar la eficacia en el modelo de tumor MDA-MB-231. El compuesto de fórmula 1 solo (25, 5 y 1 mg/kg, por vía oral, BID, administrado durante 3 semanas) dio lugar a una inhibición del crecimiento tumoral dependiente de la dosis. También fue eficaz el docetaxel solo (intravenosa, semanal) a 20 y 10 mg/kg pero no a 2 mg/kg. Pareció que podría haber una interacción terapéutica beneficiosa entre el compuesto de fórmula 1 y docetaxel. Esta ventaja fue más evidente cuando se combinan los agentes tanto a dosis altas como medias. Las incidencias de regresión parcial (reducción de un 16% a un 97% en el tamaño del tumor) y respuesta completa en las experiencias de combinación a dosis alta y media fueron muy superiores que aquellas en los grupos de agente individual solo a la misma dosis. Este no es un hallazgo definitivo debido a los grupos limitados y a una franja de tiempo relativamente corta del estudio. El compuesto de fórmula

1 fue bien tolerado a todas las dosis. Hubo un declive de un 3% a un 7% del peso corporal medio en el grupo de combinación a dosis alta (25 mg/kg de compuesto 1 y 20 mg/kg de docetaxel) tras la tercera dosis del agente quimioterapéutico, en comparación con todos los demás grupos. Los análisis
5 farmacocinéticos demostraron que los valores de AUC del compuesto de fórmula 1 no se vieron afectados por la presencia de docetaxel, pero los valores de C_{max} se vieron reducidos de forma significativa en los grupos de combinación en comparación con el grupo de compuesto de fórmula 1 solo.

Se investiga la eficacia anti-tumor del compuesto de fórmula 1 en
10 combinación con docetaxel en el modelo LLC. El modelo LLC es altamente resistente al docetaxel. A la MTD dada (30 mg/kg de dosis semanal, intravenosa) se observa poco retraso en el crecimiento tumoral (TGD) con el agente citotóxico (TGD = 3,2 días). Todas las ratas fueron sacrificadas en los 28 días de experimento debido a los grandes tumores primarios. Por el
15 contrario, el compuesto de fórmula 1 como agente único generó una dependencia a la dosis y un TGD estadísticamente significativo (13,4 días a 10 mg/kg y 15,4 días a 30 mg/kg, por vía oral, BID). Sin embargo el agente solo retrasó, pero no detuvo, la metástasis en el pulmón. El TGD (20,4 días) del grupo de combinación a dosis alta, pero no el grupo de combinación a dosis
20 baja (TGD = 15,2 días), fue estadísticamente distinto según el agente simple solo ($P = 0,0079$ y $P = 0,254$ respectivamente). Más animales (3/10) alcanzaron el punto final objetivo en el grupo de combinación de dosis alta, pero no en el grupo de combinación a dosis baja. En conclusión la terapia de combinación a dosis alta del compuesto de fórmula 1 y docetaxel puede generar mayor retraso
25 de crecimiento tumoral primario y metástasis que cualquier monoterapia sola,

pero no da lugar a una cura completa.

Un estudio que empleaba el modelo de tumor MV522 demostró que una dosis por vía oral (QD) de 60 mg/kg diaria única del compuesto de fórmula 1 da lugar a un efecto de inhibición del crecimiento tumoral similar al facilitado por 30 mg/kg, por vía oral, BID ($p = 0,154$). Además la eficacia anti-tumor no parecía comprometerse cuando se dosificaba por vía oral, BID a 30 mg/kg durante cinco días consecutivos seguidos de 2 días de descanso de dosificación, en comparación con la administración diaria por vía oral BID empleando la misma concentración de dosis ($p = 0,223$). Estos resultados sugirieron que en este modelo de tumor no clínico podría ser posible administrar el compuesto de fórmula 1 bien QD o con cierta programación de dosificación interina y esperar alcanzar una eficacia anti-tumor significativa.

Se investigaron el intervalo de tiempo de inhibición del receptor y concentraciones del compuesto de fórmula 1 requeridos para producir una eficacia anti-tumor en el modelo de injerto heterólogo MV522. Los resultados mostraron que con la dosificación por vía oral (QD o BID) era necesaria aproximadamente una exposición diaria de 24 horas por encima de EC_{50} (5 ng/ml) para una eficacia anti-tumor $\geq 50\%$. Fue necesario un mínimo de exposición de 4 horas diarias a una concentración en plasma $\geq 40 - 60$ ng/ml con el fin de conseguir una inhibición de crecimiento tumoral de un 90%. Una exposición fuera del anterior umbral no garantizaba una eficacia adicional. Hubo una pérdida de peso corporal similar con el grupo BID o QD; en ambos casos por debajo de un 5%. Por tanto, dadas una dosis y tiempo de exposición apropiadas, el régimen QD puede ser tan efectivo como el régimen BID.

También se demostró que la exposición continua mediante bombas Alzet

generó mayor eficacia anti-tumor mediante el compuesto de fórmula 1 en comparación con la dosificación periódica regular. La liberación mediante las bombas a 10 mg/ml produjo una exposición sistemática media constante de 30 mg/ml, lo cual dio lugar a estasis tumoral. Por el contrario, dosis de saturación (por vía oral, BID) que dieron lugar a concentraciones en plasma del compuesto de fórmula 1 por encima de la EC_{50} prevista, podrían generar solo retraso en el crecimiento tumoral. Por tanto, la exposición sistemática continua del compuesto de fórmula 1 pareció ser más efectiva que el régimen de dosificación oral diaria doble en el tratamiento del tumor.

También se estudió la eficacia anti-tumor del compuesto de fórmula 1 que emplea el régimen de dosificación intermitente. Los grupos de tratamiento fueron como sigue: vehículo de dosificación diaria, vehículo intermitente, dosis diaria de 30 mg/kg (BID), y una dosis intermitente de 30 mg/kg. El programa de dosificación intermitente fue como sigue: ciclo 1 (días 12 – 18 – dosificación y días 19 – 28 – sin dosificación), y ciclo 2 (días 29 – 36 – dosificación y días 37 – 44 – sin dosificación). La dosificación comenzaba cuando el tamaño medio del tumor era de 250 mm³; se administró a todos AG-013736 (por vía oral, BID). En general, hubo una diferencia significativa entre la dosificación BID intermitente y diaria, siendo más efectivo el régimen de dosificación diario continuo en la generación del retraso en el crecimiento. Para el grupo de fármaco dosificado de forma intermitente los tumores recuperaron la velocidad de crecimiento normal en los 3 – 4 días tras la paralización de la dosificación. Sin embargo, la inhibición del crecimiento tumoral se resumió a los dos días de la dosificación del ciclo 2. Como se esperaba no se observó regresión en alguno de los grupos.

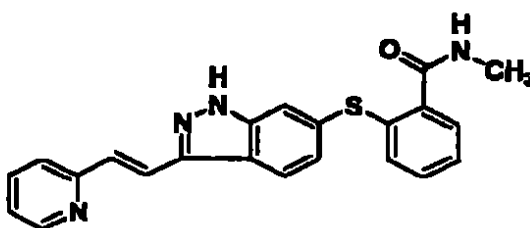
Aunque la invención se ha ilustrado como referencia a las realizaciones específicas y preferidas, los especialistas en la técnica reconocerán que se pueden realizar variaciones y modificaciones a partir de experimentación rutinaria y práctica de la invención. Por tanto, no se pretende que la invención
5 esté limitada por la anterior descripción, pero se define mediante las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Habiendo descrito como antecede la presente invención se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1. Una forma de dosificación para administración a un mamífero, comprendiendo la forma de dosificación un compuesto de fórmula 1:



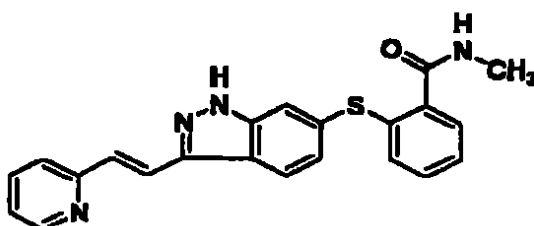
1

una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una mezcla de los mismos, en una cantidad efectiva para proporcionar un valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas de 25 a 4500 ng·hr/ml del compuesto de fórmula 1 o metabolitos activos del mismo, tras la administración al mamífero.

2. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el valor en plasma sanguíneo AUC a las 24 horas es de 100 a 800 ng·hr/ml.

3. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la forma de dosificación es una forma de dosificación oral.

4. Una forma de dosificación que comprende un compuesto de fórmula 1:



1

una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una mezcla de los mismos, en una cantidad de 0,5 a 30 mg.

5 5. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la cantidad es de 2 a 10 mg.

6. La forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la forma de dosificación es una forma de dosificación oral.

10

7. Un procedimiento de tratamiento del crecimiento celular anormal en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de la forma de dosificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

15 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la forma de dosificación se administra de forma oral.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la forma de dosificación se administra a una frecuencia de dosificación de al menos una vez al día.

20

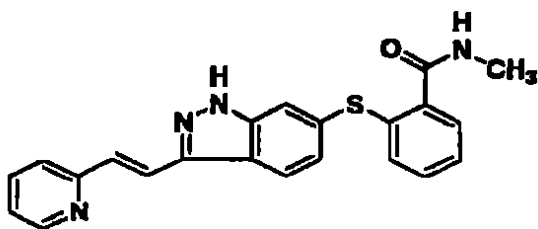
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la forma de dosificación se administra a una frecuencia de dosificación de al menos dos veces al día.
- 5 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 – 10, en el que el mamífero permanece en ayunas durante al menos dos horas antes de la etapa de administración, al menos dos horas después de la etapa de administración, o al menos dos horas tanto antes como después de la etapa de administración.
- 10 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 – 11, en el que el crecimiento celular anormal es cáncer.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el cáncer
- 15 se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello del útero,
- 20 carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, cáncer de vejiga,
- 25 cáncer del riñón o uréter, carcinoma de las células renales, carcinoma de la

pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), linfoma del CNS primario, tumores de la médula espinal, glioma troncoencefálico, adenoma de la pituitaria y combinaciones de los mismos.

- 5 14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 –
13, en el que el procedimiento comprende además la administración conjunta
de un agente anti-tumoral seleccionado del grupo constituido por inhibidores
mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos para
intercalación, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular,
10 enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta
biológica, anticuerpos, citotóxicos, antihormonas, anti-andrógenos y mezclas de
los mismos.
- 15 El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el agente
15 anti-tumor es el docetaxel.

Resumen

La invención proporciona formas de dosificación de un compuesto de fórmula 1:



1

- 5 o sales, solvatos o precursores farmacológicos farmacéuticamente aceptables del mismo. La invención proporciona además procedimientos de tratamiento del crecimiento celular anormal, tal como cánceres, mediante la administración de formas de dosificación a un mamífero.

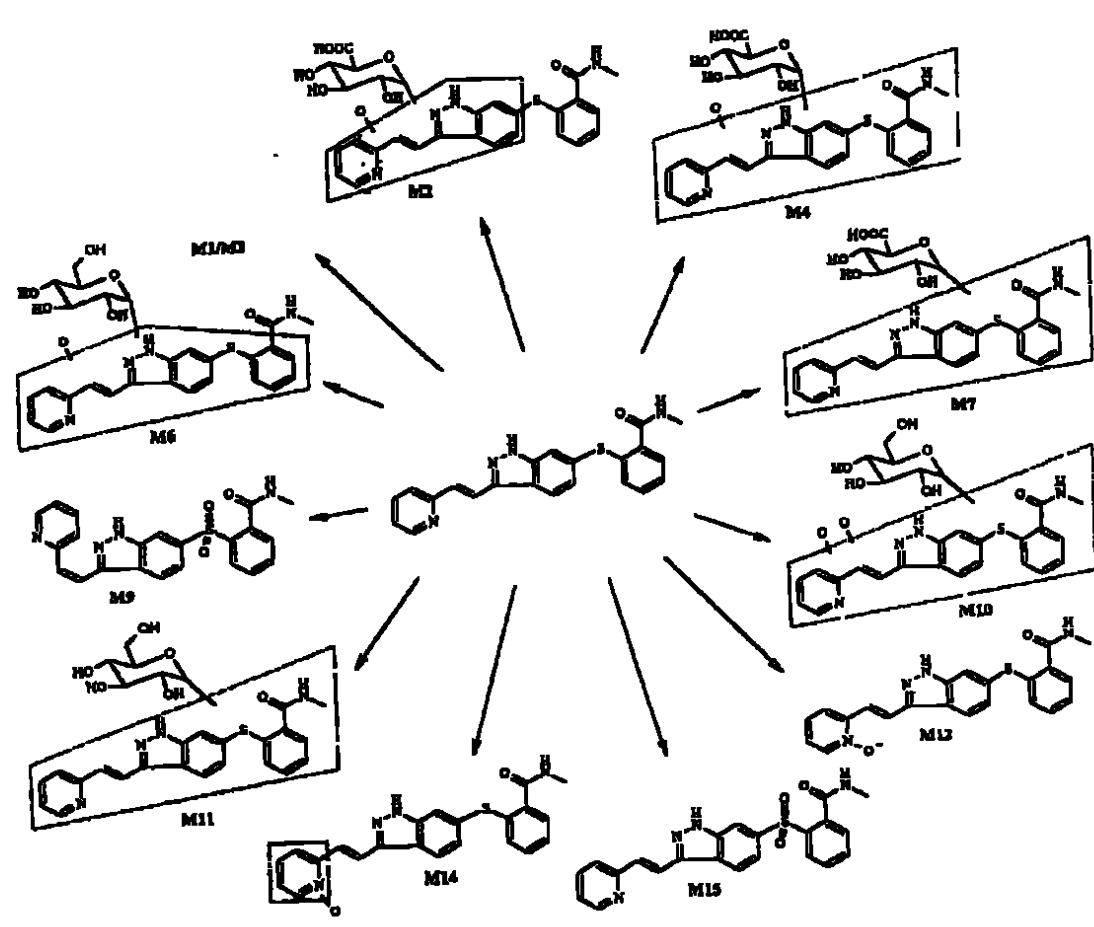


FIG. 2

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC25581A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/000867
Fecha de presentación internacional: 17.03.2004
Fecha de prioridad: 03.04.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: A61K31/4439, A61K31/337, A61P35/00.
Solicitante: PFIZER INC. et. al.

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme el Artículo 36.

2. Este INFORME consta de un total de 8 hojas, incluida la presente hoja de portada.

3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.

a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:

☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).

☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.

b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

☒	Recuadro I	Base de este informe
☐	Recuadro II	Prioridad
☒	Recuadro III	Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial
☐	Recuadro IV	Falta de unidad de Invención
☒	Recuadro V	Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración
☐	Recuadro VI	Ciertos documentos citados
☐	Recuadro VII	Defectos en la Solicitud Internacional
☐	Recuadro VIII	Observaciones relativas a la solicitud internacional

Fecha de radicación de la demanda: 19.04.2004

Fecha de elaboración de este reporte: 23.02.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen

Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea

D-80298 - Munich

Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d

Fax: +49-89 2399 - 4465.

Funcionario Autorizado: Paul Soto, R.

Tel: + 49 89 2399-7346

Recuadro No. I Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma____, que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un*

requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe):

Descripción, Páginas

1-25 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

Dibujos, hojas

1/2-2/2 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituída".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
☒ a las reivindicaciones Nos. 7-15 (aplicación industrial)

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 7-15 (aplicación industrial) en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

Ver hoja separada

- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☐ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ la lista de de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

La lista en papel ☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

La lista en formato legible por ordenador

☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

- ☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidas y/o de aminoácidos, si únicamente se han presentado en formato legible por ordenador, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver recuadro suplementario para más detalles.

**Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35(2)
con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial:
anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración**

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 4, 5, 11-15
	No:	Reivindicaciones 1-3, 6-10, 12-14
Nivel Inventivo (NI)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-15
Aplicación Industrial (AI)	Si:	Reivindicaciones 1-6; para 7-15 ver hoja separada
	No:	Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja adjunta.

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL - HOJA
ANEXA
Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/000867**

Re Sección III

No se establece opinión con respecto a novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

Las reivindicaciones 7-15 se relacionan con materia considerada por esta Autoridad cubierta por las provisiones establecidas en la Regla 67.1 (iv) del PCT. Por lo tanto, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicación industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

Re Sección V

Declaración razonada con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración.

2. Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: US-B-6 531 4911 (BENDER STEVEN LEE ET. AL), 11 de marzo de 2003

D2: HU-LOWE DANA ET AL., REUNION ANUAL DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER, vol. 43, Marzo 2002 (2002-03), página 1082, XP.001182128 & 93RD REUNION ANUAL DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; APRIL 6-10, 2002 ISSN: 0197-016X

D3: LAIRD A D ET AL., OPINION EXPERTA EN LA INVESTIGACIÓN DE MEDICAMENTOS, REINO UNIDO, vol. 12, No. 1, 1 de enero de 2003, páginas 51-64, XP009032480 ISSN: 1354-3784

D4: MARME DIETER, PERIODICO DE LA INVESTIGACIÓN DEL CANCER Y ONCOLOGIA CLINICA (2003-11), VOL. 129, NR. 11, página(s) 607-620, XP001182072 ISSN: 0171-5216

D5: WILMES LISA ET AL., REUNION ANUAL DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER, vol. 44, (2003-07) Página 751, XP001182127 & 94TH REUNION ANUAL DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER; WASHINGTON, DC, USA; Julio 11-14, 2003 ISSN: 0197-016X

D6: WICKMAN GRANT ET AL., REUNION ANUAL DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER, vol 44 (2003-07), páginas 752-753, XP 001182126 & 94TH REUNION ANUAL DE LA ASOCIACION AMERICANA PARA LA INVESTIGACION DEL CANCER; WHASHINGTON, DC, USA; Julio 11-14, 2003 ISSN 0197-016X

D7: PAUL SAKI ET AL., BLOOD vol. 102, no. 11, 16 de noviembre de 2003 (2003-11-16), Páginas 649^a, XP0022285678 & 45TH REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD AMERICANA DE HEMATOLOGIA; SAN DIEGO, CA, USA; Diciembre 6-9, 2003 ISSN: 0006-4971

Si no indicó por otra parte, los pasajes relevantes son aquéllos mencionados en el Reporte de Búsqueda Internacional .

3. La presente invención se relaciona con formulaciones dosificadas para la administración en mamíferos que comprenden un compuesto específico de la fórmula I, en una cantidad efectiva que proporcione a 24 horas el valor de plasma de sangre AUC de 25 a 4500 ng-hr/ml después de administrarse (reivindicación 1); y a una forma de dosificación que comprende dicho compuesto en una cantidad de 0.5 a 30 mg (reivindicación 4). Reivindicación 7 está dirigida a un método de tratamiento de crecimiento celular anormal en un mamífero que comprende administrar una de las formas de dosificación anteriores. En la reivindicación 14 el método comprende además co-administrar un agente anti-tumor seleccionado del grupo específico (en la reivindicación 15, el agente anti-tumor es docetaxel).

4. Las presentes reivindicaciones 1 y 2 no reúnen los requisitos del Art. 6 del PCT. La limitación de los rasgos correspondientes, refiriéndose al valor del plasma de la sangre a ser logrado en la cantidad real, en la forma de la dosificación no está claro. Así, en la ausencia de cualquier otro rasgo técnico, dichas reivindicaciones están consideradas como dirigidas a una composición farmacéutica que comprende un compuesto específico.

5.1 La presente solicitud no reúne los requisitos del PCT con respecto a la novedad (Art. 33(2)) por las siguientes razones.

D1 revela los compuestos indazo como inhibidores de protein kinasa y también formas de dosificación oral que comprenden las mismas, útil para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que envuelven la proliferación celular. El compuesto de la presente solicitud es solo revelado por su fórmula. Sin embargo, D1 solo revela combinaciones con otros agentes quimioterapéuticos como el taxotere (docetaxel). Sin embargo, la combinación específica de los compuestos de la fórmula I de la presente solicitud y docetaxel no está revelado en D1. Por consiguiente, este documento es considerado como novedoso desvirtuando las presentes reivindicaciones 1-3, 6-8 y 12-14.

D2 revela los compuestos AG013736 como inhibidores de tirosin kinasa y su uso para el tratamiento del colon y tumores pulmonares. D2 solo revela la administración oral dos veces al día, y es por consiguiente novedoso desvirtuando las presentes **reivindicaciones 1-3, 6-10 y 12-13**.

D3 revela solo los compuestos AG 013736 como inhibidores de tirosin kinasa y para el tratamiento de tumores, y es considerado como novedoso desvirtuando las presentes reivindicaciones 1-4, 7, 12 y 13.

D4-D7 son documentos P. Así, ellos serían novedosos desvirtuando si la reivindicación de prioridad de la presente solicitud, resulta no ser valida. Todos ellos desvirtúan el compuesto AG013736 como agente anticanceroso. Además, D4 y D6 divulga una combinación terapéutica junto con docetaxel.

5.2 La materia de las presentes reivindicaciones 4, 5, 11 y 15 parecen ser novedosas sobre el arte previo.

6.1 El nivel inventivo no puede ser reconocido para las presentes reivindicaciones 1-3, 6-10 y 12-14 hasta donde su materia no sea novedosa.

6.2 Además, la materia de las presentes reivindicaciones 4, 5, 11 y 15 no parecen involucrar el nivel inventivo (Art. 33(3) del PCT).

D2 el cual se considera como el estado de la técnica más cercano, divulga el compuesto AG013736 para el tratamiento de cáncer y su administración oral 2 veces al día.

La presente solicitud de acuerdo con la reivindicación 4 difiere de D2 en que la forma de dosificación comprende de 0.5 a 30 mg. Esto consiste en la selección de un rango de revelación en D2. Sin embargo, llegando a este rango es una materia de ensayo rutinario y por error la aplicación normal de los procedimientos del plan sin ejercicio de cualquier habilidad inventiva. Los mismos argumentos aplican para el rasgo técnico de la reivindicación 11.

La presente solicitud de acuerdo con la reivindicación 15 difiere de D2 en que el compuesto AG013736 es administrado junto con docetaxel. Los ejemplos en la aplicación parecen demostrar una efectiva adición y buena tolerancia de la co-terapia. Sin embargo, en orden de reconocer el nivel inventivo un efecto de sinérgica debe demostrarse. De otro modo, esta co-terapia puede solo ser considerada como una alternativa obvia, dado por el factor de dos agentes, separadamente, que son conocidos en terapia para el cáncer, y que D1 ya motiva a una persona experimenta en una terapia combinada (ver parágrafo 2, en la columna 13).

7.1. Para la evaluación de las reivindicaciones 7-15 de la presente, sobre si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable aquella materia que reivindique el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero permite, sin embargo, reivindicar sobre un compuesto conocido para primero uso en tratamiento médico y el uso de tal compuesto en la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

7.2. Las reivindicaciones 1-6 reúnen el criterio expresado en el Art. 33(4) del PCT, porque su materia es susceptiblemente de aplicación industrial.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC25581A		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA416
International application No PCT/B2004/000867		International filing date (day/month/year) 17.03.2004	Priority date (day/month/year) 03.04.2003	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K31/4439, A61K31/337, A61P35/00				
Applicant PFIZER INC. et al				
1 This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2 This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box b ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 19.04.2004		Date of completion of this report 23.02.2005		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465		Authorized Officer Paul Soto, R Telephone No +49 89 2399-7346 		

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/IB2004/000867

94

Box No. I Basis of the report

- 1 With regard to the **language**, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*

Description, Pages

1-25 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

Drawings, Sheets

1/2-2/2 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*)
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*).

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c))

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*).
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*).

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos 7-15 (industrial applicability)

because

☒ the said international application, or the said claims Nos. 7-15 (industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify).

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions

☐ See separate sheet for further details

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	4, 5, 11, 15
	No: Claims	1-3, 6-10, 12-14
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-6; for 7-15 see separate sheet
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70 7):

see separate sheet

97

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Claims 7-15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

2. Reference is made to the following documents:

- D1: US-B-6 531 4911 (BENDER STEVEN LEE ET AL), 11 March 2003
- D2: HU-LOWE DANA ET AL., PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 1082, XP001182128 & 93RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; APRIL 06-10, 2002 ISSN: 0197-016X
- D3: LAIRD A D ET AL., EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, UNITED KINGDOM, vol. 12, no. 1, 1 January 2003, pages 51-64, XP009032480 ISSN: 1354-3784
- D4: MARME DIETER, JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY (2003-11), VOL. 129, NR. 11, PAGE(S) 607-620 , XP001182072 ISSN: 0171-5216
- D5: WILMES LISA J ET AL., PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 44, (2003-07), page 751, XP001182127 & 94TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; JULY 11-14, 2003 ISSN: 0197-016X
- D6: WICKMAN GRANT ET AL., PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 44 (2003-07), pages 752-753, XP001182126 & 94TH ANNUAL MEETING OF

98

THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH;
WASHINGTON, DC, USA; JULY 11-14, 2003 ISSN: 0197-016X
D7: PAUL SAKI ET AL., BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 649a, XP002285678 & 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971

If not indicated otherwise, the relevant passages are those mentioned in the International Search Report.

3. The present application relates to a dosage form for administration to a mammal comprising the compound of the specified formula I, in an amount effective to provide a 24-hour AUC blood plasma value of from 25 to 4500 ng-hr/ml after administration (**claim 1**); and to a dosage form comprising said compound in an amount of from 0.5 to 30 mg (**claim 4**). **Claim 7** is directed to a method of treating abnormal cell growth in a mammal comprising administering one of the previous dosage forms. In **claim 14** the method further comprises coadministering an anti-tumor agent selected from the specified group (in **claim 15**, the antitumor agent is docetaxel).
4. Present claims 1 and 2 do not meet the requirements of Art. 6 PCT. The limitation of the corresponding features, namely referring to the blood plasma value to be achieved on the actual amount in the dosage form is not clear. Thus, in the absence of any other technical feature, said claims are regarded as directed to a pharmaceutical composition comprising the specified compound.
- 5.1. The present application does not meet the requirements of the PCT with respect to novelty (Art. 33(2)) for the following reasons.

D1 discloses indazole compounds as protein kinase inhibitors and also oral dosage forms comprising them, useful for the treatment of cancer and other diseases involving cell proliferation. The compound of the present application is also disclosed by its formula. Furthermore, D1 also discloses combinations with other chemotherapeutic agents such as taxotere (docetaxel). However, the specific combination of the compound of formula I of the present application and docetaxel is not disclosed in D1. Therefore, this document is regarded as novelty destroying for present **claims 1-3, 6-8 and 12-14**.

D2 discloses the compound AG013736 as tyrosine kinase inhibitor and its use for the treatment of colon and lung tumors. **D2** also discloses the oral administration, twice daily, and is therefore novelty destroying for present **claims 1-3, 6-10 and 12-13**.

D3 also discloses the compound AG013736 as tyrosine kinase inhibitor and for the treatment of tumours, and is novelty destroying for present **claims 1-4, 7, 12 and 13**.

D4-D7 are P-documents. Thus, they would be novelty destroying if the priority claimed for the present application turned out to be not valid. They all disclose the compound AG013736 as anticancer agent. Furthermore, **D4** and **D6** disclose a combination therapy together with docetaxel.

- 5.2. The subject-matter of present claims 4, 5, 11 and 15 appears to be novel over the prior art.
- 6.1. No inventive step can be recognised for present claims 1-3, 6-10 and 12-14 as far as their subject-matter is not novel.
- 6.2. Furthermore, the subject-matter of present claims 4, 5, 11 and 15 does not appear to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT).

D2, which is regarded as the closest prior art, discloses the compound AG013736 for the treatment of cancer and its oral administration twice daily.

The present application according to claim 4 differs from **D2** in that the dosage form comprises from 0.5 to 30 mg. This consists in the selection of a range from the disclosure in **D2**. However, arriving at this range is a matter of routine trial and error by applying normal design procedures without the exercise of any inventive skill. The same arguments apply for the technical feature of claim 11.

The present application according to claim 15 differs from **D2** in that the compound AG013736 is administered together with docetaxel. The examples in the application appear to demonstrate an additivity effect and good toleration of the co-therapy. However, in order to recognise an inventive step a synergistic effect should be demonstrated. Otherwise, this co-therapy can only be regarded

as an obvious alternative, given the fact that the two agents, separately, are known in cancer therapy, and that D1 already motivates the skilled person to such a combination therapy (see paragraph 2, on column 13).

- 7.1. For the assessment of the present claims 7-15 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
- 7.2. Claims 1-6 meet the criterion set forth in Article 33(4) PCT because their subject-matter is susceptible of industrial application.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/IB2004/000867

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/4439 A61K31/337 A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 6 531 491 B1 (BENDER STEVEN LEE ET AL) 11 March 2003 (2003-03-11) 4th compound from the bottom on column 11 column 13, paragraph 2; examples 33a, 59f column 21, line 22 - column 22, line 31 columns 384-385; example 2 ----- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

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

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

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

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

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 2004

Date of making of the international search report

05/08/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Paul Soto, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/IB2004/000867

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	HU-LOWE DANA ET AL: "Pharmacological activities of AG013736, a small molecule inhibitor of VEGF/PDGR receptor tyrosine kinases" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 1082, XP001182128 & 93RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; APRIL 06-10, 2002 ISSN: 0197-016X abstract	1-13
X	LAIRD A D ET AL: "Small molecule tyrosine kinase inhibitors: Clinical development of anticancer agents" EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS 01 JAN 2003 UNITED KINGDOM, vol. 12, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 51-64, XP009032480 ISSN: 1354-3784 page 55; table 2 pages 55-56, paragraph 3.2	1-13
P,X	MARME DIETER: "The impact of anti-angiogenic agents on cancer therapy." November 2003 (2003-11), JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, VOL. 129, NR. 11, PAGE(S) 607-620 , XP001182072 ISSN: 0171-5216 page 612; table 1 page 613, left-hand column, paragraph 4	1-15
P,X	WILMES LISA J ET AL: "AG-013736, a novel VEGFR TK inhibitor, suppresses tumor growth and vascular permeability in human BT474 breast cancer xenografts in nude mice." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 44, July 2003 (2003-07), page 751, XP001182127 & 94TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; JULY 11-14, 2003 ISSN: 0197-016X abstract	1-13
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCI/IB2004/000867

102

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,X	WICKMAN GRANT ET AL: "Further characterization of the potent VEGF/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor AG-013736 in preclinical tumor models for its antiangiogenesis and antitumor activity." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 44, July 2003 (2003-07), pages 752-753, XP001182126 & 94TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; JULY 11-14, 2003 ISSN: 0197-016X abstract	1-15
P,X	PAUL SAKI ET AL: "AG-013736, a potent VEGF/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor, is active against lymphoma growth and chemotherapy-induced vasculogenesis." BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), page 649a, XP002285678 & 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971 abstract	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/IB2004/000867

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos. 7-15 (industrial applicability)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely.
Although claims 7-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2004/000867

103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6531491	B1	11-03-2003	US 6534524 B1 18-03-2003
			AU 5785200 A 22-01-2001
			BG 106380 A 30-09-2002
			BR 0012352 A 14-05-2002
			CA 2383630 A1 11-01-2001
			CN 1137884 C 11-02-2004
			CZ 20014634 A3 11-09-2002
			EA 4460 B1 29-04-2004
			EE 200100717 A 17-02-2003
			EP 1218348 A2 03-07-2002
			HR 20020109 A2 31-12-2003
			HU 0202490 A2 28-11-2002
			JP 2003503481 T 28-01-2003
			NO 20015797 A 01-03-2002
			NZ 516676 A 26-09-2003
			SK 19252001 A3 06-11-2002
			WO 0102369 A2 11-01-2001
			ZA 200110061 A 06-02-2003

Folios: 183

Fecha (AMD): 2002-09-24 16:50:48
Transmite: UII PCI-PATENT 179 FASE NNCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2660 DIVISION DE NUEVAS ORIENTACIONES

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION			
MODELO DE UTILIDAD		()	()
-	Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
-	Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-	Descripción de la invención.	()	()
-	Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
-	Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA	()	INCOMPLETA	()
DISEÑO INDUSTRIAL		()	()
-	Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
-	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
-	Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-	Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA	()	INCOMPLETA	()
ESQUEMA DE TRAZADO		()	()
-	Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
-	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
-	Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
-	Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA	()	INCOMPLETA	()

Firma Responsable:

Fecha:

105

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC

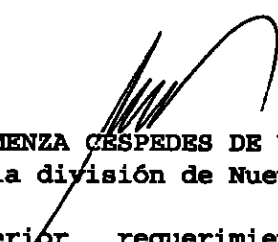
REFERENCIA	Radicación No.	5 98900
	Solicitud internacional	IB2004/000867
	Fecha inicio fase nacional	03/11/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11799

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

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

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

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


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 09 DIC. 2005
adpal