



Organización CSA Ltda



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

08 - 24626

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: FORMAS SALINAS SÓLIDAS DE UNA 2-INDOLINA SUSTITUIDA
CON PIRROL

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

A 61 k 3'/404

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 07 de Marzo de 2008

P2008/000022

55

OLARTEAISBECK



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-024626-00000-0000

Fecha: 2008-03-07 16:53:53 Dep: 2020 NUECREACION
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 102

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2008/000022

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC.

Dirección: Eastern Point Road, Groton, CT
06340, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O 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: CHANGQUAN CALVIN SUN, MICHAEL HAWLEY

Dirección: 2420 Rikkard Drive, Thousand Oaks, CA 91362 y 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105 E.U.A

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/002506

Fecha

Septiembre 8, 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/034272

Fecha

Marzo 29, 2007

6

Título (54) FORMAS SALINAS SÓLIDAS DE UNA 2-INDOLINA SUSTITUIDA CON PIRROL

Clasificación Internacional (51) C07D 403/06, A61K 31/404, A61P 35/00

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 19, 2005

(31) Número de Solicitud

60/718, 586

9

Comprobante de pago No. 08-20,065

Fecha

Marzo 7, 2008

0

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. Adjunto Copia simple. Ver expediente No. 06-033.245

☒

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.

☐

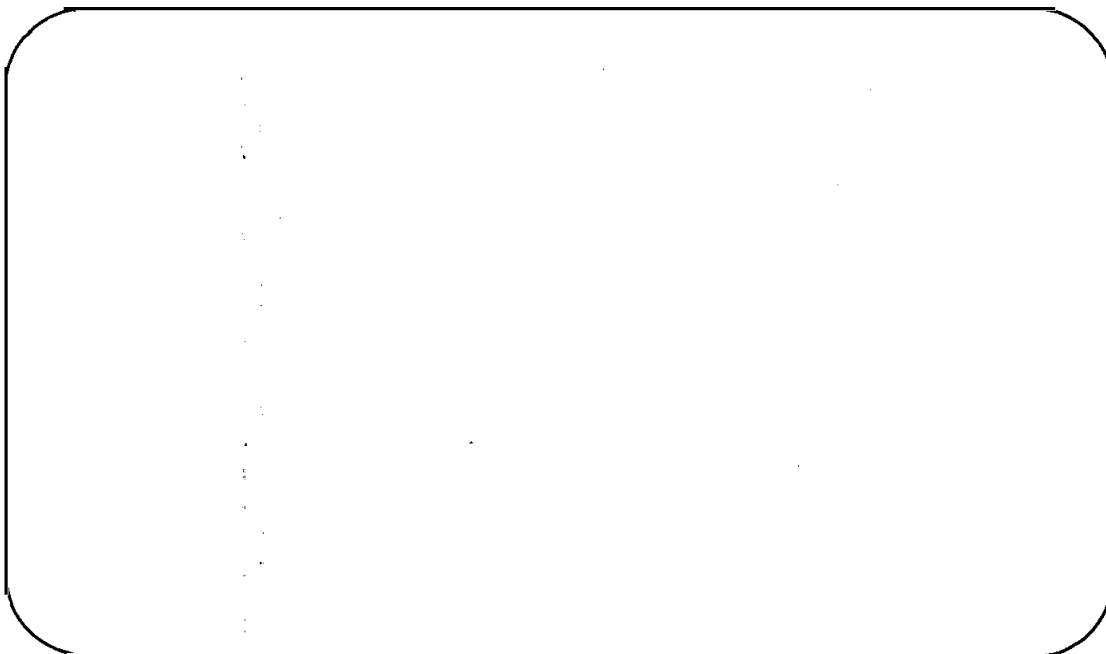
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

1

FIGURA CARACTERÍSTICA:



2

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-024626- -00000-0000

Fecha: 2008-03-07 16:53:53 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 102

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 20,065
FECHA : MARZO 7 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

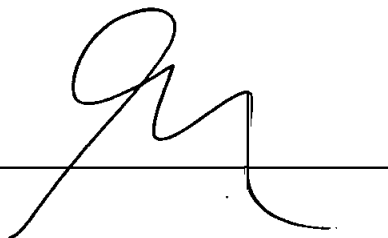
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	106977	06/03/2008	6,473,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

9

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PFIZER PRODUCTS, INC., a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de Grover F. Fuller, Jr, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mí el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 37 1
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION 0138 DE FEBRERO 11 DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

6
ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RUEDA ILLERAS
C. G. S. 11.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION NO. 0130 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

6

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

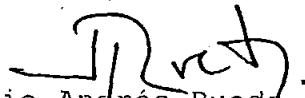
El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman
3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado
4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York
6. El 22 de noviembre de 2005
7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York
8. Bajo el Número NYC-10404952A
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York
10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
Nº 100100000, OTORGADO FEBRERO 1, 2002
SECRETARÍA DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

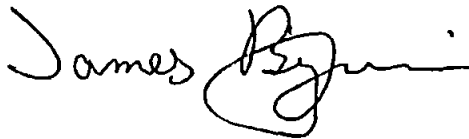
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

COLOMBIA

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahí
Zaava Ravi
Jacqueline Chaparrí
José Luis Londoño
Camilo Álvarez
Felipe Mendoza
Camilo Rodríguez
Santiago Pardo

Of Counsel
Guillermo Chahí
Graciela Mel

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right 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, recourses, 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.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual 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, recursos, 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.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In-Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

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

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street

City New York

State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

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.

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. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01KIG116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

(State of New York)
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 17 day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

Sébase que Yo, ADRIAN PETER MARK WATNEY, 33 Queen Street
Maidenhead, Bekshire SL6 1NB, Reino Unido, un Notario Publico debidamente
autorizado

10

Certifico que servicios consulares Blair Limitada en nombre de su cliente
PFIZER PRODUCTS INC.

Ha presentado este día ante mí el documento anexo que se describe como

CESION, firmado por Changquan Calvin SUN y Michael HAWLEY

y que los mencionados Servicios Consulares de Blair Limitada, han
representado ante mi como presentación de dicho cliente ha representado a
ellos con base en un documento original adjunto con firmas debidamente
autenticas.

Firmado y sellado el, 33 Queen Streep Maidenhead, Bekshire SL6 1NB, Reino
Unido, el 17 De enero de 2008.

[Firmado y sellado]

Adrian Peter Marck Watney

Notario Público

Apostille

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Adrian Peter Marck Watney
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 21 junio de 2008
7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros
8. No. H650271
9. Sello / Estampilla
[Sellado]
10. Firma: P. Wilkinson
[Firmado]

12

CESIÓN

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **PFIZER PRODUCTS INC.** sociedad constituida en virtud de las leyes del **Estado de Delaware, Estados Unidos de América**, cuya dirección postal completa Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, **Estados Unidos de América**, por el presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en **FORMAS SALINAS SÓLIDAS DE UNA 2-INDOLINA SUSTITUIDA CON PIRROL** en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con esta cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

(Fdo) Changquan Calvin SUN

Thousand Oaks CA- 2 de agosto de 2006 - Changquan Calvin SUN

(Fdo) Michael HAWLEY

Ann Arbor, MI - 25 de Julio de 2006 - Michael Hawley

13

BE IT KNOWN that I, ADRIAN PETER MARK WATNEY of 33 Queen Street,
Maidenhead, Berkshire SL6 1NB, United Kingdom, a duly authorised Notary
Public

CERTIFY ONLY that Blair Consular Services Limited on behalf of their client

PFIZER PRODUCTS INC.

have this day presented to me the hereto annexed document describing itself
as

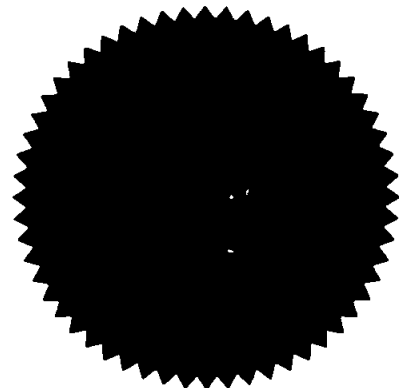
ASSIGNMENT signed by Changquan Calvin SUN and Michael HAWLEY.

and that the said Blair Consular Services Limited have represented to me by
such presentation that their said client has represented to them that the said
annexed document is a authentic original document.

**SIGNED AND SEALED at 33 Queen Street, Maidenhead, Berkshire SL6
1NB, United Kingdom, on 17th January 2008.**



Adrian Peter Mark Watney
Notary Public



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

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

2 Has been signed by Adrian Peter Mark Watney
a été signé par

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

5 21 London/à Londres

6. the/le 21 January 2008

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.

S Number/sous No **H650271**

9 Stamp:
timbre:

10. Signature P Wilkinson



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. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

19

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **SOLID SALT FORMS OF A PYRROLE SUBSTITUTED 2-INDOLINONE** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Thousand Oaks, CA, 02 Aug. 2006.

Place, date and signature - Changquan Calvin SUN

Ann Arbor, MI 25 July 2006

Place, date and signature - Michael HAWLEY

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 March 2007 (29.03.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/034272 A1

(51) International Patent Classification:

C07D 403/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2006/002506

(22) International Filing Date:

8 September 2006 (08.09.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/718,586 19 September 2005 (19.09.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SUN, Changquan**, Calvin [US/US]; 2420 Rikkard Drive, Thousand Oaks, CA 91362 (US). **HAWLEY, Michael** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105 (US).

(74) Agents: **FULLER, Grover, F. Jr.** et al.; c/o Lawrence, Jackie, Pfizer Inc. MS8260-1615, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AI, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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 "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SOLID SALT FORMS OF A PYRROLE SUBSTITUTED 2-INDOLINONE

(57) Abstract: The present invention relates to solid salt forms of the 3-pyrrole substituted 2-indolinone compound 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide. It also relates to polymorphs of the phosphate salt of the amide. The invention further relates to the use of the salts and polymorphs in the treatment of protein kinase related disorders.

WO 2007/034272 A1

SOLID SALT FORMS OF A PYRROLE SUBSTITUTED 2-INDOLINONE**FIELD OF INVENTION**

16

The present invention relates to solid salt forms of a 3-pyrrole substituted 2-indolinone compound, 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide. The foregoing compounds modulate the activity of protein kinases ("PKs"). The compounds of this invention are therefore useful in treating disorders related to abnormal PK activity. Pharmaceutical compositions comprising salts of this compound and methods of preparing them are disclosed. The present invention is also directed to polymorphs of the phosphate salt form of the amide.

BACKGROUND

The following is offered as background information only and is not admitted to be prior art to the present invention.

Solids, including pharmaceuticals, often have more than one crystal form, and this is known as polymorphism. Polymorphism occurs when a compound crystallizes in a multiplicity of solid phases that differ in crystal packing. Numerous examples are cited in the standard references of solid state properties of pharmaceuticals, Byrn, S. R., *Solid-State Chemistry of Drugs*, New York, Academic Press (1982); Kuhnert-Brandstatter, M., *Thermomicroscopy In The Analysis of Pharmaceuticals*, New York, Pergamon Press (1971) and Haleblan, J. K. and McCrone, W. *Pharmaceutical applications of polymorphism. J. Pharm. Sci.*, 58, 911 (1969). Byrn states that, in general, polymorphs exhibit different physical characteristics including solubility and physical and chemical stability.

Because of differences in molecular packing, polymorphs may differ in ways that influence drug release, solid-state stability, and pharmaceutical manufacturing. The relative stability and the interconversions of polymorphs are particularly important to the selection of a marketed drug. A suitable polymorph may hinge upon the issue of physical stability. For example, the selection of a marketed drug may depend upon the availability and selection of a suitable polymorph having desirable characteristics, such as excellent physical stability or the ability to be manufactured in large scale. The performance of the solid dosage form should not be limited by polymorphic transformations during the shelf life of the product. It is important to note that there is no reliable method to predict the observable crystal structures of a

given drug or to predict the existence of polymorphs with desirable physical properties.

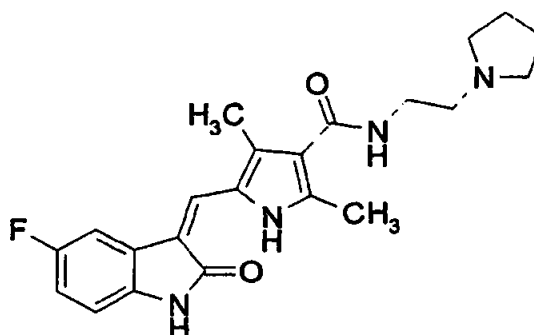
PKs are enzymes that catalyze the phosphorylation of hydroxy groups on tyrosine, serine, and threonine residues of proteins. The consequences of this seemingly simple activity are staggering since virtually all aspects of cell life (e.g., cell growth, differentiation, and proliferation) in one way or another depend on PK activity. Furthermore, abnormal PK activity has been related to a host of disorders, ranging from relatively non-life threatening diseases such as psoriasis to extremely virulent diseases such as glioblastoma (brain cancer).

Receptor tyrosine kinases (RTKs), a class of PK, are excellent candidates for molecular targeted therapy, because they play key roles in controlling cell proliferation and survival and are frequently dysregulated in a variety of malignancies. The mechanisms of dysregulation include overexpression (Her2/neu in breast cancer, epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer), activating mutations (KIT in gastrointestinal stromal tumors, *fms*-related tyrosine kinase 3/*Fli2* (FLT3) in acute myelogenous leukemia), and autocrine loops of activation (vascular endothelial growth factor/VEGF receptor (VEGF/VEGFR) in melanoma, platelet-derived growth factor/PDGF receptor (PDGF/PDGFR) in sarcoma).

Aberrantly regulated RTKs have been described in comparable human and canine cancers. For example, aberrant expression of the *Met* oncogene occurs in both human and canine osteosarcoma. Interestingly, comparable activating mutations in the juxtamembrane (JM) domain of *c-kit* are seen in 50–90% of human gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and in 30–50% of advanced canine MCTs (mast cell tumors). Although the mutations in human GISTs consist of deletions in the JM domain and those in canine MCTs consist of internal tandem duplications (ITDs) in the JM domain, both lead to constitutive phosphorylation of KIT in the absence of ligand binding. The RTKs and their ligands, VEGF, PDGF, and FGF mediate neo-vascularization, known as angiogenesis, in solid tumors. Consequently, by inhibiting the RTKs, the growth of new blood vessels into tumors may be inhibited.

Antiangiogenesis agents, a class of molecules that inhibits the growth of blood vessels into tumors, have much less toxicity to the body compared to conventional anti-cancer drugs. US patent 6,573,293, incorporated herein by reference, discloses, among other compounds, 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-

2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide
(hereinafter "Compound I"). It has the following structure:



Compound I

5 Compound I is a small molecule that exhibits PK modulating ability. The compound is therefore useful in treating disorders related to abnormal PK activity. It is an inhibitor of the RTKs, PDGFR, VEGFR, KIT, and FLT3. Compound I has been shown to inhibit KIT phosphorylation, arrest cell proliferation, and induce cell cycle arrest and apoptosis in malignant mast cell lines *in vitro* expressing various forms of
10 mutant KIT. Compound I and related molecules are effective in preclinical models against tumor xenografts arising from cell lines of diverse human tumor origin.

 Compound I is useful for treating cancers in companion animals, mainly dogs, and is also useful for the treatment of, *inter alia*, cancer in humans. Such cancers include, but are not limited to, leukemia, brain cancer, non-small cell lung cancer,
15 squamous cell carcinoma, astrocytoma, Kaposi's sarcoma, glioblastoma, lung cancer, bladder cancer, head and neck cancer, small-cell lung cancer, glioma, colorectal cancer, genitourinary cancer, and gastrointestinal stromal cancer. Also, Compound I is useful for the treatment of diseases related to overexpression of mast cells, including but not limited to, mastocytosis in humans and mast cell tumors in dogs.

20 Compound I was recently shown to be clinically effective against a number of spontaneous malignancies in dogs. In the study, 11 of 22 canine MCTs showed durable objective responses (partial responses and complete responses) to Compound I treatment; 9 of these MCTs possessed ITDs in the JM domain of *c-kit*.

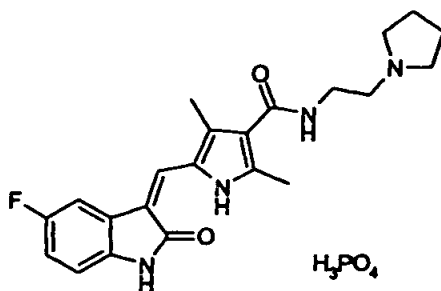
Compound I readily crystallizes. Its solubility is about 10 µg/mL in pH 6 phosphate buffer at 25°C. When the compound was synthesized, very fine particles precipitated out of solution during the last step of synthesis. Subsequent isolation of these fine particles by filtration was slow, and a hard cake resulted after filtration.

- 5 There is a need for a salt of Compound I which has physical stability and desirable physical properties.

SUMMARY OF THE INVENTION

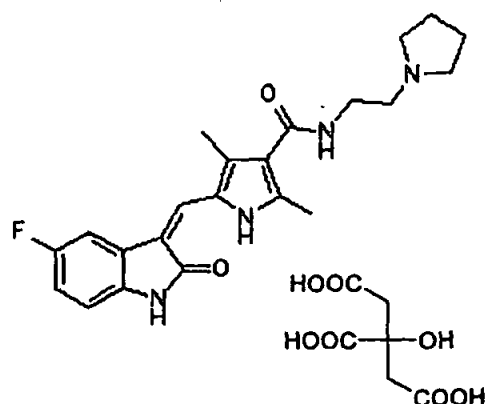
This invention comprises salt forms of Compound I. Five different salt forms of Compound I were synthesized and are described herein. (See Table 1) These
10 include the hydrochloride, fumarate, citrate, phosphate, and ascorbate salts of Compound I. Based on characterization of these salts, the 1:1 phosphate salt, Compound I phosphate, was identified as a salt form with highly desirable characteristics. Polymorph screening revealed the existence of 10 polymorphs of Compound I phosphate, herein named Forms I through X.

- 15 In one aspect, this invention provides two salt forms of Compound I, wherein the salt form is selected from the citrate and phosphate salts, and solvates and polymorphs thereof. In one embodiment, the phosphate salt form with a molecular formula of $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot H_3O_4P$ is selected. In another embodiment, the phosphate salt form with a melting point from about 285 to about 290° C is selected. Compound I
20 phosphate has a structure of



Compound I phosphate

- 25 In another embodiment, the citrate salt, Compound I citrate, which has a molecular formula of $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot C_6H_8O_7$ is selected. In yet another embodiment, the citrate salt form with a melting point from about 178 to about 183° C is selected. Compound I citrate has a structure of



Compound I citrate

A second aspect of the invention is a pharmaceutical composition comprising the phosphate salt or the citrate salt of Compound I, or solvates or polymorphs thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

A third aspect of the invention is a method for the modulation of the catalytic activity of protein kinases comprising contacting said protein kinase with the phosphate or citrate salts of Compound I, or solvates or polymorphs thereof. The protein kinase may be selected from the group consisting of receptor tyrosine kinases, non-receptor protein tyrosine kinases, and serine/threonine protein kinases.

A fourth aspect of the invention is a method of preventing or treating a protein kinase related disorder in an organism comprising administering to said organism a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising the phosphate salt or the citrate salt of Compound I, or solvates or polymorphs thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. In one embodiment, the organism is a human. In another embodiment, the organism is a companion animal. In still another embodiment, the companion animal is a cat or a dog. The protein kinase related disorder may be selected from the group consisting of a receptor tyrosine kinase related disorder, a non-receptor protein tyrosine kinase related disorder, and a serine/threonine protein kinase related disorder. The protein kinase related disorder may be selected from the group consisting of an EGFR related disorder, a PDGFR related disorder, an IGFR related disorder, a c-kit related disorder, and a FLK related disorder. Such disorders include by way of example and not limitation, leukemia, brain cancer, non-small cell lung cancer, squamous cell carcinoma, astrocytoma, Kaposi's sarcoma, glioblastoma, lung cancer, bladder cancer, head cancer, neck

cancer, melanoma, ovarian cancer, prostate cancer, breast cancer, small cell lung cancer, glioma, mastocytosis, mast cell tumor, colorectal cancer, genitourinary cancer, gastrointestinal cancer, diabetes, an autoimmune disorder, a hyperproliferation disorder, restenosis, fibrosis, psoriasis, von Heppel-Lindau disease, osteoarthritis, 5 rheumatoid arthritis, angiogenesis, an inflammatory disorder, an immunological disorder, and a cardiovascular disorder.

A fifth aspect of the invention is a method of preparing phosphate salt crystals of base 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide which comprises 10 introducing a stoichiometric amount of phosphoric acid to the base in a solution comprising a solvent or a mixture of solvents, forcing the phosphate salt in solution to crystallize, separating the phosphate salt crystals from the solvent solution, and drying the crystals. The phosphoric acid may be introduced in an amount which is 40% molar excess to the base. The solvent may comprise isopropanol. The step of 15 separating the crystals from the solvent solution may comprise adding acetonitrile to the solution and rotovapping the solution. The step of separating the crystals from the solvent solution may also comprise filtration.

A sixth aspect of the invention is a method of preparing citrate salt crystals of base 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide which comprises 20 introducing a stoichiometric amount of citric acid to the base in a solution comprising a solvent or a mixture of solvents, forcing the citrate salt in solution to crystallize, separating the citrate salt crystals from the solvent solution, and drying the crystals. The citric acid may also be introduced in an amount of about 40% molar excess to the 25 base. The solvent may comprise methanol. The step of separating the crystals from the solvent solution may comprise adding acetonitrile to the solution and rotovapping the solution. The step of separating the crystals from the solvent solution may comprise filtration.

In a seventh aspect, the invention provides the polymorphs Forms I-X (as 30 described herein) of the phosphate salt of Compound I. In one embodiment, Form I is provided.

An eighth aspect of the invention is a pharmaceutical composition comprising the Form I polymorph of Compound I phosphate and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

A ninth aspect of the invention is a method for the modulation of the catalytic activity of protein kinases comprising contacting said protein kinase with the Form I polymorph of Compound I phosphate.

A tenth aspect of the invention is a method of preventing or treating a protein kinase related disorder in an organism comprising administering to said organism a therapeutically effective amount of the Form I polymorph of Compound I phosphate. In one embodiment, the organism is a human or companion animal. In another embodiment, the companion animal is a cat or a dog. Such disorders include by way of example and not limitation, mast cell tumor and mastocytosis.

An eleventh aspect of the invention is a method of preparing polymorphs of Compound I phosphate, which comprises introducing the phosphate salt to a solution comprising a solvent or a mixture of solvents, optionally, adding a bridging solvent to the solution, and separating the polymorph crystals from the solvent solution. The solution may comprise water plus acetonitrile. The solution may comprise methanol. The bridging solvent may be methanol.

A twelfth aspect of the invention is the use of the phosphate or citrate salts of Compound I or the Form I polymorph of the phosphate salt in the preparation of a medicament which is useful in the treatment of a disease mediated by abnormal PK activity.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Moisture sorption data for salts of Compound I.

Figure 2. Powder X-ray Diffraction patterns for Compound I citrate and Compound I phosphate.

Figure 3. Powder X-ray Diffraction patterns of the ten unique solids obtained from the polymorph screening study (See Example 5). Form I through Form X as designated in Tables 5 and 6 are presented.

Figure 4. TGA curves of solids from CH₂Cl₂ (Form VI, immediately after precipitation), Hexane (Form VII, after standing overnight), and acetonitrile (Form VIII, after standing 3 days).

Figure 5. Results of agarose gel electrophoresis of PCR products from MCTs evaluated in Example 7. Lanes 1–5 correspond to patients 1–5 in Table 8; Lanes 6–14 correspond to patients 6–14 in Table 8. Controls consisted of PCR products generated from the C2 canine mast cell line containing a 48-bp ITD (Lane 15) and from normal canine cerebellum (wild type; Lane 16).

Figure 6. Reductions in MCT phosphorylated KIT and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 after a single dose of Compound I phosphate

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions. Unless otherwise stated the following terms used in the specification and
5 claims have the meanings discussed below:

The term "C" when used in reference to temperature means centigrade or Celsius.

The term "catalytic activity" refers to the rate of phosphorylation of tyrosine under the influence, direct or indirect, of RTKs and/or CTKs or the phosphorylation of serine
10 and threonine under the influence, direct or indirect, of STKs.

The term "companion animal" refers to domesticated animals offering companionship to humans, and includes, but is not limited to, cats and dogs.

The term "contacting" refers to bringing a compound of the present invention and a target PK together in such a manner that the compound can affect the catalytic
15 activity of the PK, either directly, i.e., by interacting with the kinase itself, or indirectly, i.e., by interacting with another molecule on which the catalytic activity of the kinase is dependent.

The term "IC₅₀" means the concentration of a test compound which achieves a half-maximal inhibition of the PK activity.

20 The term "modulation" or "modulating" refers to the alteration of the catalytic activity of RTKs, CTKs, and STKs. In particular, modulating refers to the activation or inhibition of the catalytic activity of RTKs, CTKs, and STKs, preferably the activation of the catalytic activity of RTKs, CTKs, and STKs, depending on the concentration of the compound or salt to which the RTK, CTK, or STK is exposed or,
25 more preferably, the inhibition of the catalytic activity of RTKs, CTKs, and STKs.

The term "PK" refers to receptor protein tyrosine kinase (RTKs), non-receptor or "cellular" tyrosine kinase (CTKs) and serine-threonine kinases (STKs).

The term "polymorph" refers to a solid phase of a substance, which occurs in several distinct forms due to different arrangements and/or confirmations of the
30 molecules in crystal lattice. Polymorphs typically have different chemical and physical properties.

The term "pharmaceutically acceptable excipient" refers to any substance other than a compound of the invention, added to a pharmaceutical composition.

The term "pharmaceutical composition" refers to a mixture of one or more of the salts of the present invention or the polymorphs of such salts, as described herein, with other chemical components, such as physiologically/pharmaceutically acceptable carriers and excipients. The purpose of a pharmaceutical composition is to facilitate administration of a compound to an organism.

The term "physiologically/pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier or diluent that does not cause significant irritation to an organism and does not abrogate the biological activity and properties of the administered compound.

The term "polymorph" may also be defined as different unsolvated crystal forms of a compound. The term also includes solvates (i.e., forms containing solvent, or water), amorphous forms (i.e., noncrystalline forms), and desolvated solvates (i.e., forms which can only be made by removing the solvent from a solvate).

The term 'solvate' is used to describe a molecular complex comprising a compound of the invention and one or more pharmaceutically acceptable solvent molecules, for example, ethanol. The term 'hydrate' is employed when said solvent is water.

The term "substantially free" in relation to the amount of a certain polymorph in a sample means that other polymorphs are present in an amount less than about 15 weight percent. In another embodiment, "substantially free" means less than about 10 weight percent. In another embodiment, "substantially free" means less than about 5 weight percent. In still another embodiment, "substantially free" means less than about 1 weight percent. Someone with ordinary skill in the art would understand that the phrase "in an amount less than about 15 weight percent" means that the polymorph of interest is present in an amount of more than about 85 weight percent. Likewise, the phrase "less than about 10 weight percent" means that the polymorph of interest is present in an amount of more than about 90 weight percent, and so on.

The term "therapeutically effective amount" refers to that amount of the compound being administered which will prevent, alleviate, or ameliorate one or more of the symptoms of the disorder being treated, or prolong the survival of the subject being treated. In reference to the treatment of cancer, a therapeutically effective amount refers to that amount which has the effect of:

- (1) reducing the size of the tumor;
- (2) inhibiting (that is, slowing to some extent, or stopping) tumor metastasis;

- (3) inhibiting (that is, slowing to some extent, or stopping) tumor growth, and/or,
- (4) relieving to some extent (or eliminating) one or more symptoms associated with the cancer.

5 Different salt forms of Compound I may be synthesized to obtain a form with better physical properties. The base compound may be in solution. The solution is generally a solvent. In one embodiment, the solution is an alcohol. In another embodiment, the solvent may be isopropanol, methanol, acetonitrile, or water plus acetonitrile. The solution may also comprise a mixture of solvents.

10 The salts may be crystallized using a stoichiometric addition/crystallization technique. A stoichiometric amount of the counterion is introduced to the base in solution. In one embodiment, the amount of counterion is in a 1:1 ratio to the base. In another embodiment, the amount of counterion is from 0% to about 60% molar excess to the base. In another embodiment, the amount of counterion is from about 10% to
15 about 50% molar excess to the base. In yet another embodiment, the amount of counterion is about 40% molar excess to the base. The counterions may include hydrochloride, fumarate, citrate, phosphate, and ascorbate ions. In one embodiment, the counterion is the phosphate ion. In another embodiment, the counterion is the citrate ion.

20 The salt in solution is then forced to crystallize by a variety of common techniques including cooling, evaporation, drowning, etc., known to one skilled in the art. Excess solvents may be removed from the samples by methods known to one skilled in the art. In one embodiment, the solvents are removed from the solution by adding acetonitrile (ACN) and rotovapping the solution. The solution may be
25 rotovapped from about 40°C to about 60°C. In another embodiment, additional solvents may be added to the solution (eg, isopropanol and methyl ethyl ketone) prior to rotovapping. The crystallizations may be conducted in the dark to prevent light-induced isomerization. In one embodiment, the crystals are removed by filtration. In another embodiment, filtration may be performed at ambient laboratory atmosphere.

30 By these methods, the ascorbate, citrate, fumarate, hydrochloride, and phosphate salts of Compound I were crystallized. Specific examples of crystallization methods are provided below. HPLC analysis may be used to determine purity of the resultant sample. The physical properties of the compounds may be determined by tests known to one skilled in the art, including melting point determination, powder

X-ray diffraction, and dynamic moisture sorption gravimetry. Parameters for these tests are described below.

These five salt forms are described herein (See Table 1). These salts of Compound I are often hygroscopic. For example, as can be seen in Table 1, at 80 percent humidity, the hydrochloride salt was about 20 percent water, the fumarate salt was about 9 percent water, and the ascorbate salt was about 6.5 percent water. This characteristic can make use of the salt in a pharmaceutical formulation difficult and can shorten the shelf-life of a formulation. However, two salts, the phosphate and citrate salts, were unexpectedly found to have low moisture uptake, having about 1 percent and about 3.8 percent water at 80 percent relative humidity, respectively.

Based on characterization of these salts, the 1:1 phosphate salt, Compound I phosphate, was identified as a salt form with highly desirable characteristics, including good crystallinity, low moisture uptake, ease of crystallization, good purity, and lack of hydrate. Ten polymorphs of Compound I phosphate, herein named Forms I through X, are also described. The citrate salt also demonstrated desirable characteristics, such as low moisture uptake and good crystallinity.

Polymorphs of the compounds of the present invention are desirable because a particular polymorph of a compound may have better physical and chemical properties than other polymorphic forms of the same compound. For example, one polymorph may have increased solubility in certain solvents. Such added solubility may facilitate formulation or administration of the compounds of the present invention. Different polymorphs may also have different mechanical properties (e.g., different compressibility, compactibility, tableability), which may influence tableting performance of the drug, and thus influence formulation of the drug. A particular polymorph may also exhibit different dissolution rate in the same solvent, relative to another polymorph. Different polymorphs may also have different physical (solid-state conversion from metastable polymorph to a more stable polymorph) and chemical (reactivity) stability. An embodiment of the present invention contemplates the Form I polymorph of Compound I phosphate, as described herein.

In embodiments of the present invention, pure, single polymorphs as well as mixtures comprising two or more different polymorphs are contemplated. A pure, single polymorph may be substantially free from other polymorphs.

Some embodiments of the present invention contemplate pharmaceutical compositions comprising one or more of the salts of Compound I or the polymorphs

of such salts, as described herein, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

Polymorphs were generated from concentrated solutions of Compound I phosphate. The concentrated solutions may be in a range of 60 to 100 mg of
5 Compound I phosphate per mL of solution. In one embodiment, about 70 mg of Compound I may be dissolved in 1 mL of phosphoric acid.

The polymorph crystals may be precipitated from a solvent by various methods including, for example, slow evaporation, cooling a supersaturated solution, precipitation from anti-solvents, etc., which are known to one skilled in the art. In one
10 embodiment, the polymorph crystals are generated by adding the solution to an anti-solvent. The anti-solvent may be water plus acetonitrile (ANC), ethanol, methanol, acetone, acetonitrile, THF, ethyl acetate, hexane, methylene chloride (CH_2Cl_2), isopropyl alcohol (IPA), methyl ethyl ketone (MEK), and dioxane. In one embodiment, an additional solvent (eg, methanol) may be added. In another
15 embodiment, the samples are allowed to stand overnight prior to removing the crystals. In yet another embodiment, the samples are allowed to stand for three days prior to removing the crystals.

The crystals may be characterized using standard methods known to one skilled in the art, including PXRD dynamic moisture sorption gravimetry, differential
20 scanning calorimetry, thermal gravimetric analysis, and optical microscopy. These techniques are described below.

Pharmaceutical compositions suitable for the delivery of compounds of the present invention and methods for their preparation will be readily apparent to those skilled in the art. Such compositions and methods for their preparation may be found,
25 for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995).

The choice of a pharmaceutically acceptable excipient will to a large extent depend on factors such as the particular mode of administration, the effect of the excipient on solubility and stability, and the nature of the dosage form. Examples of
30 excipients include, without limitation, calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars and types of starch, cellulose derivatives, gelatin, vegetable oils, and polyethylene glycols.

Carriers and excipients for formulation of pharmaceutically acceptable compositions comprising Compound I are well known in the art and are disclosed, for

example, in U.S. Patent No. 6,573,293, which is incorporated herein in its entirety. Methods of administration for such are also known in the art and also described, for example, in U.S. Patent No. 6,573,293. Similar methods could also be used to formulate and administer pharmaceutically acceptable compositions of the salts of
5 Compound I, or the polymorphs of such salts, of this invention.

Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. For injection, the compounds of the present invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For transmucosal administration,
10 penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art. For parenteral administration, e.g., by bolus injection or continuous infusion, formulations may be presented in unit dosage forms, such as in ampoules or in multi-dose containers. The compositions may take such forms as suspensions, solutions, or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may
15 contain formulating materials such as suspending, stabilizing, or dispersing agents.

The compounds of the invention may be administered directly into the blood stream, into muscle, or into an internal organ. Suitable means for parenteral administration include intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intrathecal, intraventricular, intraurethral, intrasternal, intracranial, intramuscular, intrasynovial
20 and subcutaneous. Suitable devices for parenteral administration include needle (including microneedle) injectors, needle-free injectors and infusion techniques. Parenteral formulations are typically aqueous solutions which may contain excipients such as salts, carbohydrates and buffering agents (preferably adjusted to a pH of from 3 to 9), but, for some applications, they may be more suitably formulated as a sterile
25 non-aqueous solution or as a dried form to be used in conjunction with a suitable vehicle such as sterile, pyrogen-free water. Additionally, suspensions of the compounds of the present invention may be prepared in a lipophilic vehicle. Suitable lipophilic vehicles include fatty oils such as sesame oil, synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate and triglycerides, or materials such as liposomes.

30 The compounds of the invention may be administered orally. Oral administration may involve swallowing, so that the compound enters the gastrointestinal tract, and/or buccal, lingual, or sublingual administration by which the compound enters the blood stream directly from the mouth. For oral administration, the compounds can be formulated by combining the compounds of the present

invention with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art.

Formulations suitable for oral administration include solid, semi-solid and liquid systems such as tablets; soft or hard capsules containing multi- or nano-particulates, liquids, or powders; lozenges (including liquid-filled); chews; gels; fast dispersing dosage forms; films; ovules; sprays; and buccal/mucoadhesive patches.

The compounds of the invention may also be administered topically, (intra)dermally, or transdermally to the skin or mucosa. Typical formulations for this purpose include gels, hydrogels, lotions, solutions, creams, ointments, dusting powders, dressings, foams, films, skin patches, wafers, implants, sponges, fibres, bandages and microemulsions. Liposomes may also be used. Typical carriers include alcohol, water, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, glycerin, polyethylene glycol and propylene glycol. Penetration enhancers may be incorporated - see, for example, J Pharm Sci, 88 (10), 955-958, by Finmin and Morgan (October 1999). Other means of topical administration include delivery by electroporation, iontophoresis, phonophoresis, sonophoresis and microneedle or needle-free (e.g. Powderject™, Bioject™, etc.) injection

The compounds of the present invention may be formulated for rectal administration, such as suppositories or retention enemas using, for example, conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

The compounds of the present invention may also exist in unsolvated and solvated forms.

The embodiments of the present invention also contemplate a method for the modulation of the catalytic activity of a PK comprising contacting said PK with a one or more of the salts of Compound I or the polymorphs of such salts of the present invention. Such "contacting" can be accomplished "*in vitro*," i.e., in a test tube, a petri dish, or the like. In a test tube, contacting may involve only a compound and a PK of interest or it may involve whole cells. Cells may also be maintained or grown in cell culture dishes and contacted with a compound in that environment. In this context, the ability of a particular compound to affect a PK-related disorder, i.e., the IC₅₀ of the compound, defined below, can be determined before use of the compounds is attempted *in vivo* with more complex living organisms. For cells outside the organism, multiple methods exist, and are well-known to those skilled in the art, to get the PKs in contact with the compounds including, but not limited to, direct cell microinjection and numerous transmembrane carrier techniques.

Embodiments of the present invention contemplate a method for treating or preventing a protein kinase related disorder in an organism (e.g., a companion animal or a human) comprising administering a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising one or more of the salts of Compound I or the polymorphs of such salts of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient to the organism.

In an embodiment of the present invention, the protein kinase related disorder is selected from the group consisting of a receptor tyrosine kinase related disorder, a non-receptor tyrosine kinase related disorder, and a serine-threonine kinase related disorder. In another embodiment of the present invention, the protein kinase related disorder is selected from the group consisting of an EGFR related disorder, a PDGFR related disorder, an IGFR related disorder, and a FLK related disorder.

The receptor protein kinase whose catalytic activity is modulated by a compound of this invention is selected from the group consisting of EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R and FGFR-4R. The cellular tyrosine kinase whose catalytic activity is modulated by a compound of this invention is selected from the group consisting of Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr and Yrk. The serine-threonine protein kinase whose catalytic activity is modulated by a compound of this invention is selected from the group consisting of CDK2 and Raf.

In yet another embodiment of the present invention, the protein kinase related disorder is selected from the group consisting of squamous cell carcinoma, astrocytoma, Kaposi's sarcoma, glioblastoma, lung cancer, bladder cancer, head and neck cancer, melanoma, ovarian cancer, prostate cancer, breast cancer, small cell lung cancer, glioma, colorectal cancer, genitourinary cancer, gastrointestinal cancer, mastocytosis, and mast cell tumors. In an embodiment of the present invention, the protein kinase related disorder is selected from the group consisting of diabetes, an autoimmune disorder, a hyperproliferation disorder, restenosis, fibrosis, psoriasis, von Heppel-Lindau disease, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, angiogenesis, an inflammatory disorder, an immunological disorder, and a cardiovascular disorder.

Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an amount sufficient to

achieve the intended purpose, e.g., the modulation of PK activity or the treatment or prevention of a PK-related disorder.

Determination of a therapeutically effective amount is well within the capability of those skilled in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein. For any compound used in the methods of the invention, the therapeutically effective amount or dose can be estimated initially from cell culture assays. Then, the dosage can be formulated for use in animal models so as to achieve a circulating concentration range that includes the IC_{50} as determined in cell culture. Such information can then be used to more accurately determine useful doses in humans or companion animals.

In practice, the amount of the compound to be administered ranges from about 0.001 to about 100 mg per kg of body weight, such total dose being given at one time or in divided doses. The amount of a composition administered will, of course, be dependent on the subject being treated, the severity of the affliction, the manner of administration, the judgment of the prescribing physician or veterinarian, etc. In cases of local administration or selective uptake, the effective local concentration of the drug may not be related to plasma concentration and other procedures known in the art may be employed to determine the correct dosage amount and interval.

Embodiments of the present invention also contemplate a method of treating cancer in companion animals comprising administering a pharmaceutical composition comprising one or more of the salts of Compound I or the polymorphs of such salts of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

Additionally, it is contemplated that the salts of Compound I or the polymorphs of such salts, as described herein, would be metabolized by enzymes in the body of an organism such as a companion animal or a human being to generate a metabolite that can modulate the activity of the protein kinases. Such metabolites are within the scope of the present invention.

Compounds of the invention may be administered alone or in combination with one or more other compounds of the invention or in combination with one or more other drugs (or as any combination thereof). It is also contemplated that the salts of Compound I or the polymorphs of such salts, as described herein, might be combined with other chemotherapeutic agents for treatment of the diseases and disorders discussed above. For example, a compound of the present invention may be combined with fluorouracil alone or in further combination with leukovorin or other

alkylating agents. A compound of the present invention may be used in combination with other antimetabolite chemotherapeutic agents such as, without limitation, folic acid analogs or the purine analogs. A compound may also be used in combination with natural product based chemotherapeutic agents, antibiotic chemotherapeutic agents, enzymatic chemotherapeutic agents, platinum coordination complexes, and hormone and hormone antagonist. It is also contemplated that a compound of the present invention could be used in combination with mitoxantrone or paclitaxel for the treatment of solid tumor cancers or leukemias.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, practice the present invention to its fullest extent. The following detailed examples describe how to prepare the various compounds and/or perform the various processes of the invention and are to be construed as merely illustrative, and not limitations of the preceding disclosure in any way whatsoever. Those skilled in the art will promptly recognize appropriate variations from the procedures both as to reactants and as to reaction conditions and techniques.

EXAMPLES

Example 1. Synthesis of Compound I, ie. 5-(5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide

As described in US patent 6,574,293 (example 129) 5-Fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one was condensed with 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide to give Compound I.

Scale-Up Procedure. 5-Formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (61 g), 5-fluoro-1,3-dihydro-indol-2-one (79 g), ethanol (300 mL) and pyrrolidine (32 mL) were refluxed for 4.5 hours. Acetic acid (24 mL) was added to the mixture and refluxing was continued for 30 minutes. The mixture was cooled to room temperature and the solids collected by vacuum filtration and washed twice with ethanol. The solids were stirred for 130 minutes in 40% acetone in water (400 mL) containing 12 N hydrochloric acid (6.5mL). The solids were collected by vacuum filtration and washed twice with 40% acetone in water. The solids were dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (86 g, 79% yield) as an orange solid.

5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (100 g) and dimethylformamide (500mL) were stirred and

benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (221 g),
1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (45.6 g) and triethylamine (93 mL) were added. The
mixture was stirred for 2 hours at ambient temperature. The solid product was
collected by vacuum filtration and washed with ethanol. The solids were slurry-
5 washed by stirring in ethanol (500 mL) for one hour at 64° C. and cooled to room
temperature. The solids were collected by vacuum filtration, washed with ethanol, and
dried under vacuum to give 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-
ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-
amide (101.5 g, 77% yield).

10 Example 2. Synthesis of Salts of Compound I.

Example 2A. Compound I Phosphate.

2.67 mmoles of Compound I was added to a flask with 40 mL 0.092 M
phosphoric acid (about a 40% molar excess assuming a 1:1 salt) and 40 mL
isopropanol. Then, acetonitrile was continuously added to the aqueous solution in 30
15 mL aliquots, as the solution was rotovapped at 60°C to remove the water. In all, 120
mL of acetonitrile was used to remove the water from the solution. The crystals were
filtered and air-dried. Crystals were free flowing and orange; 1.09 grams were
collected for an 83% yield.

Example 2B. Compound I Citrate.

20 2.64 mmoles of Compound I was added to a flask with 34 mL 0.1M citric acid
(3.4 mmoles) and 35 mL methanol. This solution was rotovapped at 50°C. Reducing
the volume of this solution produced crystals of poor crystallinity, so 20 mL
isopropanol and 10 mL of methyl ethyl ketone were added to dissolve the solid. This
mixture was rotovapped at 60°C and produced orange crystals. The crystals were
25 filtered and air-dried. The yield for this process was about 60%, and could have been
improved by reducing the solvent volume further before filtration.

Example 3. Physical Properties of Salts of Compound I.

Methods. Tests to determine the physical properties of the salts of Compound
I included melting point determination, HPLC purity, powder X-ray diffraction, and
30 dynamic moisture sorption gravimetry.

Powder X-ray Diffraction (PXRD). Powder XRD was performed using a
Scintag X2 Advanced Diffraction System (lab 259-1088, controlled by Scintag
DMS/NT 1.30a and Microsoft Windows NT 4.0 software. The system uses a Copper
X-ray source (45 kV and 40 mA) to provide CuK α_1 emission of 1.5406Å and a solid-

state Peltier cooled detector. The beam aperture was controlled using tube divergence and anti-scatter slits of 2 and 4 mm and detector anti-scatter and receiving slits of 0.5 and 0.2 mm width. Data were collected from 2 to 35° two-theta using a step scan of 0.03°/step with a counting time of one second per step. Scintag round, top loading stainless steel sample holders with 9 mm diameter inserts were utilized for the experiments. Powders were packed into the holder and were gently pressed by a glass slide to ensure coplanarity between the sample surface and the surface of holder.

Dynamic Moisture Sorption Gravimetry (DMSG). DMSG isotherm was collected on a temperature controlled atmospheric microbalance. Approximately 10 mg samples were placed in the sample pan of the balance. The humidity was sequentially varied from room relative humidity (RH) to 0% RH and was then increased to 90% RH followed by a decrease of RH to 0% again in 3% RH steps. The mass was then measured every two minutes. The RH was stepped to the next target value when change of the sample mass was less than 0.5 µg in 10 min. The Visual Basic program dmsgscn2.exe was used to control the data collection and export the information to an Excel spreadsheet.

Results. Table 1 shows a summary of data for the ascorbate, citrate, fumarate, hydrochloride, and phosphate salts of Compound I. HPLC analysis suggested that the salts were of relatively high purity, and no significant change in the purity was induced through the salt formation process.

Table 1. Summary of salts synthesized for Compound I

Counterion	Salt Crystallized	Melting point (°C)	% water at 80% RH	HPLC purity*	% Isomer*
none (free base)	NA	257	~ 1%	97.8	0.63
hydrochloride	Yes	96	~ 20%	97.7	2.29
fumarate	Yes	NA	~ 9%	97.3	1.96
citrate	Yes	181	~ 3.8%	98.2	1.38
phosphate	Yes	288	~ 1%		
ascorbate	Yes	245	~ 6.5%		

* area percent under the peaks in the HPLC

The hydrochloride, fumarate, and ascorbate salts were very hygroscopic (see Figure 1). The other two salts (citrate and phosphate) had lower moisture sorption profiles, absorbing less than 3 % water at 70% relative humidity.

The powder X-ray patterns indicated that the phosphate and citrate salts were of relatively high crystallinity. (see Tables 2 and 3; and Figure 2).

Table 2
PXRD Peaks of Compound I Phosphate

Two-Theta Angle* (degree)	Relative Intensity** (arbitrary)
11.1	23.5
11.5	24.0
11.6	19.9
12.0	8.9
13.0	22.0
14.0	25.9
14.5	7.0
15.4	15.0
16.5	7.5
17.2	27.7
17.8	9.5
18.3	16.6
19.4	11.6
19.6	11.2
19.8	9.8
20.8	58.2
21.6	11.8
22.0	9.5
22.7	9.2
22.9	12.4
23.2	12.8
23.4	10.3
24.4	48.8
25.8	30.4
27.0	100.0
29.2	7.4
29.2	7.4
33.5	5.1

*: $\pm 0.1^\circ$

- 5 **. The relative intensity for each peak is determined by normalizing its intensity to that of the strongest peak at 27.0° angle as 100

Table 3
PXRD Peaks of Compound I Citrate

26

Two-Theta Angle* (degree)	Relative Intensity** (arbitrary)
3.2	20.4
7.3	17.7
9.2	14.4
9.5	39.1
10.8	9.5
12.7	23.5
13.2	19.6
14.3	23.5
14.8	16.7
15.9	11.3
17.2	8.3
17.8	11.9
18.2	19.8
18.3	19.5
19.6	6.8
20.9	11.1
21.6	8.9
21.7	10.5
21.8	8.9
23.2	13.2
24.2	20.3
24.9	15.9
25.5	100.0
26.4	20.9
26.8	26.5
27.1	10.8
32.0	6.3
34.4	8.1

*: $\pm 0.1^\circ$

- 5 **: The relative intensity for each peak is determined by normalizing its intensity to that of the strongest peak at 25.5° angle as 100

Example 4. Preparation and Characterization of Compound I Phosphate.

Example 4A. Preparation of Compound I Phosphate.

- Compound I free base was used to prepare the phosphate salt. A sample (lot
10 number 35282-CS-51) of Compound I phosphate was prepared as described above. 4 mL of 0.977 M phosphoric acid was added to 1.095 g of free base in a flask immediately followed by adding 4 mL of acetonitrile. A suspension was obtained.

The suspension was heated slightly on a hot-plate. Adding 40 mL of water and heating while stirring for about one hour did not completely dissolve the solid. The solid was filtered and washed with 10 mL of acetonitrile. PXRD showed it was the phosphate salt of Compound I.)

5 Example 4B. Characterization of Compound I Phosphate.

Lot 35282-CS-51 was named polymorph Form I of Compound I Phosphate. It has high crystallinity, good flowability, and large crystal size. Both the absence of the melting event at the melting temperature of Compound I free base (free base polymorph Form A, 256°C; free base polymorph Form B, 259°C) and the presence of
10 high melting points (281 – 297°C) of the solids suggested that the crystals of Lot 35282-CS-51 are a different salt form and not Compound I free base. The purity of the lot was 99.6% by HPLC.

Example 4C. Estimation of Solubility of Compound I Phosphate.

Samples of 1 - 2 mg of Compound I phosphate (lot 35282-CS-51) were
15 transferred to 10 mL glass vials (tared) and were weighed (accurate to 0.1 mg). Solvents were added to the vials (one solvent to each vial) in a step-wise fashion, with 0.5mL of solvent added at each step. Solvents used were buffer (pH = 2), buffer (pH = 5), water, methanol, tetrahydrofuran (THF), acetonitrile, and acetone. After each addition, the vial was capped and shaken. The dissolution of solid was visually
20 observed. If no obvious dissolution was observed, more solvent was added immediately. If dissolution was apparent, the vial was left on the bench for at least 30 minutes before the next addition of solvent. This step was repeated until no crystals were visible against a black and a white background. The solubility was then bracketed by dividing the weight of the compound by the final volume and the
25 volume before the last addition. If a solid remained after the addition of 10 mL of solvent, the solubility was expressed as less than the weight divided by the final volume. If the solid was completely dissolved after the first addition of solvent, the solubility was expressed as greater than the weight divided by the solvent volume. All experiments were conducted at room temperature.

30 The estimated solubilities of Compound I phosphate in various solvents are presented in Table 4 along with solubilities of the free base, expressed as mg/mL. The solubility of Compound I phosphate is lower than that of Compound I free base in the same solvent, except in water (at various pH levels). The solubility of Compound I phosphate depends on the pH value of a solution, and becomes considerably higher (>

3 mg/mL) at pH 2 or lower. The melting point of Compound I phosphate (lot 35282-CS-51) is about 281-297 °C, which is substantially higher than the melting point of Compound I free base (free base polymorph Form A, 256 °C; free base polymorph Form B, 260 °C). One important result is that the wettability of Compound I

- 5 phosphate with water is much better than that of Compound I free base.

Table 4. Estimated solubility of Compound I free base and Compound I phosphate in various solvents at 23 °C.

	Solvent	Solubility of Compound I free base (polymorph Form A) (mg/mL)	Solubility of Compound I phosphate (mg/mL) ^d
1	buffer (pH = 2) ^a	3.11	5.9 – 7.4
2	buffer (pH = 5) ^b	0.005	
3	water	NA ^c	~0.29 ^e (some particles stuck on the vial wall and did not dissolve)
4	methanol	0.21 – 0.31	~0.14
5	THF	0.32 - 0.4	<<< 0.19
6	Acetonitrile	<< 0.08	<<< 0.13
7	Acetone	<< 0.16	<<< 0.2

^a pH = 2 buffer is made of HCl and KCl

- 10 ^b pH = 5 buffer is made of potassium acid phthalate and sodium hydroxide.

^c Not available but expected < 0.005 mg/mL.

^d 1 g of Compound I phosphate is equivalent to 0.802 g of Compound I free base.

^e The final solution pH value is 4.91.

15 **Example 5. Generation of Compound I Phosphate Polymorphs.**

- The low solubilities of Compound I phosphate seen in Example 4C indicated that solutions of highly concentrated (60 – 100 mg/mL, dark orange-red) Compound I phosphate would be beneficial to precipitate polymorphs of Compound I phosphate from various solvents. Such concentrated solutions were prepared by dissolving Compound I free base in about 1 M phosphoric acid. For example, about 70 mg of Compound I free base could be dissolved in 1mL of 1M phosphoric acid. However, the amount of Compound I free base and phosphoric acid used depended on the desired concentration and batch size of the solution. In the example in which the precipitate was vacuum filtered immediately after precipitation, about 1 mL of the desired solution was then dripped into about 10 mL of ten anti-solvents to precipitate the salt crystals out. These solvents were water plus acetonitrile (ANC), ethanol, methanol, acetone, acetonitrile, THF, ethyl acetate, hexane, methylene chloride
- 20
- 25

(CH₂Cl₂), and isopropyl alcohol (IPA). In the example in which the precipitate was vacuum filtered after standing overnight or for three days, the additional solvents of methyl ethyl ketone (MEK) and dioxane were used. Some organic solvents, e.g., ethyl acetate, hexane, CH₂Cl₂, are not miscible with water and two layers of solvents were
5 observed. Only a little precipitation was seen at the interface even minutes after addition. In those cases, about 1 mL of methanol was added as a bridging solvent, to increase the miscibility between the two layers. Methanol appeared to work well to increase the miscibility because colorless organic layer became yellow as soon as methanol was added. The vial was then shaken vigorously by hand for about one
10 minute. The solids precipitated from organic solvents were vacuum filtered both immediately after precipitation (within 20 min) and after standing overnight or for three days in order to isolate both metastable and stable polymorphs. The powder was then analyzed. The different solids were numbered in the order of discovery.

Example 6. Characterization of the Polymorphs of Compound I Phosphate.

15 Example 6A. Characterization Methods.

All powders obtained from the above polymorph screening procedures were analyzed by PXRD, as described in Example 3 above. When a new PXRD pattern was observed, complementary techniques were also used to characterize the solids, including dynamic moisture sorption gravimetry (also described in Example 3),
20 differential scanning calorimetry, thermal gravimetric analysis (when necessary), and optical microscopy.

Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC data were obtained using a DSC calorimeter (TA Instruments 2920). Powder (1-5 mg) was packed in an aluminum DSC pan. An aluminum lid was placed on top of the pan and was crimped.
25 The crimped pan was placed in the sample cell along with an empty pan as a reference. Temperatures were increased to 300 or 350°C from 30°C at a rate of 10°C/min unless otherwise specified.

Thermogravimetry (TGA). TGA experiments were performed using a high resolution analyzer (TA Instruments model 2950). The TA Instruments Thermal
30 Solutions™ for NT (version 1.3L) was used for data collection, and the Universal Analysis™ for NT (version 2.4F) was used for data analysis. Samples (5–10 mg) were placed onto an aluminum pan which was further placed on a platinum weighing pan before being heated. The weights of the aluminum and platinum pans were tared

prior to loading the samples. The temperature was increased from 30 °C to 300 °C linearly at a rate of 10 °C/min. Dry nitrogen purge was used.

Polarized Light Microscopy. Microscopy was conducted on an Olympus BHSP polarized light microscope. Powder was suspended in silicone oil and dispersed between a microscopy slide and a cover slip. Prior to observation, the cover slip was gently rubbed against the slide to render good dispersion of the particles.

Example 6B, Characterization Immediately After Precipitation

The results are summarized in Table 5. Precipitation took place as soon as the acidic solution was mixed with the anti-solvents. At first, the precipitates were loose flocs. The colors were yellow or light-orange in general. The resulting solid was sticky. The microscopic observation of these solids indicated that they were constituted of very small crystallites with good birefringence under polarized light. At least six different PXRD patterns were observed on solids obtained from nine solvent systems. (See Figure 3) The amide side-chain on this molecule is flexible and it undertakes different conformations in free base Form B and in its hydrochloride salt. Therefore, the molecule in the different solid forms may be conformational polymorphs. The PXRD patterns of solids precipitated from ethyl acetate, hexane, and IPA appeared the same. However, a detailed comparison with other PXRD patterns was difficult because of the low diffraction signals of solids from these three solvents. Consequently, they were not assigned as a new form. The precipitate from methanol is the same as the reference lot 35282-CS-51 (assigned as Form I). TGA data of all precipitates indicated residue solvent at a level of 1.7 ~ 4.7%. Of these solids, the one from CH₂Cl₂ appeared to be a solid with retained solvent in crystals. The TGA curve showed an abrupt decrease in sample weight at a temperature about 125 °C (see Figure 4). This event is recorded as an endotherm at about the same temperature by DSC. In addition, this powder was constituted of crystals of well-defined morphology and was free-flowing, a very different property from other lots of precipitates. The powder exhibited medium crystallinity by PXRD but good crystallinity when observed by polarized-light microscope. Other lots were constituted of very fine crystallites. On DSC curve of these powders, a broad and shallow endotherm was seen as soon as the sample was loaded to the sample cell. This observation is reflected by TGA as a gradual weight loss from the beginning of heating on TGA. Therefore, for these lots, the residual solvents were probably surface adsorbed solvents and were not solvents in the crystal lattice.

Table 5. Physical characterization of solids isolated immediately after precipitation

Name Assigned to PXRD pattern	Organic solvent	PXRD crystallinity	Microscopic observation	TGA wt% loss ^a	Thermal events by DSC (°C) ^b	Color of the solid	Free flowing? (Y=yes; N=no)
Form I	Water + ACN	High	Irregular	0.3	296	Orange	Y
Form II	EtOH	Poor	Aggregate ^c	2.5	81 ^c , 226, 293	Yellow	N (sticky)
Form I	MeOH	High	Irregular	1.7	298	Orange-red	Y
Form III	Acetone	Medium	Aggregate ^c	2.5	88 ^c , 155, 222, 228, 286	Yellow	N (sticky)
Form IV	Acetonitrile (ACN)	High	Aggregate ^c	2.9	97 ^c , 142, 156, 172, 227, 230, 281	Yellow	N (sticky)
Form V	THF	High	Aggregate ^c	2.5	82 ^c , 161, 175, 227, 292	Yellow	N (sticky)
ND ^d	Ethyl acetate	Poor	Fine particles	4.7	98 ^c , 196, 222	Light-orange	N (sticky)
ND ^d	Hexane	Poor	Aggregate ^c			Light-Orange	N (sticky)
Form VI ^e	CH ₂ Cl ₂	Medium	Plate + equant + fine	3.3	123 ^d , 164, 228, 296	Orange-red	Y
ND ^d	IPA	Poor	Aggregate ^c	1.9	76 ^c , 222, 229, 296	yellow	N (sticky)

^a Weight loss up to 160 °C. ^b For clarity, the temperatures listed in the table are peak temperatures only. ^c Peak temperatures of a broad endothermal event from the starting temperature of a DSC run. These events are also reflected by gradual weight loss on TGA. This type of heat event is typical of loss of surface adsorbed solvent. ^d Peak temperatures of a relatively sharp endothermal event on DSC. This event is also recorded by TGA as a sudden loss of weight at the corresponding peak temperature. This type of heat event is typical of desolvation of a solvate. ^e The aggregates are constituted of very fine particles. ^f ND means that no definite form can be assigned because of the low signal of the diffraction peaks of corresponding PXRD patterns obscured a detailed comparison with PXRD patterns of other forms. ^g Form VI, is a solvent containing solid.

29

Example 6C. Precipitation After Standing up to Three Days in Solvent.

These results are summarized in Table 6. After a standing time of up to three days in the solvent, a new non-fluffy orange-red solid phase appeared. The fluffy precipitates obtained from all organic solvents, except the precipitate from methanol, underwent transformation. Apparently, the solids precipitated immediately after precipitation were metastable in these cases in that they converted to a more stable solid form (Form I) over time. This conversion appeared to be completed in a couple of hours in most of the solvent systems. However, they were allowed to stand for a much longer period of time to ensure the completion of the process in order to avoid reaping a mixture of two solid forms. The TGA curve showed abrupt weight loss at about 124° C and 153° C for the solids obtained from hexane and acetonitrile respectively, coupled by an endotherm at a similar temperature on DSC. Therefore, they also appeared to contain restrained solvent in crystal lattice. The stoichiometries of the retained solvents are about 0.6 for acetonitrile and about 0.14 for hexane. Needle-shaped crystals were grown from acetonitrile after standing for three days. The PXRD patterns of the acetonitrile-retaining solid were unique while the PXRD pattern of the hexane solvate is similar to the CH₂Cl₂-retaining solid identified earlier (Figure 3). Both solvent-retaining solids (hexane and acetonitrile) lost weight on a TGA pan. Unique PXRD patterns of both solids were observed after the corresponding retained solvent had been removed by heating (Table 7, Figure 3), indicating that removal of solvent molecules from the solids caused structural changes of the solvate crystals (therefore, the solvent molecules are in crystal lattice not just on crystal surfaces). However, the PXRD pattern of acetonitrile desolvate was low in signal intensity. DSC profile of the acetonitrile desolvate exhibited two additional heat events at 74° C and 174° C, when compared with the DSC profile of the acetonitrile solvate, while the desolvation event at 153° C was absent. Cooling of the sample after desolvation may have changed the solid that undergoes an energetic change at 174° C.

When other organic solvents were used, the longer standing period of the precipitates yielded solids of the same PXRD pattern as that of Form I (Lot 35282-CS-51) although the morphology of the crystals was different (Table 6). The same PXRD pattern indicated that those solids have the same crystal lattice structure. The different morphology must be due to the solvent effects. It is apparent that Form I is the most

29

stable solid phase among all non-solvated polymorphs reported herein. Other solvent-free solid forms were metastable and converted to Form I quickly when in contact with solvent. The solid from CH_2Cl_2 appeared to flow more easily than the solid from hexane. The TGA, morphology, and the flowability indicated that they are two different solids.

Table 6. Physical characterization of solids isolated after varying standing periods after precipitation

Name Assigned to PXRD Pattern	Organic solvent (standing period)	PXRD crystallinity	Microscopic observation	wt % loss ^a	Thermal events by DSC (°C) ^b	Color of the solid	Free flowing? (Y=yes; N=no)
Form I	Water + ACN	High	irregular	0.3	296	Orange	Y
Form I	Ethyl acetate (overnight)	High	Tablets			Orange-red	Y
Form VII ^c	Hexane (overnight)	Medium	plates	2.4	124 ^c , 228, 295	Orange-red	N
Form I	IPA (overnight)	High	equant (25 um) + fine	0.4	297	Orange-red	Y
Form I	CH ₂ Cl ₂ (overnight)	High	equant (25 um) + fine	0.6	293	Orange-red	Y
Form I	EtOH (3 days)	High	Aggregate ^e			Orange-red ^d	Y
Form I	Acetone (3 days)	High	plates			Orange-red ^e	Y
Form VIII ^c	Acetonitrile (3 days)	Medium	needles	4.9	153 ^c , 229, 231, 239, 291	Orange-red ^e	N
Form I	THF (3 days)	High	Spear head	0.3	295	Light orange ^f	N
Form I	MeOH (overnight)	high				Orange-red	Y
Form I	MEK (overnight)	high	rods	0.6	297	orange	N
Form I	dioxane (overnight)	high	plates		295	orange	N

^a Weight loss up to 160 °C by TGA. ^b For clarity, the temperatures listed in the table are peak temperatures only. ^c Peak temperatures of a relatively sharp endothermal event on DSC. This event is also recorded by TGA as a sudden loss of weight at the corresponding peak temperature. ^d Conversion was complete in 5 hrs (from yellow to orange-red). ^e Conversion was not obvious in 5 hrs but was mostly completed in three days (yellow loose precipitate to orange-red well-formed needle-shaped crystals). ^f Conversion was complete in 5 hrs. The color change was not obvious (from yellow to light orange). ^g Form VII and VIII are solvent containing solids.

Table 7. Physical characterization of solids produced after desolvation.

Name Assigned to PXRD pattern	Method of crystal generation	PXRD crystallinity	Thermal events by DSC (°C)	Color of the solid
Form IX	Desolvation of ACN solvate	Poor	74, 174, 229, 231, 239, 291	orange
Form X	Desolvation of hexane solvate	medium		orange

Example 7. Inhibition of KIT Phosphorylation in Canine Mast Cell Tumors.

5 **Purpose.** The development of targeted therapies for cancer offers the opportunity to directly evaluate drug effects on the molecular target and correlate these effects with tumor biology and drug pharmacokinetics. This can be instrumental in oncology drug development because it establishes a pharmacodynamic/pharmacokinetic relationship and provides critical information regarding the therapeutic impact of a targeted agent. The purpose of this study was to evaluate the effect of a single dose of the receptor tyrosine kinase inhibitor Compound I phosphate on the activity of its molecular target KIT in canine mast cell tumors (MCT), in canine patients with advanced MCTs using KIT phosphorylation as a marker of direct target inhibition. Also studied was phosphorylation of ERK1/2 (a mitogenactivated protein kinase (MAPK) downstream of KIT signaling), Compound I phosphate plasma concentration, and the mutational status of *c-kit* to determine how these parameters correlate with KIT phosphorylation status after Compound I phosphate treatment.

Study Drug. Compound I phosphate was available in 20-mg scored tablets.

20 **Study Design.** This study was a proof of target modulation study in dogs with recurrent or metastatic grade II/III MCTs. Patients received a single oral dose of Compound I phosphate at 3.25 mg/kg. Using a 6-mm punch biopsy instrument, samples were obtained from the tumor before Compound I phosphate administration and 8 hours (h) after treatment. When possible, multiple biopsies were taken. Each sample was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -70° centigrade (C) before analysis. Blood samples for analysis of plasma levels of Compound I phosphate were obtained at the same time as tumor biopsies (see below).

Compound I phosphate Plasma Levels. Blood samples were drawn from the jugular vein and placed into a red-top serum collection vacuum glass tube. Specimens were kept at room temperature, allowed to clot, centrifuged at 1500 rpm at 4°C for 10

minutes, transferred to cryovials, and plasma frozen at -70°C pending analysis.

Briefly, plasma samples (20 µl) or Compound I phosphate standards in canine plasma were mixed with methanol (200 µl) containing DL-propranolol hydrochloride (internal standard) in a 96-well polypropylene plate (Orochem Technology,

5 Westmont, IL). The plate was mixed by vortex for 1 min, and the samples were centrifuged for 10 min at 4000 rpm. Ten microliters of the supernatant were injected onto the LC/MS/MS system, in which separation occurred on a BataBasic C-18 (5 µm, 100 X 4.6 mm) reverse-phase high-performance liquid chromatography column (Keystone Scientific, Foster City, CA). The amount of Compound I phosphate and the
10 internal standard in each canine plasma sample were quantified based on standard curves generated using known amounts of compound ranging from 0.2 to 500 ng/ml.

c-kit Mutation Analysis. For the majority of the samples, RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's specifications. cDNA was then generated from the RNA using dNTPs, random
15 primers, 5X First Strand Buffer, 0.1 M DTT, and Superscript Taq polymerase (all from Promega, Madison, WI). The cDNA was quantified for each sample. For the remaining samples, genomic DNA was prepared as described previously (Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F., and London, C. A. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell
20 tumors of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 63: 1718–1723, 2002; which is incorporated by reference in its entirety). For both reactions, the PCR was run for 40 cycles consisting of 94°C (1 min), 59°C (1 min), and 72°C (1 min), with a 5 min 72°C extension at the end of the reaction. A c-kit cDNA generated from the canine C2 mast cell line and cDNA generated from normal canine cerebellum were used as controls.

25 The PCR products were separated by electrophoresis on a 4% agarose gel; the expected wild-type c-kit PCR product is 196 bp in size for PCR from cDNA and 190 bp in size for genomic DNA PCR. For those cases in which an ITD was not obvious (only a single band was present), the PCR products were gel purified using the Promega PCR Wizard Clean-Up kit (Promega) and sequenced using both P1
30 (forward) and P5 or P2 (reverse) primers at the core sequencing facility at the University of California–Davis, to rule out the presence of very small ITDs, deletions, or point mutations. Sequence alignment and comparison were performed using the DNASIS sequence analysis program.

Analysis of KIT and ERK Phosphorylation. Tumor biopsies were frozen in liquid nitrogen and later pulverized using a liquid nitrogen-cooled cryomortar and pestle, then stored at -70°C until used. For the analysis of KIT, pulverized tumors were homogenized, lysed, and immunoprecipitated from 1 mg of starting tumor lysate, as described previously (Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., Cherrington, J. M. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2: 471-478, 2003; which is incorporated by reference in its entirety) using an agarose-conjugated antibody to KIT (SC-1493AC; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). When multiple biopsies were available, repeat immunoprecipitation/Western blot analysis was performed on separate biopsies. The amount of phosphorylated KIT in each sample was determined by Western blot using an antibody to phosphotyrosine 719 of murine KIT (3391; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), which corresponds to tyrosine 721 of canine KIT and is an autophosphorylation site and, thus, a surrogate for KIT kinase activity. For the analysis of total KIT, the blots were stripped, reblocked, and reprobed with an antibody to KIT (A-4542; DAKO Corp., Carpinteria, CA). For analysis of p42/44 ERK, the same tumor lysates used for KIT analysis were probed by Western blot with an antibody to phospho-Thr 202/Tyr 204 ERK1/2 (9101B; Cell Signaling Technology) and then stripped and reprobed with an antibody to total ERK (9102; Cell Signaling Technology). Evaluable tumor biopsy pairs for both KIT and ERK1/2 were considered those for which detectable total protein was present in both biopsies of the pair. Target modulation was scored by eye by three observers blinded to the JM status and plasma concentration. Reduction of $\geq 50\%$ in phospho-protein signal relative to total protein signal in the biopsy sample taken post-treatment compared with the pretreatment biopsy was scored as positive for target modulation, whereas a reduction of $< 50\%$ was scored negative.

Results. Fourteen dogs were enrolled in this clinical study with the primary objective to determine whether a reduction in KIT tyrosine phosphorylation occurred after oral administration of a single dose of Compound I phosphate. KIT tyrosine phosphorylation was assessed using a phospho-specific antibody directed against an autophosphorylation site in KIT, serving as a surrogate for KIT kinase activity. In addition, *c-kit* JM mutational status (ITD+ or ITD-) was determined from the baseline tumor biopsy, and plasma concentrations of Compound I phosphate were measured 8 hours after dosing to correlate these parameters with inhibition of KIT

phosphorylation. Eleven of the 14 dogs were evaluable for KIT target modulation. The three dogs deemed not evaluable had undetectable or greatly reduced total KIT protein in one or both biopsies and so could not be scored for target modulation. The data for all dogs enrolled in the study are summarized in Table 8.

5

Table 8 Summary data for all patients enrolled

<u>Patient number</u>	<u>Tumor grade</u>	<u>c-kit ITD mutation present</u>	<u>Plasma Compound I phosphate postdose (ng/mL)</u>	<u>P-KIT reduction postdose^a</u>	<u>P-ERK1/2 reduction postdose</u>
1	III	Yes	81.0	Yes	No
2	III	Yes	33.2	Yes	No
3	II	Yes	83.5	NE	Yes
4	III	Yes	98.0	Yes	Yes
5	III	Yes	116.0	Yes	Yes
6	III	No	121.0	Yes	Yes
7	III	No	186.0	NE	NE
8	III	No	0.3	Yes	No
9	II	No	103.0	NE	NE
10	II	No	111.0	No	Yes
11	II	No	158.0	No	Yes
12	II	No	65.3	Yes	Yes
13	II	No	95.4	No	No
14	III	No	119.0	Yes	NE

^a NE, nonevaluable, P-KIT, Phospho-Tyr721 KIT, P-ERK1/2, Phospho-Thr202/Tyr204 ERK1/2

Of the 14 dogs analyzed, 5 (36%) had an ITD by PCR analysis (Fig. 5, Lanes 1-5); all five tumors had evidence of an ITD. Interestingly, patient 2 had apparently lost the wild-type *c-kit* allele. The PCR products from the remaining nine dogs that did not have evidence of an ITD (Fig. 5, Lanes 6-14) were directly sequenced, and none demonstrated any type of mutation (insertion, deletion, or point mutation). For Lanes 3, 6, 8, and 9, genomic DNA was used for the PCR reaction, resulting in a slightly smaller (190 bp) wild-type product.

The level of total and phosphorylated KIT expressed in the MCTs at baseline varied between animals. Higher KIT expression correlated with higher tumor grade. Four of eight grade III tumors had high KIT expression, compared to one of six grade II tumors (Fig. 6). For example, the total KIT expression in the tumor from patient 2 (grade III) was markedly higher than that in the tumor from patient 11 (grade II).

Dogs with grade III tumors also had a higher incidence of high levels of phosphorylated KIT at baseline than those with grade II tumors, consistent with the increased frequency of *c-kit* ITD mutations in advanced tumors and consequently elevated levels of ligand-independent phosphorylated KIT. Five of the evaluable
5 seven dogs with grade III tumors had high levels of phosphorylated KIT at baseline; four of these were positive for the presence of an ITD in *c-kit*. Only 1 grade II tumor had significant phosphorylated KIT; this animal also expressed ITD-mutated *c-kit*.

Eight of the 11 evaluable dogs scored positive for target modulation using the criterion of a $\geq 50\%$ reduction in phosphorylated KIT relative to total KIT in the
10 biopsy sample taken after Compound I phosphate treatment when compared with the pretreatment sample. Examples of phosphorylated KIT and total KIT in immunoprecipitates of tumor biopsies taken before and after treatment with Compound I phosphate are shown in Fig. 6. Five tumors (Fig. 6, left) were scored as positive for target modulation, whereas two tumors (Fig. 6, right) were scored as
15 negative. Biopsy pairs that were scored as negative for inhibition of KIT phosphorylation after Compound I phosphate treatment all had markedly less phosphorylated KIT at baseline than those that scored positive (Fig. 6).

To evaluate effects of Compound I phosphate inhibition on downstream signaling pathways regulated by KIT phosphorylation, levels of the phosphorylated
20 MAPK ERK1/2 were evaluated by Western blot analysis of the same biopsy pairs used for KIT analysis. Eleven of 14 tumors were evaluable for phospho-ERK1/2 target modulation (two of these were also nonevaluable for KIT target modulation). Of the 11 evaluable, 7 showed a reduction in the ratio of phospho-ERK1/2 to total ERK1/2 in tumors sampled after the administration of Compound I phosphate,
25 compared with baseline tumor samples (see Fig. 6). ERK target modulation was more frequently detected in MCTs with relatively high baseline ERK expression and phosphorylation than in those with low ERK.

Based on preclinical work in rodent models, the therapeutic range of Compound I for target inhibition was considered to be 50–100 ng/ml for 12 h of a 24-
30 h dosing period. The plasma concentration of Compound I phosphate at 8 h (approximately C_{max}) after a single dose at 3.25 mg/kg ranged from 33.2 to 186 ng/ml, with an average of 105 ± 9 ng/mL (Table 8). In one animal, the plasma concentration of Compound I phosphate was outside the range of the other samples (0.3 ng/ml). Twelve of 14 dogs had plasma levels considered to be in the therapeutic

range established in a Phase I clinical study of Compound I. (London, C. A., Hannah, A. L., Zadovoskaya, R., Chien M. B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D. B., and Cherrington, J. M. Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. Clin. Cancer Res., 2755–2768, 2003) The average plasma concentration for dogs with evidence of KIT target modulation (79.2 ± 41 ng/ml) and those that did not score for KIT target modulation 137 ± 36 ng/ml) was not significantly different ($P = 0.08$).

Discussion. This correlative study was designed to investigate target modulation in a comparable clinical population by studying the effects of a single clinically efficacious dose of Compound I phosphate on the phosphorylation of KIT in canine MCTs and the subsequent impact on signaling through MAPKs. The plasma concentrations of Compound I phosphate achieved in this study were measured near the expected C_{max} , based on preclinical pharmacokinetic studies and were consistent with drug levels measured in the Phase I clinical study investigating the efficacious dose and regimen of Compound I (Table 8).

Eight of 11 (73%) evaluable MCT biopsy pairs had detectable inhibition of KIT activation as measured by a reduction in phosphorylated KIT after a single oral dose of Compound I phosphate. The three patients that did not show detectable KIT target modulation after treatment had MCTs that expressed low levels of KIT and phospho-KIT at baseline. The lack of significant target modulation in these patients may be attributable to technical limits in the detection method; the sensitivity of the phospho-specific antibody for phosphorylated KIT relative to nonphosphorylated KIT may be insufficient in samples with low baseline KIT expression. Inhibition of KIT activity correlated more closely with baseline KIT phosphorylation than with *c-kit* ITD genotype. Based on cellular assays, it would be predicted that both wild-type and ITD mutant KIT would be inhibited by Compound I phosphate *in vivo*, because Compound I *in vitro* blocked the phosphorylation of wild-type and ITD mutant KIT with comparable potency.

Compound I phosphate also affected a signaling pathway downstream of KIT. Mutations in *c-kit* in GIST and hematopoietic malignancies have been reported to activate different signaling pathways from each other and from wild-type KIT. In canine MCTs, all but one tumor sample had detectable phosphorylated ERK1/2 at baseline. In 7 of 11 evaluable tumor biopsy pairs, ERK1/2 was inhibited, as measured

by a reduction in phosphorylated ERK1/2 after treatment. Not all of the tumors scoring positive for ERK1/2 inhibition were also positive for inhibition of KIT phosphorylation. ERK1/2 target modulation did not correlate with tumor grade or the presence or absence of *c-kit* ITD mutation. As for KIT target modulation, ERK1/2 target modulation was detected more frequently in tumors that expressed high levels of ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 at baseline.

The detection of inhibition of a molecular target of Compound I phosphate after treatment of MCTs serves as proof of target modulation for Compound I phosphate in this setting. The clinical relevance of this finding is supported by the correlation between inhibition of the molecular target and plasma drug concentrations in the therapeutic range, and the previously reported clinical objective responses to Compound I in canine patients with MCTs expressing activating mutations in the target gene, providing proof of concept for Compound I phosphate in this population of patients. Because dogs with other malignancies (including mammary carcinoma, soft tissue sarcoma, and multiple myeloma) also experienced durable objective responses on treatment with Compound I, KIT inhibition at this plasma concentration may be reasonably extrapolated to successful inhibition of the other closely related receptor tyrosine kinase targets of Compound I expressed by these tumors, based on in vitro and in vivo potency of Compound I, providing a molecular rationale for objective responses in these tumors. For example, canine mammary tumors express VEGFR, which is inhibited by indolinone tyrosine kinase inhibitors at comparable concentrations to KIT in cellular in vitro assays. (Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M., and London, C. A. Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood*, 100: 585-593, 2002) Compound I phosphate inhibition of both wild-type and ITD mutant *c-kit* in MCTs can, thus, serve as a surrogate for inhibition of the related RTK targets of Compound I phosphate, VEGFR, and PDGFR, which are aberrantly expressed and/or regulated by many different tumor types. Finally, molecular target inhibition, coupled with clinical objective responses in canine tumors, directs the development of related compounds in human cancer toward clinical populations expressing activated KIT, VEGFR, or PDGFR.

Example 8. Multicenter, Placebo-Controlled, Double Blind, Randomized Study of Oral Compound I phosphate in the Treatment of Dogs with Recurrent Mast Cell Tumors.

Purpose. The effectiveness of Compound I phosphate oral tablets for the treatment of mast cell tumors in client-owned animals that had recurrent measurable disease after surgery was evaluated in a masked, negative controlled study. The study evaluated every-other-day dosing of Compound I phosphate at 3.25 mg free base
5 equivalents (FBE)/kg body weight on disease response using modified (RECIST) criteria of response. The presence or absence of *c-kit* mutation in mast cell tumors was evaluated as a covariate in this study. For decision-making purposes, the duration of the study was 6 weeks.

One-hundred-fifty-three (153) dogs were randomized in a ratio of 4:3 into one
10 of two treatment groups: T01 (Placebo in which n = 65) and T02 (Compound I phosphate in which n = 88). Ten veterinary oncology practices in the United States were selected and enrolled cases. For enrollment, dogs had to have recurrent mast cell tumor (at least one target lesion had to have a minimum longest diameter of 20 mm) ± regional lymph node involvement. A maximum of three target lesions (measurable
15 mast cell tumors) and all non-target lesions (all remaining lesions, measurable or unmeasurable) were identified at baseline by two evaluators. Efficacy was based on the objective response (complete response or partial response) at the week 6 visit where the mean of the two evaluators sum of the longest diameter of target lesions (Mean Sum LD) was compared to the Baseline Mean Sum LD for calculation of percent
20 reduction or increase. Assessment of non-target lesions was subjective. A complete response (CR) was defined as the disappearance of all target and non-target lesions and the appearance of no new lesions; a partial response (PR) was defined as at least a 30% decrease in the Mean Sum LD of target lesions compared to the Baseline Mean Sum LD and non-progression of non-target lesions and appearance of no new lesions.
25 Tissue samples from the tumor and distant normal skin were collected prior to randomization and submitted for the assessment of *c-kit* mutation status.

Eighty-six (86) T02 and 65 T01 animals were included in the efficacy analysis. The data analysis indicated a statistically significant improvement in the primary endpoint (objective response) for Compound I phosphate (T02) compared to
30 placebo (T01). The T02 animals had a significantly greater objective response rate (38.3%; 33/86) compared to T01 animals (7.9%; 5/63) ($p < 0.001$). Nearly twice as many T01 animals (66.7%; 42/63) experienced progressive disease compared to T02 animals (33.7%; 29/86). Dogs in the T02 group that were positive for the *c-kit*

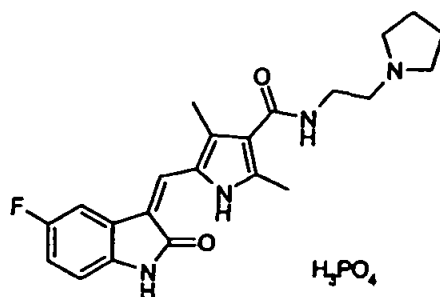
mutation were almost twice as likely to have an objective response compared to those that were negative for the *c-kit* mutation (60%, 12/20 vs. 32.8%, 21/64, respectively).

In conclusion, this study demonstrated the effectiveness of Compound I phosphate oral tablets for the treatment of recurrent mast cell tumors in client-owned
5 dogs.

Numerous modifications and variations in the invention as set forth in the above illustrative examples are expected to occur to those skilled in the art. Consequently, only such limitations as appear in the following claims should be placed on the invention.

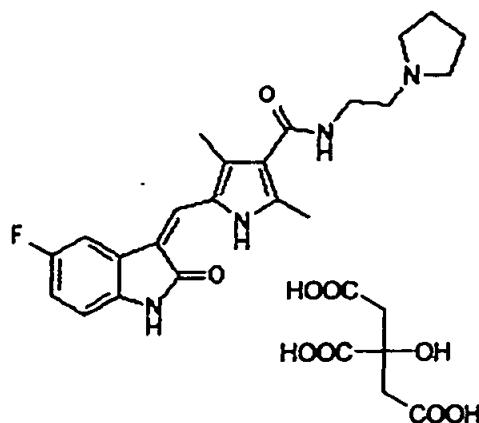
WHAT IS CLAIMED:

1. Salt forms of a base, wherein the base is 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydro-indol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-amide, and wherein the salt form is selected from the group consisting of the citrate and phosphate salts, and solvates and polymorphs thereof.
2. A salt form of claim 1, wherein the salt is the phosphate salt with the structure:



and solvates and polymorphs thereof.

3. The salt form of claim 2, with a molecular formula of $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot H_3PO_4$ and a melting point from about 285 to about 290°C.
4. A polymorph (Form 1) of the phosphate salt of claim 2, wherein said polymorph has a powder X-ray diffraction spectrum comprising peaks expressed in degrees (± 0.1 degree) of two theta angle of 20.8, 24.5, 25.9, and 27.0 obtained using $CuK\alpha_1$ emission (wavelength = 1.5406 Angstroms).
5. A salt form of claim 1, wherein the salt is the citrate salt with the structure:



and solvates and polymorphs thereof.

6. The salt form of claim 5, with a molecular formula of $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot C_6H_8O_7$ and a melting point from about 178 to about 183°C.
7. The salt form of claim 5, having a powder X-ray diffraction pattern comprising

peaks expressed in degrees (± 0.1 degree) of two theta angle of 9.1, 9.4, 14.2, 25.4, and 26.8 obtained using $\text{CuK}\alpha_1$ emission (wavelength = 1.5406 Angstroms).

8. A pharmaceutical composition comprising the phosphate salt of claim 2, the citrate salt of claim 5, or a solvate or polymorph thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.
9. A method for the modulation of the catalytic activity of protein kinases comprising contacting said protein kinase with the phosphate salt of claim 2, the citrate salt of claim 5, or a solvate or polymorph thereof.
10. A protein kinase of claim 9, wherein the protein kinase is selected from the group consisting of receptor tyrosine kinases, non-receptor protein tyrosine kinases, and serine/threonine protein kinases.
11. A method of preventing or treating a protein kinase related disorder in an organism comprising administering to said organism a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition of claim 8.
12. The method of claim 11, wherein the protein kinase related disorder is mast cell tumor or mastocytosis.
13. A method of preparing phosphate salt crystals of the base of claim 1, which comprises:
 - (a) introducing a stoichiometric amount of phosphoric acid to the base in a solution comprising a solvent or a mixture of solvents;
 - (b) crystallizing the phosphate salt from solution; and
 - (c) separating the phosphate salt crystals from the solvent solution.
14. A method of preparing polymorphs of the phosphate salt of claim 2, which comprises:
 - (a) introducing the phosphate salt to a solution comprising a solvent or a mixture of solvents;
 - (b) optionally, adding a bridging solvent to the solution; and
 - (c) separating the polymorph crystals from the solvent solution.
15. The method of claim 14, wherein the solvent of step (a) comprises methanol.
16. A method of preparing citrate salt crystals of the base of claim 1, which comprises:
 - (a) introducing a stoichiometric amount of citric acid to the base in a solution comprising a solvent or a mixture of solvents;

- (b) crystallizing the citrate salt crystals from solution; and
 - (c) separating the citrate salt crystals from the solvent solution.
17. A use of the phosphate salt of claim 2, the citrate salt of claim 5, or a solvate or polymorph thereof, in the preparation of a medicament which is useful in the
- 5 treatment of a disease mediated by abnormal PK activity.

1/6

m

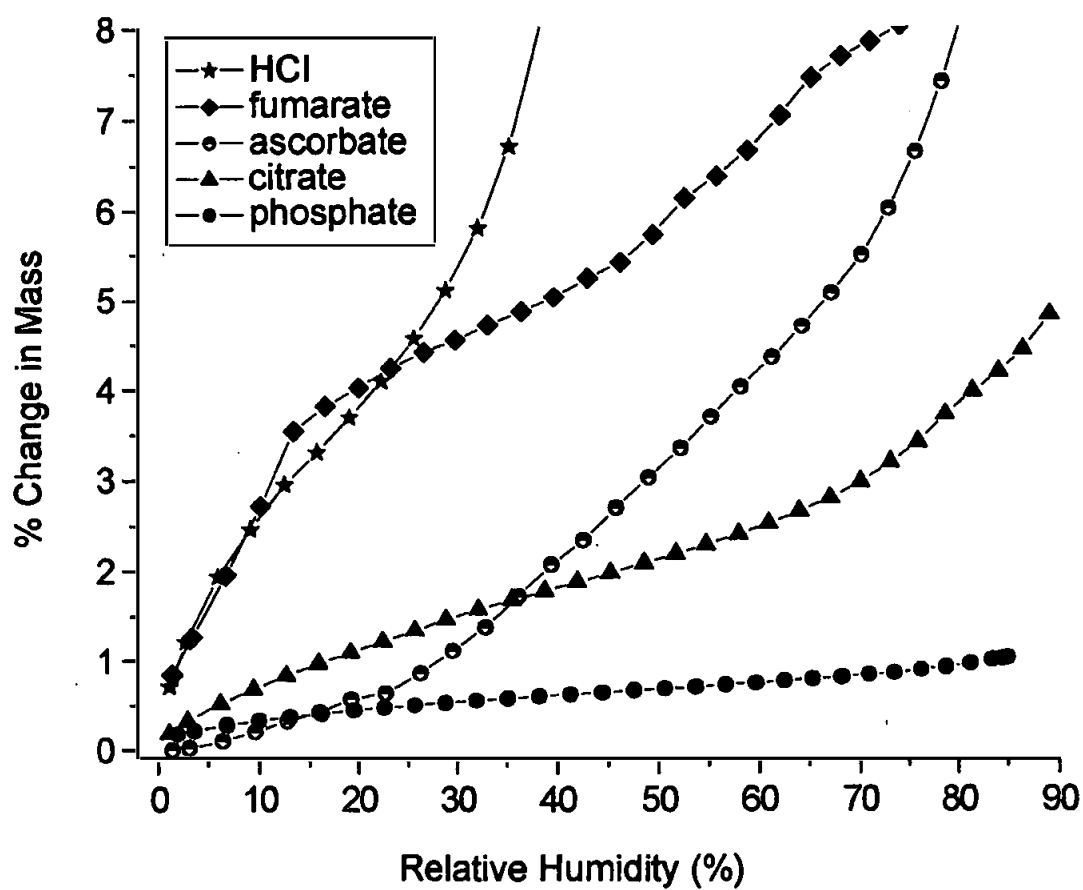
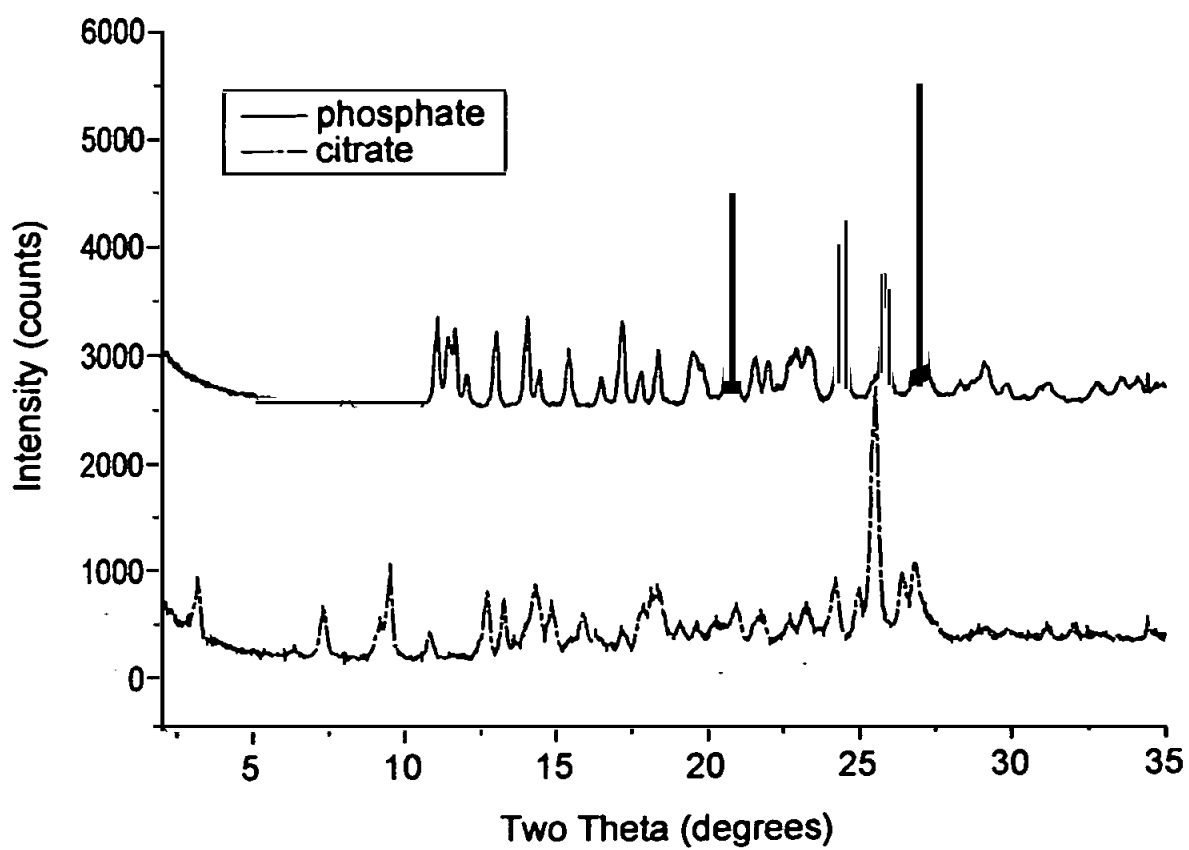


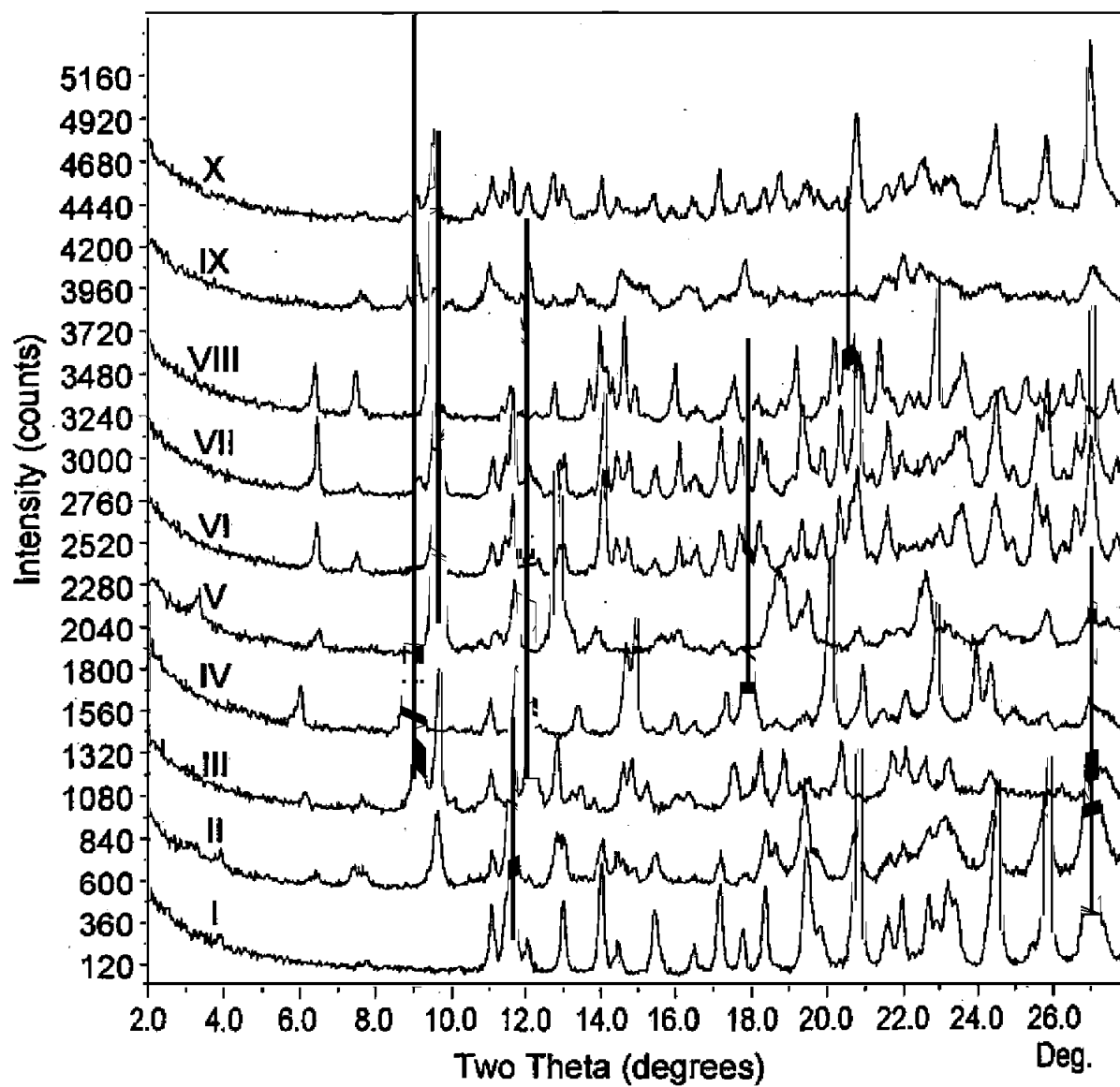
FIG. 1

2/6

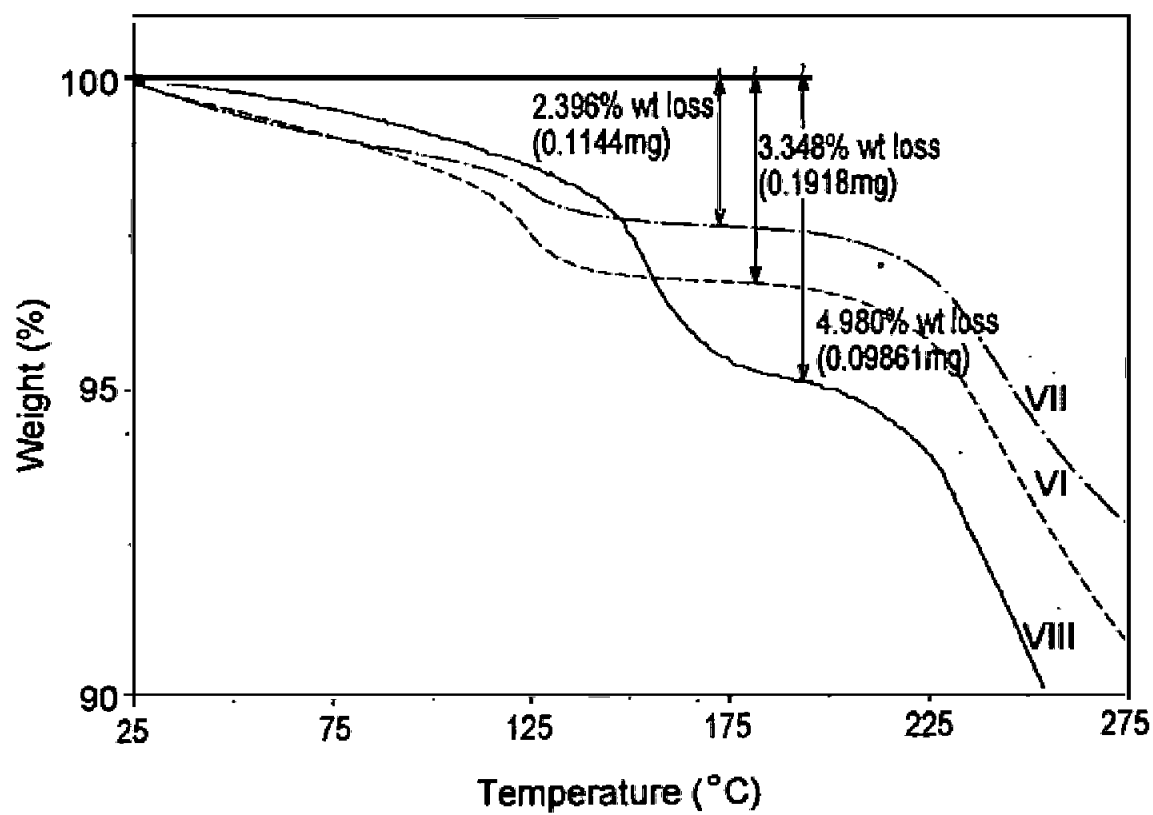
**FIG. 2**

3/6

28

**FIG. 3**

4/6

**FIG. 4**

6/6

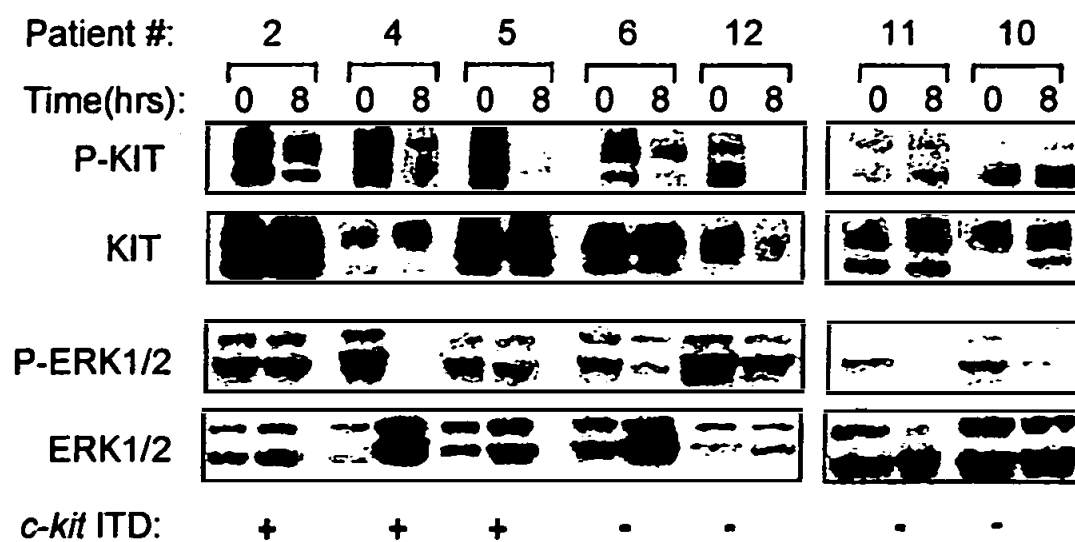


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/002506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D403/06 A61K31/404 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)

C07D 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, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	US 2006/009510 A1 (HAVENS, JEFFREY L. ET AL) 12 January 2006 (2006-01-12) page 18; example 2	1-4, 8-15,17
A	WO 2004/076410 A2 (UPJOHN CO [US]; SUN CHANGQUAN [US]; FOSTER TODD P [US]; HAN FUSEN [US]) 10 September 2004 (2004-09-10) page 24 - page 25; claims	1-17
A	WO 03/016305 A (UPJOHN CO [US]; HAWLEY MICHAEL [US]; FLECK THOMAS J [US]; PRESCOTT STE) 27 February 2003 (2003-02-27) cited in the application claims; examples	1-17
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

25 January 2007

Date of mailing of the international search report

02/02/2007

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) 340-3018

Authorized officer

Fazzi, Raffaella

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002506

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 573 293 B2 (TANG PENG CHO [US] ET AL) 3 June 2003 (2003-06-03) cited in the application table 1	
A	WO 01/60814 A2 (SUGEN INC [US]; TANG PENG CHO [US]; MILLER TODD [US]; LI XIAOYUAN [US]) 23 August 2001 (2001-08-23) examples	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/002506

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9-12 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

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/002506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006009510	A1	12-01-2006	NONE
WO 2004076410	A2	10-09-2004	AU 2004215407 A1 10-09-2004
		BR PI0407795 A 14-02-2006	
		CA 2516900 A1 10-09-2004	
		EP 1599200 A2 30-11-2005	
		JP 2006518755 T 17-08-2006	
		KR 20050107588 A 14-11-2005	
		MX PA05008959 A 04-11-2005	
		US 2004259929 A1 23-12-2004	
WO 03016305	A	27-02-2003	BG 108553 A 30-04-2005
			BR 0211612 A 24-08-2004
			CA 2455050 A1 27-02-2003
			CN 1543462 A 03-11-2004
			CN 1789264 A 21-06-2006
			CZ 20040196 A3 12-01-2005
			EP 1419151 A1 19-05-2004
			HR 20040112 A2 30-06-2004
			JP 2005503386 T 03-02-2005
			MA 27058 A1 20-12-2004
			MX PA04001452 A 20-05-2004
			NO 20041054 A 12-03-2004
			NZ 531232 A 26-11-2004
			OA 12650 A 19-06-2006
			SK 902004 A3 04-03-2005
			UA 76483 C2 15-04-2004
			ZA 200400706 A 09-03-2005
US 6573293	B2	03-06-2003	US 2004063773 A1 01-04-2004
			US 2002156292 A1 24-10-2002
WO 0160814	A2	23-08-2001	AU 3977001 A 27-08-2001
			BG 107078 A 30-04-2003
			BR 0108394 A 22-06-2004
			CA 2399358 A1 23-08-2001
			CN 1439005 A 27-08-2003
			CZ 20023081 A3 12-02-2003
			EP 1255752 A2 13-11-2002
			HR 20020751 A2 31-12-2004
			HU 0204433 A2 28-04-2003
			IS 6501 A 13-08-2002
			JP 3663382 B2 22-06-2005
			JP 2003523340 T 05-08-2003
			MX PA02008021 A 05-04-2004
			NO 20023831 A 15-10-2002
			NZ 520640 A 29-04-2005
			PL 361209 A1 20-09-2004
			SK 13262002 A3 04-03-2003

42

FORMAS SALINAS SÓLIDAS DE UNA 2-INDOLINONA SUSTITUIDA CON PIRROLCAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a formas salinas sólidas de un compuesto de 2-indolinona sustituido con 3-pirrol, (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico. Los compuestos anteriores modulan la actividad de las proteínas cinasas (generalmente abreviadas como "PK" por sus iniciales en inglés: protein kinases). Los compuestos de esta invención son útiles por lo tanto para tratar trastornos relacionados con una actividad PK anormal. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden sales de este compuesto y métodos para prepararlos. La presente invención también se refiere a polimorfos de la forma salina de fosfato de la amida.

ANTECEDENTES

Lo siguiente se ofrece sólo a modo de información básica y no se admite que sea técnica anterior a la presente invención.

Los sólidos, incluyendo los productos farmacéuticos, presentan a menudo más de una forma cristalina, y esto se conoce como polimorfismo. El polimorfismo ocurre cuando un compuesto cristaliza en varias fases sólidas que se diferencian en el empaquetamiento cristalino. Se citan numerosos ejemplos en las referencias convencionales de las propiedades de estado sólido de los productos farmacéuticos, Byrn, S. R., *Solid-State Chemistry of Drugs*, New York, Academic Press (1982); Kuhnert-Brandstatter, M., *Thermomicroscopy In The Analysis of Pharmaceuticals*, New York, Pergamon Press (1971) y Halebian, J. K. y McCrone, W. *Pharmaceutical applications of polymorphism. J. Pharm. Sci.*, 58, 911 (1969). Byrn indica que, en general, los polimorfos presentan características físicas diferentes, incluyendo solubilidad y estabilidad física y química.

Debido a las diferencias en el empaquetamiento molecular, los polimorfos pueden diferenciarse de forma que influya en la liberación del fármaco, estabilidad en estado sólido y elaboración farmacéutica. La estabilidad relativa y las interconversiones de los polimorfos son particularmente importantes en la selección de un fármaco comercial. Un polimorfo adecuado puede depender del resultado de la estabilidad física. Por ejemplo, la elección de un fármaco comercial puede depender de la disponibilidad y elección de un polimorfo adecuado que tenga las características deseadas, tales como una estabilidad física excelente o la capacidad de poder ser elaborado a gran escala. El comportamiento de la forma de dosificación sólida no

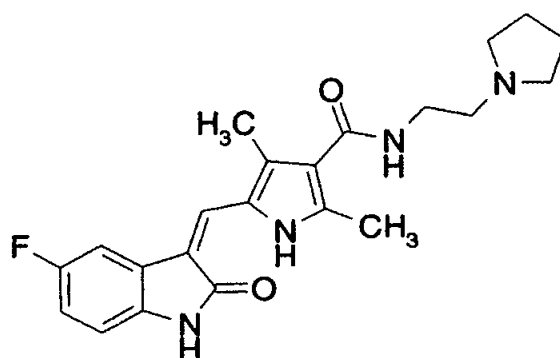
debería estar limitado por las transformaciones polimórficas durante la durabilidad del producto. Es importante señalar que no hay un método fidedigno para predecir las estructuras cristalinas observables de un fármaco dado o para predecir la existencia de polimorfos con las propiedades físicas deseables.

- 5 Las PK son enzimas que catalizan la fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos tirosina, serina y treonina de las proteínas. Las consecuencias de esta actividad aparentemente sencilla son asombrosas ya que prácticamente todos los aspectos de la vida de las células (por ejemplo, crecimiento, diferenciación y proliferación celular) dependen de una u otra forma de la actividad PK. Además, se ha relacionado la
- 10 actividad PK anormal con un gran número de trastornos que van desde enfermedades que no ponen en peligro la vida, tales como la psoriasis, hasta enfermedades extremadamente virulentas tales como el glioblastoma (cáncer de cerebro).

- Las tirosina cinasas receptoras (generalmente denominadas RTK por sus iniciales en inglés: recceptor tyrosine kinases), un tipo de PK, son candidatos excelentes
- 15 para la terapia molecular dirigida porque juegan papeles importantes en el control de la proliferación y la supervivencia celular y frecuentemente presentan desarreglos en varias afecciones. Los mecanismos de desarreglo incluyen sobre-expresión (Her2/neu en el cáncer de mama, receptor del factor de crecimiento epidérmico en el cáncer pulmonar de células no pequeñas), mutaciones activantes (KIT en tumores estromales
- 20 gastrointestinales, tirosina cinasa relacionada con fms, 3/Flk2 (FLT3), en leucemia mielógena aguda) y bucles de activación autocrina (factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)/receptor del VEGF (VEGF/VEGFR) en melanoma, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)/receptor del PDGF (PDGF/PDGFR) en sarcoma).

- 25 Se han descrito RTK reguladas de forma anormal en cánceres humanos y caninos comparables. Por ejemplo, se produce expresión anormal del oncogén *Met* tanto en el osteosarcoma humano como en el canino. De forma interesante, se observan mutaciones activantes comparables en el dominio yuxtamembranal (JM) del *c-kit* en 50-90% de los tumores estromales gastrointestinales (GIST) humanos y en 30-
- 30 50% de los tumores de mastocitos (MCT) caninos avanzados. Aunque las mutaciones en los GIST humanos consisten en deleciones en el dominio JM y en los MCT caninos consisten en duplicaciones en tándem internas (ITD) en el dominio JM, ambos llevan a la fosforilación constitutiva de la KIT en ausencia de enlace al ligando. Las RTK y sus ligandos, VEGF, PDGF y FGF intervienen en la neovascularización, conocida como
- 35 angiogénesis, en tumores sólidos. Consecuentemente, inhibiendo las RTK, se puede inhibir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en los tumores.

Los agentes de antiangiogénesis, un tipo de moléculas que inhiben el crecimiento de los vasos sanguíneos en los tumores, tienen mucha menos toxicidad para el cuerpo en comparación con los fármacos anti-cáncer convencionales. La patente estadounidense 6.573.293, incorporada en esta memoria como referencia, describe, entre otros compuestos, la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (denominado en la parte siguiente de esta memoria "compuesto I"). Tiene la estructura siguiente:



Compuesto I

10

El compuesto I es una molécula pequeña que presenta capacidad moduladora de las PK. El compuesto es útil por lo tanto para tratar trastornos relacionados con una actividad PK anormal. Es un inhibidor de RTK, PDGFR, VEGFR, KIT y FLT3. Se ha demostrado que el compuesto I inhibe la fosforilación de la KIT, detiene la proliferación celular e induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en líneas de mastocitos malignos *in vitro*, expresando varias formas de KIT mutante. El compuesto I y moléculas relacionadas son eficaces en modelos preclínicos contra xenoinjertos de tumores obtenidos de líneas celulares con origen en distintos tumores humanos.

El compuesto I es útil para tratar cánceres en animales de compañía, principalmente perros, y también es útil para el tratamiento, entre otros, de cánceres en humanos. Tales cánceres incluyen, pero sin limitarse a ellos, leucemia, cáncer de cerebro, cáncer pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, sarcoma de Kaposi, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar de células pequeñas, glioma, cáncer colorrectal, cáncer genitourinario y cáncer estromal gastrointestinal. Además, el compuesto I es útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de mastocitos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, mastocitosis en humanos y tumores de mastocitos en perros.

45

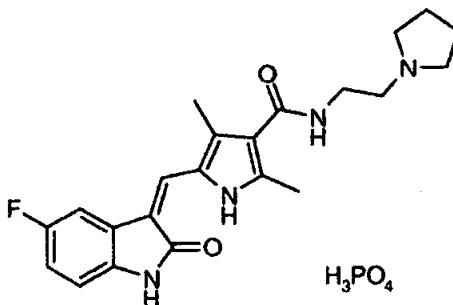
Recientemente se ha demostrado que el compuesto I es eficaz clínicamente frente a varias afecciones espontáneas en perros. En el estudio, 11 de 22 MCT caninos mostraron respuestas objetivas duraderas (respuestas parciales y respuestas totales) frente al tratamiento con el compuesto I; 9 de estos MCT presentaron ITD en el dominio JM de *c-kit*.

El compuesto I cristaliza fácilmente. Su solubilidad es de aproximadamente 10 µg/mL en disolución tampón de fosfato de pH 6 a 25°C. Cuando se sintetizó el compuesto, precipitaron partículas muy finas de la disolución durante la última etapa de la síntesis. El aislamiento subsiguiente de estas partículas finas por filtración fue lento y se obtuvo una torta dura después de filtrado. Se necesita una sal del compuesto I que tenga estabilidad física y propiedades físicas deseables.

SUMARIO DE LA INVENCION

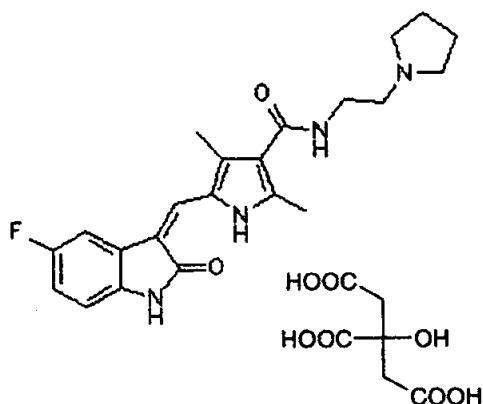
Esta invención comprende formas salinas del compuesto I. Se han sintetizado cinco formas salinas diferentes del compuesto I y se describen en esta memoria (véase tabla 1). Estas incluyen las sales hidrocloreto, fumarato, citrato, fosfato y ascorbato del compuesto I. Basándose en la caracterización de estas sales, se identificó la sal 1:1 de fosfato, fosfato del compuesto I, como una forma salina con características muy deseables. El muestreo de los polimorfos reveló la existencia de 10 polimorfos del fosfato del compuesto I, denominados en esta memoria formas I a X.

En un aspecto, esta invención proporciona dos formas salinas del compuesto I, en las que la forma salina se elige entre las sales de citrato y fosfato, y sus solvatos y polimorfos. En un modo de realización se elige la forma salina de fosfato con la fórmula molecular $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot H_3O_4P$. En otro modo de realización, se elige la forma salina de fosfato con un punto de fusión de aproximadamente 285 a aproximadamente 290°C. El fosfato del compuesto I tiene la estructura:



fosfato del compuesto I

En otro modo de realización, se elige la sal de citrato, citrato del compuesto I, que tiene la fórmula molecular $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot C_6H_8O_7$. En todavía otro modo de realización, se elige la forma salina de citrato con un punto de fusión de aproximadamente 178 a aproximadamente 183°C. El citrato del compuesto I tiene la estructura:



citrato del compuesto I

Un segundo aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende la sal de fosfato o la sal de citrato del compuesto I, o sus solvatos o polimorfos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención es un método para la modulación de la actividad catalítica de proteína cinasas que comprende poner en contacto dicha proteína cinasa con las sales de fosfato o de citrato del compuesto I, o sus solvatos o polimorfos. La proteína cinasa se puede elegir entre el grupo que consiste en las tirosina cinasas receptoras, las proteína tirosina cinasas no receptoras y las serina/treonina proteína cinasas.

Un cuarto aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con una proteína cinasa en un organismo, que comprende administrar a dicho organismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende la sal de fosfato o la sal de citrato del compuesto I, o sus solvatos o polimorfos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización, el organismo es un humano. En otro modo de realización, el organismo es un animal de compañía. En todavía otro modo de realización, el animal de compañía es un gato o un perro. El trastorno relacionado con la proteína cinasa se puede elegir entre el grupo que consiste en un trastorno relacionado con una tirosina cinasa receptora, un trastorno relacionado con una proteína tirosina cinasa no receptora y un trastorno relacionado con una serina treonina proteína cinasa. El trastorno relacionado con la proteína cinasa se puede elegir entre el

grupo que consiste en un trastorno relacionado con un EGFR, un trastorno relacionado con un PDGFR, un trastorno relacionado con un IGFR, un trastorno relacionado con un *c-kit* y un trastorno relacionado con una FLK. Tales trastornos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, leucemia, cáncer de cerebro, cáncer pulmonar de células no
5 pequeñas, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, sarcoma de Kaposi, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, glioma, mastocitosis, tumor de mastocitos, cáncer colorrectal, cáncer genitourinario, cáncer gastrointestinal, diabetes, un trastorno autoimmune, un trastorno
10 de hiperproliferación, restenosis, fibrosis, psoriasis, enfermedad de van Heppel-Lindau, osteoartritis, artritis reumatoide, angiogénesis, un trastorno inflamatorio, un trastorno inmunológico y un trastorno cardiovascular.

Un quinto aspecto de la invención es un método para preparar cristales de sal de fosfato de la base (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-
15 indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico que comprende introducir una cantidad estequiométrica de ácido fosfórico en la base en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes, forzar la cristalización de la sal de fosfato en disolución, separar los cristales de sal de fosfato de la disolución de disolvente y secar los cristales. El ácido fosfórico se puede introducir en una cantidad
20 que está en un exceso molar de 40% con respecto a la base. El disolvente puede comprender isopropanol. La etapa de separar los cristales de la disolución de disolvente puede comprender añadir acetonitrilo a la disolución y someter la disolución a rotavapor. La etapa de separar los cristales de la disolución de disolvente también puede comprender filtración.

Un sexto aspecto de la invención es un método para preparar cristales de sal de citrato de la base (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-
25 indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico que comprende introducir una cantidad estequiométrica de ácido cítrico en la base en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes, forzar la cristalización de la sal de citrato en disolución, separar los cristales de sal de citrato de la disolución de disolvente y secar los cristales. El ácido cítrico se puede introducir también en una cantidad que está en un exceso molar de aproximadamente 40% con respecto a la base. El disolvente puede comprender metanol. La etapa de separar los cristales de la disolución de disolvente puede comprender añadir acetonitrilo a la disolución y someter la disolución a
30 rotavapor. La etapa de separar los cristales de la disolución de disolvente puede comprender filtración.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona los polimorfos de formas I-X (como se ha descrito en esta memoria) de la sal de fosfato de compuesto I. En un modo de realización se proporciona la forma I.

Un octavo aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el polimorfo de forma I del fosfato del compuesto I y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un noveno aspecto de la invención es un método para la modulación de la actividad catalítica de proteína cinasas que comprende poner en contacto dicha proteína cinasa con el polimorfo de forma I del fosfato del compuesto I.

Un décimo aspecto de la invención es un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con una proteína cinasa en un organismo, que comprende administrar a dicho organismo una cantidad terapéuticamente eficaz del polimorfo de forma I del fosfato del compuesto I. En un modo de realización, el organismo es un humano o un animal de compañía. En otro modo de realización, el animal de compañía es un gato o un perro. Tales trastornos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, tumor de mastocitos y mastocitosis.

Un undécimo aspecto de la invención es un método para preparar polimorfos del fosfato del compuesto I, que comprende introducir la sal de fosfato en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes, opcionalmente añadiendo un disolvente puente a la disolución, y separar los cristales de polimorfo de la disolución de disolvente. La disolución puede comprender agua con acetonitrilo. La disolución puede comprender metanol. El disolvente puente puede ser metanol.

Un duodécimo aspecto de la invención es la utilización de las sales de fosfato o de citrato del compuesto I o del polimorfo de forma I de la sal de fosfato en la preparación de un medicamento que es útil en el tratamiento de una enfermedad mediada por una actividad PK anormal.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1. Datos de absorción de humedad de las sales del compuesto I.
- Figura 2. Patrones de difracción de rayos X en polvo del citrato del compuesto I y del fosfato del compuesto I.
- Figura 3. Patrones de difracción de rayos X de los diez únicos sólidos obtenidos en el estudio de muestreo de polimorfos (véase el ejemplo 5). Se presentan de la forma I a forma X, como se definen en las tablas 5 y 6.

49

Figura 4. Curvas TGA de los sólidos en CH_2Cl_2 (forma VI, inmediatamente después de precipitación), hexano (forma VII, después de reposar durante la noche) y acetonitrilo (forma VIII, después de reposar durante 3 días).

- Figura 5. Resultados de electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR de MCT evaluados en el ejemplo 7. Las bandas 1-5 corresponden a los pacientes 1-5 en la tabla 8; las bandas 6-14 corresponden a los pacientes 6-14 en la tabla 8. Los controles consistían en los productos de PCR generados a partir de la línea de mastocitos caninos C2 que contienen un ITD de 48-bp (banda 15) y de cerebro canino normal (fenotipo salvaje; banda 16).
- Figura 6. Reducciones en MCT de la KIT fosforilada y la cinasa fosforilada regulada por señal extracelular (ERK)1/2 después de una dosis única de fosfato del compuesto I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Definiciones.** A menos que se indique de otro modo, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones tienen los significados dados a continuación:

El término "C" cuando se usa con referencia a la temperatura significa centígrado o Celsius.

- El término "actividad catalítica" se refiere a la tasa de fosforilación de la tirosina bajo la influencia, directa o indirecta, de RTK y/o CTK o la fosforilación de la serina y treonina bajo la influencia, directa o indirecta, de STK.

El término "animal de compañía" se refiere a animales domésticos que ofrecen compañía a los humanos e incluyen, pero sin limitarse a ellos, gatos y perros.

- El término "poner en contacto" se refiere a unir un compuesto de la presente invención y una PK diana de forma que el compuesto pueda afectar la actividad catalítica de la PK, bien directamente, es decir al interaccionar con la cinasa misma, o indirectamente, es decir al interaccionar con otra molécula de la que depende la actividad catalítica de la cinasa.

- El término " CI_{50} " significa la concentración de un compuesto de ensayo que logra una inhibición de la mitad del máximo de la actividad PK.

- El término "modulación" o "modular" se refiere a la alteración de la actividad catalítica de IRTK, CTK y STK. En particular, la modulación se refiere a la activación de la actividad catalítica de RTK, CTK y STK, preferiblemente la activación de la actividad catalítica de RTK, CTK y STK, dependiendo de la concentración del compuesto o sal al que se exponen RTK, CTK o STK o, más preferiblemente, la inhibición de la actividad catalítica de RTK, CTK y STK.



El término "PK" se refiere a una proteína tirosina cinasa receptora (RTK), una tirosina cinasas no-receptora o "celular" (CTK) y una serina-treonina cinasa (STK).

El término "polimorfo" se refiere a una fase sólida de una sustancia que existe en varias formas distintas debido a diferentes disposiciones y/o conformaciones de las moléculas en la red cristalina. Los polimorfos tienen típicamente diferentes propiedades físicas y químicas.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sustancia distinta del compuesto de la invención que se añade a la composición farmacéutica.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de una o más sales de la presente invención o de los polimorfos de dichas sales, como se describen en esta memoria, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológica/farmacéuticamente aceptables. El objetivo de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

El término "vehículo fisiológica/farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o diluyente que no produce una irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado.

El término "polimorfo" también puede definirse como las diferentes formas cristalinas no solvatadas de un compuesto. El término también incluye solvatos (es decir, formas que contienen disolvente o agua), formas amorfas (es decir, formas no cristalinas) y solvatos desolvatados (es decir, formas que solo se pueden obtener eliminado el disolvente de un solvato).

El término "solvato" se usa para describir un complejo molecular que comprende un compuesto de la invención y una o más moléculas de un disolvente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, etanol. El término "hidrato" se usa cuando dicho disolvente es agua.

El término "esencialmente libre" con respecto a la cantidad de un cierto polimorfo en una muestras significa que otros polimorfos están presentes en una cantidad menor que aproximadamente 15 por ciento en peso. En otro modo de realización, "esencialmente libre" significa menos que aproximadamente 10 por ciento en peso. En otro modo de realización, "esencialmente libre" significa menos que aproximadamente 5 por ciento en peso. En todavía otro modo de realización, "esencialmente libre" significa menos que aproximadamente 1 por ciento en peso. Los expertos en la técnica comprenderán que la frase "en una cantidad menor que aproximadamente 15 por ciento en peso" significa que el polimorfo de interés está presente en una cantidad mayor que aproximadamente 85 por ciento en peso. De forma similar, la frase "menos

51

que aproximadamente 10 por ciento en peso" significa que el polimorfo de interés está presente en una cantidad mayor que 90 por ciento en peso.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto que se está administrando que prevendrá, aliviará o mejorará uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando, o prolongará la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. Con respecto al tratamiento del cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad que tiene el efecto de:

- (1) reducir el tamaño del tumor;
- (2) inhibir (es decir, inhibir hasta cierto punto o detener) la metástasis tumoral;
- 10 (3) inhibir (es decir, inhibir hasta cierto punto o detener) el crecimiento tumoral; y/o
- (4) aliviar hasta cierto punto (o eliminar) uno o más síntomas asociados con el cáncer.

Se pueden sintetizar diferentes formas salinas del compuesto I para obtener una forma con mejores propiedades físicas. El compuesto base puede estar en disolución. La disolución es generalmente un disolvente. En un modo de realización, la disolución es un alcohol. En otro modo de realización el disolvente puede ser isopropanol, metanol o acetonitrilo. La disolución también puede comprender una mezcla de disolventes.

Las sales pueden cristalizarse utilizando una técnica estequiométrica de adición/cristalización. Se introduce una cantidad estequiométrica del contraión en la base en disolución. En un modo de realización, la cantidad de contraión está en una relación 1:1 con la base. En otro modo de realización, la cantidad de contraión está en un exceso molar de 0% a aproximadamente 60% con respecto a la base. En otro modo de realización, la cantidad de contraión está en un exceso molar de aproximadamente 10% a aproximadamente 50% con respecto a la base. En todavía otro modo de realización, la cantidad de contraión está en un exceso molar de aproximadamente 40% con respecto a la base. Los contraiones pueden incluir los iones hidrocloreto, fumarato, citrato, fosfato y ascorbato. En un modo de realización el contraión es el ion fosfato. En otro modo de realización el contraión es el ion citrato.

Luego se fuerza la cristalización de la sal en disolución mediante varias técnicas comunes, incluyendo enfriamiento, evaporación, inmersión, etc., conocidas por los expertos en la técnica. Los disolventes en exceso se pueden eliminar de las muestras por métodos conocidos por los expertos en la técnica. En un modo de realización, los disolventes se eliminan de la disolución añadiendo acetonitrilo (ACN) y sometiendo la disolución a rotavapor. La disolución se puede poner en el rotavapor de

52

aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C. En otro modo de realización, se pueden añadir disolventes adicionales (por ejemplo, isopropanol y metil etil cetona) a la disolución antes de introducirla en el rotavapor. La cristalización se puede realizar en oscuridad para evitar isomerización inducida por la luz. En un modo de realización, los
5 cristales se eliminan por filtración. En otro modo de realización, la filtración se puede realizar a la temperatura ambiente del laboratorio.

Mediante estos métodos se cristalizaron las sales de ascorbato, citrato, fumarato, hidrócloruro y fosfato del compuesto I. A continuación se dan ejemplos específicos de métodos de cristalización. Se pueden utilizar análisis por HPLC para
10 determinar la pureza de la muestra resultante. Las propiedades físicas de los compuestos se pueden determinar por ensayos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo determinación del punto de fusión, difracción de rayos X en polvo y gravimetría de absorción de humedad dinámica. Los parámetros para estos ensayos se describen a continuación.

15 Estas cinco formas salinas se describen en esta memoria (véase la tabla 1). Estas sales del compuesto I son a menudo higroscópicas. Por ejemplo, como se puede ver en la tabla 1, a 80% de humedad, la sal de hidrócloruro era aproximadamente 20 por ciento de agua, la sal de fumarato era aproximadamente 9 por ciento de agua y la sal de ascorbato era aproximadamente 6,5 por ciento de agua. Esta característica
20 puede hacer que el uso de la sal en una formulación farmacéutica sea difícil y puede acortar la durabilidad de una formulación. Sin embargo, se encontró inesperadamente que dos sales, las sales de fosfato y de citrato, tenían una baja absorción de humedad, teniendo aproximadamente 1 y aproximadamente 3,8 por ciento de agua a 80 por ciento de humedad relativa, respectivamente.

25 Basándose en la caracterización de estas sales, se identificó la sal 1:1 de fosfato, fosfato del compuesto I, como una forma salina con características muy deseables, incluyendo buena cristalinidad, baja absorción de humedad, facilidad de cristalización, buena pureza y falta de hidrato. También se describen diez polimorfos del fosfato del compuesto I, denominados en esta memoria de forma I a forma X. La sal
30 de citrato también demostró tener características deseables, tales como baja absorción de humedad y buena cristalinidad.

Los polimorfos de los compuestos de la presente invención son deseables porque un polimorfo particular de un compuesto puede tener mejores propiedades físicas y químicas que otras formas polimórficas del mismo compuesto. Por ejemplo, un
35 polimorfo puede tener una solubilidad aumentada en algunos disolventes. Dicha solubilidad añadida puede facilitar la formulación o la administración de los compuestos



de la presente invención. Diferentes polimorfos pueden también tener propiedades mecánicas diferentes (por ejemplo, diferente compresibilidad, compactabilidad o facilidad de fabricación en comprimidos) que pueden influir los resultados de la elaboración de comprimidos del fármaco y, por lo tanto, influir en la formulación del fármaco. Un polimorfo particular también puede presentar una tasa de disolución diferente en el mismo disolvente con respecto a otro polimorfo. Diferentes polimorfos también pueden tener diferente estabilidad física (conversión en estado sólido de un polimorfo metaestable a un polimorfo más estable) y química (reactividad). Un modo de realización de la presente invención contempla el polimorfo de forma I del fosfato del compuesto I, como se describe en esta memoria.

En los modos de realización de la presente invención, se contemplan polimorfos sencillos puros así como mezclas que comprenden dos o más polimorfos diferentes. Un polimorfo sencillo puro puede estar esencialmente libre de otros polimorfos.

Algunos modos de realización de la presente invención contemplan composiciones farmacéuticas que comprenden una o más de las sales del compuesto I o los polimorfos de dichas sales, como se han descrito en esta memoria, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los polimorfos se generaron a partir de disoluciones concentradas de fosfato del compuesto I. Las disoluciones concentradas pueden estar en el intervalo de 60 a 100 mg de fosfato del compuesto I por mL de disolución. En un modo de realización, se puede disolver aproximadamente 70 mg del compuesto I en 1 mL de ácido fosfórico.

Los cristales del polimorfo pueden precipitar en un disolvente por varios métodos, incluyendo, por ejemplo, evaporación lenta, enfriamiento de una disolución supersaturada, precipitación en anti-disolventes, etc., que son conocidos por los expertos en la técnica. En un modo de realización, los cristales de polimorfo se generan añadiendo la disolución a un anti-disolvente. El anti-disolvente puede ser agua con acetonitrilo (ANC), etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, THF, acetato de etilo, hexano, cloruro de metileno (CH_2Cl_2), alcohol isopropílico (IPA), metil etil cetona (MEK) y dioxano. En un modo de realización, se puede añadir un disolvente adicional (por ejemplo, metanol). En otro modo de realización, se dejan reposar las muestras durante la noche antes de eliminar los cristales. En todavía otro modo de realización, se dejan reposar las muestras durante tres días antes de eliminar los cristales.

Los cristales se pueden caracterizar usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo PXRD, gravimetría de absorción de humedad dinámica, calorimetría de barrido diferencial, análisis gravimétrico térmico y microscopía óptica. Estas técnicas se describen a continuación.

54

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para suministrar los compuestos de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Dichas composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995).

La elección de un excipiente farmacéuticamente aceptable dependerá en gran medida de factores tales como el modo de administración particular, el efecto del excipiente en la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación. Ejemplos de excipientes incluyen, pero sin limitarse a ellos, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Los vehículos y excipientes para la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden el compuesto I son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N° 6.573.293, que se incorpora en esta memoria en su totalidad. Los métodos de administración para tales composiciones también son conocidas en la técnica y también se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N° 6.573.293. También se podrían utilizar métodos similares para formular y administrar composiciones farmacéuticamente aceptables de las sales del compuesto I, o los polimorfos de tales sales, de esta invención.

La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida. Para inyección, los compuestos de la presente invención se pueden formular en disoluciones acuosas, preferiblemente en disoluciones tampón fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer o disolución tampón salina fisiológica. Para administración transmucosa, se usan en la formulación fluidos penetrantes apropiados a la barrera que se tiene que atravesar. Tales fluidos penetrantes se conocen generalmente en la técnica. Para la administración parenteral, por ejemplo por inyección en bolo o infusión continua, las formulaciones se pueden presentar en formas de dosificación unitarias, tales como en ampollas o en contenedores multi-dosis. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización o dispersión.

Los compuestos de la invención se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Los medios adecuados para la administración parenteral incluyen intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular,

SS

intrasinofrasco y subcutánea. Los dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores con aguja (incluyendo microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión. Las formulaciones parenterales típicamente son disoluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes estabilizadores de pH (preferiblemente ajustados a un pH de 3 a 9), pero para algunas aplicaciones pueden formularse de manera más adecuada como una disolución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril sin pirógenos. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos de la presente invención en un vehículo lipofílico. Los vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo y los triglicéridos, o sustancias tales como los liposomas.

Los compuestos de la invención se pueden administrar oralmente. La administración oral puede implicar la deglución, de tal forma que el compuesto entre en el tracto gastrointestinal y/o la administración bucal, lingual o sublingual por medio de la cual el compuesto entra en la corriente sanguínea directamente desde la boca. Para la administración oral, los compuestos se pueden formular combinando los compuestos de la presente invención con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen sistemas sólidos, semisólidos y líquidos, tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi- o nano-partículas, líquidos o polvos; pastillas para chupar (incluyendo las rellenas de líquido); chicles; geles; formas de dosificación que se dispersan rápidamente; películas; óvulos; pulverizadores; y parches bucal/muco-adhesivos.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía tópica, de forma (intra)dérmica o transdérmica, a la piel o la mucosa. Las formulaciones típicas para este fin incluyen geles, hidrogeles, lociones, disoluciones, cremas, pomadas, polvo fino, apósitos, espumas, películas, parches cutáneos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendajes y microemulsiones. También se pueden usar liposomas. Los vehículos típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Pueden incorporarse potenciadores de la penetración -véase, por ejemplo, *J. Pharm. Sci.*, 88 (10), 955-958, de Finnin y Morgan (octubre de 1999). Otros medios de administración tópica incluyen el suministro por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis e inyección con microagujas o sin agujas (por ejemplo, Powderject™, Bioject™, etc.).

Los compuestos de la presente invención se pueden formular para la administración rectal, tales como supositorios o enemas de retención, utilizando, por

ejemplo, bases convencionales de supositorios, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Los compuestos de la presente invención también pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas.

5 Los modos de realización de la presente invención también contemplan un método para la modulación de la actividad catalítica de una PK que comprende poner en contacto dicha PK con una o más de las sales del compuesto I o los polimorfos de dichas sales de la presente invención. Este "poner en contacto" se puede llevar a cabo *in vitro*, por ejemplo, en un tubo de ensayo, una placa de Petri o similares. En un tubo
10 de ensayo, poner en contacto puede implicar sólo un compuesto y una PK de interés o puede implicar células enteras. Las células también se pueden mantener o cultivar en placas de cultivo celular y ponerlas en contacto con un compuesto en ese medio. En este contexto, la capacidad de un compuesto particular para afectar un trastorno relacionado con una PK, es decir, la CI_{50} del compuesto, definida a continuación, se
15 puede determinar antes de intentar utilizar los compuestos *in vivo* con organismos vivos más complejos. Para las células fuera del organismo existen numerosos métodos, y son bien conocidos por los expertos en la técnica, para poner en contacto las PK con los compuestos incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la microinyección celular directa y numerosas técnicas de vehículos transmembranales.

20 Los modos de realización de la presente invención contemplan un método para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con una proteína cinasa en un organismo (por ejemplo, un animal de compañía o un humano) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una o más sales del compuesto I, o los polimorfos de dichas sales de la presente
25 invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable al organismo.

En un modo de realización de la presente invención, el trastorno relacionado con la proteína cinasa se elige entre el grupo que consiste en un trastorno relacionado con una tirosina cinasa receptora, un trastorno relacionado con una tirosina cinasa no receptora y un trastorno relacionado con una serina-treonina cinasa. En otro modo de
30 realización de la presente invención, el trastorno relacionado con la proteína cinasa se elige entre el grupo que consiste en un trastorno relacionado con un EGFR, un trastorno relacionado con un PDGFR, un trastorno relacionado con un IGFR y un trastorno relacionado con una FLK.

La proteína cinasa receptora cuya actividad catalítica está modulada por un
35 compuesto de esta invención se elige entre el grupo que consiste en EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4,

57

KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R y FGFR-4R. La tirosina cinasa celular cuya actividad catalítica está modulada por un compuesto de esta invención se elige entre el grupo que consiste en Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr e Yrk. La seronina treonina proteína cinasa cuya actividad catalítica está modulada por un compuesto de esta invención se elige entre el grupo que consiste en CDK2 y Raf.

En todavía otro modo de realización de la presente invención, el trastorno relacionado con una proteína cinasa se elige entre el grupo que consiste en carcinoma de células escamosas, astrocitoma, sarcoma de Kaposi, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar de células pequeñas, glioma, cáncer colorrectal, cáncer genitourinario, cáncer gastrointestinal, mastocitosis y tumores de mastocitos. En un modo de realización de la presente invención, el trastorno relacionado con una proteína cinasa se elige entre el grupo que consiste en diabetes, un trastorno autoimmune, un trastorno de hiperproliferación, restenosis, fibrosis, psoriasis, enfermedad de von Heppel-Lindau, osteoartritis, artritis reumatoide, angiogénesis, un trastorno inflamatorio, un trastorno inmunológico y un trastorno cardiovascular.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su utilización en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad suficiente para lograr el objetivo pretendido, es decir la modulación de la actividad de las PK o el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con una PK.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está suficientemente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, sobre todo a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos de la invención, la cantidad o la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de los análisis en los cultivos celulares. Luego, la dosis se puede formular para su utilización en modelos animales de forma que se obtenga un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar entonces para determinar de forma más precisa las dosis útiles en humanos o animales de compañía.

En la práctica, la cantidad del compuesto que debe administrarse varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, administrándose dicha dosis total de una sola vez o en dosis divididas. La cantidad de

una composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que va a ser tratado, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico o el veterinario que prescribe, etc. En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la
5 concentración plasmática y se pueden emplear otros procedimientos conocidos en la técnica para determinar la cantidad e intervalo de dosificación correcta.

Los modos de realización de la presente invención también contemplan un método para tratar el cáncer en animales de compañía que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una o más sales del compuesto I o los
10 polimorfos de dichas sales de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, se contempla que las sales del compuesto I o los polimorfos de dichas sales, como se describe en esta memoria, se metabolizarían por las enzimas en el cuerpo de un organismo, tal como un animal de compañía o un ser humano, para
15 generar un metabolito que puede modular la actividad de las proteína cinasas. Tales metabolitos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de la invención se pueden administrar solos o combinados con otro u otros compuestos distintos de la invención, o combinados con uno o más fármacos (o como cualquiera de sus combinaciones). También se contempla que las
20 sales del compuesto I y los polimorfos de dichas sales, como se describe en esta memoria, se puedan combinar con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención se puede combinar con fluorouracilo solo o en combinación adicional con leukovorina u otros agentes alquilantes. Un compuesto de la
25 presente invención se puede utilizar combinado con otros agentes quimioterapéuticos antimetabolitos, tales como, pero sin estar limitados a ellos, análogos del ácido fólico o análogos de la purina. También se puede usar un compuesto combinado con agentes quimioterapéuticos basados en productos naturales, agentes quimioterapéuticos antibióticos, agentes quimioterapéuticos enzimáticos, complejos de coordinación de platino y hormonas y antagonistas de las hormonas. También se contempla que un
30 compuesto de la presente invención se pueda usar combinado con mitoxantrona o paclitaxel para el tratamiento de cánceres de tumor sólido o leucemias.

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la materia, usando la descripción precedente, puede poner en práctica la presente invención en su mayor
35 extensión. Los siguientes ejemplos detallados describen cómo preparar los diversos compuestos y/o realizar los diversos procedimientos de la invención, y deben

interpretarse como meramente ilustrativos, en absoluto como limitaciones de la descripción precedente en modo alguno. Los expertos en la técnica reconocerán en seguida variaciones apropiadas de los procedimientos tanto para los agentes reaccionantes como para las condiciones y técnicas de reacción.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis del compuesto I, es decir (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-(5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-3-ilidenometil)-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

10 Como se describe en patente estadounidense 6.574.293 (ejemplo 129) se condensó 5-fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona con (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico para dar el compuesto I.

Procedimiento de aumento proporcional. Se mantuvieron a reflujo durante 4,5 horas ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (61 g), 5-fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona (79 g), etanol (300 mL) y pirrolidina (32 mL). Se añadió ácido acético (24
15 mL) a la mezcla y se continuó el reflujo durante 30 minutos. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se recogieron los sólidos por filtración a vacío y se lavaron dos veces con etanol. Se agitaron los sólidos durante 130 minutos en acetona al 40% en agua (400 mL) que contenía ácido clorhídrico 12N (6,5 mL). Se recogieron los sólidos por filtración a vacío y se lavaron dos veces con acetona al 40% en agua. Se secaron
20 los sólidos a vacío para dar el ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (86 g, rendimiento 79%) como un sólido naranja.

Se agitaron ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (1,00 g) y dimetilformamida (500 mL) y se añadieron
25 hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (221 g), 1-(2-aminoetil)pirrolidina (45,6 g) y trietilamina (93 mL). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aisló el producto sólido mediante filtración a vacío y se lavó con etanol. Los sólidos se lavaron en lechada por agitación en etanol (500 mL) durante una hora a 64°C y se enfriaron a temperatura ambiente. Los sólidos se recogieron por
30 filtración a vacío, se lavaron con etanol y se secaron a vacío para dar la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (101,5 g, rendimiento 77%).

35

Ejemplo 2. Síntesis de las sales del compuesto I

Ejemplo 2A. Fosfato del compuesto I

Se pusieron 2,67 mmoles del compuesto I en un matraz con 40 mL de ácido fosfórico 0,092M (aproximadamente un exceso molar de 40% suponiendo una sal 1:1) y 40 mL de isopropanol. Luego se añadió de forma continua acetonitrilo a la disolución acuosa en alícuotas de 30 mL a medida que se sometía la disolución a rotavapor a 60°C para eliminar el agua. En total se utilizaron 120 mL de acetonitrilo para eliminar el agua de la disolución. Los cristales se filtraron y se secaron al aire. Los cristales presentaban fluidez libre y color naranja. Se recogieron 1,09 gramos con un rendimiento de 83%.

Ejemplo 2B. Citrato del compuesto I

Se pusieron 2,64 mmoles del compuesto I en un matraz con 34 mL de ácido cítrico 0,1M (3,4 mmoles) y 35 mL de metanol. Esta disolución se sometió a rotavapor a 50°C. La reducción de volumen de esta disolución produjo cristales de cristalinidad pobre, por lo que se añadieron 20 mL de isopropanol y 10 mL de metil etil cetona para disolver el sólido. Esta mezcla se introdujo en el rotavapor a 60°C y se produjeron cristales de color naranja. Los cristales se filtraron y se secaron al aire. El rendimiento de este proceso fue de aproximadamente 60% y se podría haber mejorado reduciendo el volumen de disolvente adicionalmente antes de la filtración.

Ejemplo 3. Propiedades físicas de las sales del compuesto I

Métodos. El ensayo para determinar las propiedades físicas de las sales del compuesto I incluyó la determinación del punto de fusión, pureza por HPLC, difracción de rayos X en polvo y gravimetría de absorción de humedad dinámica.

Difracción de rayos X en polvo (PXRD). Se realizó la XRD en polvo utilizando un sistema de difracción avanzado Scintag X2 (lab 259-1088, controlado mediante los programas Scintag DMS/NT 1.30a y Microsoft Windows NT 4.0. El sistema usa una fuente de rayos X de cobre (45 kV y a 40 mA) para proporcionar emisión $\text{CuK}\alpha_1$ de 1,5406 Å y un detector de estado sólido de peltier enfriado. La apertura del haz se controló utilizando rendijas de divergencia del tubo y antidispersión de 2 y 4 mm y rendijas antidispersión del detector y de recepción de 0,5 y 0,2 mm de anchura. Los datos se recogieron para ángulos dos-theta de 2 a 35° utilizando un barrido por etapas de 0,03°/etapa con un tiempo de medida de un segundo por etapa. Para los experimentos se utilizaron portamuestras Scintag redondos de carga superior y de acero inoxidable con inserciones de 9 mm de diámetro. Los polvos se pusieron en el portamuestras y se presionaron suavemente mediante una lámina de vidrio para

asegurar la coplanaridad entre la superficie de la muestra y la superficie del portamuestras.

Gravimetría de absorción de humedad dinámica (DMSG). Se midió la isoterma por DMSG en una microbalanza atmosférica de temperatura controlada. Se colocaron aproximadamente muestras de 10 mg en el contenedor de muestras de la balanza. Se varió secuencialmente la humedad desde humedad relativa normal (RH) a 0% de RH y luego se aumento hasta 90% de RH seguido por una disminución de la RH hasta 0% otra vez en etapas de 3% de RH. Luego se midió la masa cada dos minutos. La RH se cambió al siguiente valor cuando la variación de masa de la muestra fue menor que 0,5 Dg en 10 minutos. Se utilizó el programa Visual Basic dmsgscn2.exe para controlar la recogida de datos y exportar la información a una hoja de cálculo Excel.

Resultados. La tabla 1 muestra un resumen de los datos para las sales del compuesto I ascorbato, citrato, fumarato, hidrocloreuro y fosfato. Los análisis por HPLC sugirieron que las sales eran de relativamente alta pureza y que no se indujo ningún cambio significativo en la pureza durante el procedimiento de formación de la sal.

Tabla 1. Resumen de las sales sintetizadas para el compuesto I

Contraíón	Sal cristalizada	Punto de fusión (°C)	% de agua a 80% de RH	pureza por HPLC*	% de isómero*
ninguno (base)	NA	257	~1%	97,8	0,63
hidrocloreuro	Si	96	~20%	97,7	2,29
fumarato	Si	NA	~9%	97,3	1,96
Citrato	Si	181	~3,8%	98,2	1,38
fosfato	Si	288	~1%		
ascorbato	Si	245	~6,5%		

* porcentaje del área bajo los picos en el HPLC

Las sales de hidrocloreuro, fumarato y ascorbato fueron muy higroscópicas (véase figura 1). Las otras dos sales (citrato y fosfato) tenían perfiles de absorción de humedad menores, absorbiendo menos de 3% de agua a 70% de humedad relativa.

Los patrones de rayos X en polvo indicaron que las sales de fosfato y citrato presentaban una cristalinidad relativamente alta. (véanse las tablas 2 y 3 y la figura 2).

Tabla 2. Picos por PXRD del fosfato del compuesto I

Ángulo dos-theta* (grados)	Intensidad relativa** (unidades arbitrarias)
11,1	23,5
11,75	24,0
11,6	19,9
12,0	8,9
13,0	22,0
14,0	25,9
14,5	7,0
15,4	15,0
16,5	7,5
17,2	27,7
17,8	9,5
18,3	16,6
19,4	11,6
19,6	11,2
19,8	9,8
20,8	58,2
21,6	11,8
22,0	9,5
22,7	9,2
22,9	12,4
23,2	12,8
23,4	10,3
24,4	48,8
25,8	30,4
27,0	100,0
29,2	7,4
29,2	7,4
33,5	5,1

5

*: $\pm 0,1$

** : La intensidad relativa para cada pico se determinó normalizando su intensidad a la del pico más intenso a un ángulo de $27,0^\circ$ considerada como 100

Tabla 3. Picos por PXRD del citrato del compuesto I

Ángulo dos-theta* (grados)	Intensidad relativa* (unidades arbitrarias)
3,2	20,4
7,3	17,7
9,2	14,4
9,5	39,1
10,8	9,5
12,7	23,5
13,2	19,6
14,3	23,5
14,8	16,7
15,9	11,3
17,2	8,3
17,8	11,9
18,2	19,8
18,3	19,5
19,6	6,8
20,9	11,1
21,6	8,9
21,7	10,5
21,8	8,9
23,2	13,2
24,2	20,3
24,9	15,9
25,5	100,0
26,4	20,9
26,8	26,5
27,1	10,8
32,0	6,3
34,4	8,1

5

*: $\pm 0,1^\circ$

* *: La intensidad relativa para cada pico se determinó normalizando su intensidad a la del pico más intenso a un ángulo de $25,5^\circ$ considerada como 100.

10

Ejemplo 4. Preparación y caracterización del fosfato del compuesto I

Ejemplo 4A. Preparación del fosfato del compuesto I

Se utilizó la base libre del compuesto I para preparar la sal de fosfato. Se preparó una muestra (número de lote 35282-CS-51) del fosfato del compuesto I como se ha descrito anteriormente. Se añadieron 4 mL de ácido fosfórico 0,977M a 1,095 g de base libre en un matraz, seguido inmediatamente por la adición de 4 mL de acetonitrilo. Se obtuvo una suspensión. La suspensión se calentó suavemente en una placa calefactora. Añadiendo 40 mL de agua y calentado con agitación durante una hora no se logró disolver completamente el sólido. El sólido se filtró y se lavó con 10 mL de acetonitrilo. Los resultados por PXRD demostraron que era la sal de fosfato del compuesto I.

Ejemplo 4B. Caracterización del fosfato del compuesto I

El lote 35282-CS-51 se denominó polimorfo de forma I del fosfato del compuesto I. Presentaba cristalinidad elevada, buena fluidez y tamaño cristalino grande. Tanto la ausencia de fusión a la temperatura de fusión de la base libre del compuesto I (polimorfo de la base libre de forma A, 256°C; polimorfo de la base libre de forma B, 259°C) y la presencia de puntos de fusión elevados (281-297°C) de los sólidos sugirieron que los cristales del lote 35282-CS-51 eran una sal diferente y no la base libre del compuesto I. La pureza del lote fue de 99.6% por HPLC.

Ejemplo 4C. Cálculo aproximado de la solubilidad del fosfato del compuesto I

Se transfirieron muestras de 1-2 mg del fosfato del compuesto I (lote 35282-CS-51) en frascos de vidrio de 10 mL (aforados) y se pesaron (precisión de 0,1 mg). Se añadieron los disolventes a los frascos (un disolvente en cada frasco) en etapas, añadiendo 0,5 mL de disolvente en cada etapa. Los disolventes utilizados fueron disolución tampón (pH = 2), disolución tampón (pH = 5), agua, metanol, tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo y acetona. Después de cada adición, se tapó el frasco y se agitó. Se observó visualmente la disolución del sólido. Si no se observó disolución evidente se añadió inmediatamente más disolvente. Si la disolución fue evidente, el frasco se dejó reposar durante al menos 30 minutos antes de la siguiente adición de disolvente. Esta etapa se repitió hasta que no hubo cristales visibles frente a un fondo blanco y negro. Entonces se determinó el intervalo de solubilidad dividiendo el peso del compuesto por el volumen final y el volumen antes de la última adición. Si aún seguía habiendo sólido después de la adición de 10 mL de disolvente, se expresó la solubilidad como menor que el peso dividido por el volumen final. Si el sólido se disolvió

completamente después de la primera adición de disolvente, se expresó la solubilidad como mayor que el peso dividido por el volumen de disolvente. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Las solubilidades calculadas del fosfato del compuesto I en varios disolventes se presentan en la tabla 4 junto con las solubilidades de la base libre, expresadas como mg/mL. La solubilidad del fosfato del compuesto I es menor que la de la base libre del compuesto I en el mismo disolvente, excepto en agua (para varios niveles de pH). La solubilidad del fosfato del compuesto I depende del valor del pH de la disolución y se hace considerablemente mayor (> 3 mg/mL) a pH 2 o inferior. El punto de fusión del fosfato del compuesto I (lote 35282-CS-51) es de aproximadamente 281-297°C, que es esencialmente mayor que el punto de fusión de la base libre del compuesto I (polimorfo de la base libre de forma A, 256°C; polimorfo de la base libre de forma B, 260°C). Un resultado importante es que la humectabilidad del fosfato del compuesto I con agua es mucho mejor que la de la base libre del compuesto I.

Tabla 4. Solubilidad calculada de la base libre del compuesto I y del fosfato de la base I en varios disolventes a 23°C.

	Disolvente	Solubilidad de la base libre del compuesto I (polimorfo de forma A) (mg/mL)	Solubilidad del fosfato del compuesto I (mg/mL) ^d
1	Disolución tampón (pH = 2) ^a	3,11	5,9-7,4
2	Disolución tampón (pH = 5) ^a	0,005	
3	Agua	NA ^c	~0,29 ^e (algunas partículas se quedaron adheridas a la pared del frasco y no se disolvieron)
4	Metanol	0,21-0,31	~0,14
5	THF	0,32-0,4	<<<0,19
6	Acetonitrilo	<< 0,08	<<< 0,13
7	Acetona	<< 0,16	<<< 0,2

^a La disolución tampón de pH = 2 se prepara con HCl y KCl.

^b La disolución tampón de pH = 5 se prepara con ftalato ácido de potasio e hidróxido de sodio.

^c No disponible, pero se espera que sea $< 0,005$ mg/mL.

^d 1 g del fosfato del compuesto I es equivalente a 0,802 g de la base libre del compuesto I.

^e El valor final del pH de la disolución es 4,91.

5 Ejemplo 5. Generación de los polimorfos del fosfato del compuesto I.

Las bajas solubilidades del fosfato del compuesto I observadas en el ejemplo 4C indican que las disoluciones de fosfato del compuesto I altamente concentradas (60-100 mg/mL, naranja oscuro-rojo) serían buenas para precipitar los polimorfos del fosfato del compuesto I a partir de varios disolventes. Se prepararon dichas

10 disoluciones concentradas disolviendo la base libre del compuesto I en ácido fosfórico aproximadamente 1M. Por ejemplo, se podrían disolver 70 mg de base libre del compuesto I en 1 mL de ácido fosfórico 1M. Sin embargo, la cantidad de la base libre del compuesto I y de ácido fosfórico depende de la concentración deseada y del tamaño de lote de la disolución. En el ejemplo en el que el precipitado se filtró a vacío

15 inmediatamente después de la precipitación, aproximadamente 1 mL de la disolución deseada se vertió entonces en aproximadamente 10 mL de diez disolventes para precipitar los cristales de la sal. Estos disolventes fueron agua con acetonitrilo (ANC), etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, THF, acetato de etilo, hexano, cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y alcohol isopropílico (IPA). En el ejemplo en el que el precipitado se

20 filtró a vacío después de dejarlo reposar durante la noche o durante tres días, se utilizaron metil etil cetona (MEK) y dioxano como disolventes adicionales. Algunos disolventes orgánicos, por ejemplo acetato de etilo, hexano y CH_2Cl_2 , no son miscibles con agua y se observaron dos fases de disolventes. Solo se observó una pequeña precipitación en la interfase incluso minutos después de la adición. En estos casos, se

25 añadió 1 mL de metanol como disolvente puente para aumentar la miscibilidad entre las dos fases. Parece que el metanol sirvió para aumentar la miscibilidad porque la fase orgánica incolora se volvió amarilla tan pronto como se añadió el metanol. El frasco se agitó entonces vigorosamente a mano durante aproximadamente un minuto. Los sólidos que precipitaron en los disolventes orgánicos se filtraron a vacío bien

30 inmediatamente después de la precipitación (en 20 minutos) o bien después de reposar durante la noche o durante tres días, con el fin de aislar los polimorfos tanto estables como metaestables. El polvo se analizó entonces. Los diferentes sólidos se numeraron siguiendo el orden de su descubrimiento.

Ejemplo 6. Caracterización de los polimorfos del fosfato del compuesto I.

Ejemplo 6A: Métodos de caracterización

Todos los polvos obtenidos mediante los procedimientos de muestreo de polimorfos anteriores se analizaron por PXRD, como se ha descrito en el ejemplo 3 anterior. Cuando se observó un patrón de PXRD nuevo, se utilizaron también técnicas complementarias para caracterizar los sólidos, incluyendo gravimetría de absorción de humedad dinámica (también descrita en el ejemplo 3), calorimetría de barrido diferencial, análisis térmico gravimétrico (si es necesario) y microscopía óptica.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Los datos de DSC se obtuvieron utilizando un calorímetro DSC (TA Instruments 2920). Se puso el polvo (1-5 mg) en un recipiente de DSC. Se colocó una tapa de aluminio sobre la cazoleta y se selló. La cazoleta sellada se colocó en el célula de muestra junto con una cazoleta vacía como referencia. Se aumentó la temperatura a 300 o 350°C desde 30°C a una tasa de 10°C/min a menos que se especifique de otro modo.

Termogravimetría (TGA). Los experimentos de TGA se realizaron utilizando un analizador de alta resolución (TA Instruments modelo 2950). Se utilizó el programa TA Instruments Thermal Solutions™ para NT (versión 1.3L) para la recogida de datos y Universal Analysis™ para NT (versión 2.4F) para el análisis de los datos. Se colocaron las muestras (5-10 mg) en una cazoleta de aluminio que se colocó posteriormente sobre un recipiente de pesada de platino antes de calentarlo. Los pesos de los recipientes de aluminio y de platino se determinaron antes de cargar las muestras. La temperatura se aumentó de 30°C a 300°C linealmente con una tasa de 10°C/min. Se utilizó una purga de nitrógeno.

Microscopía con luz polarizada. El estudio microscópico se realizó usando un microscopio con luz polarizada Olympus BHSP. Se puso en suspensión el polvo en aceite de silicona y se dispersó entre un portamuestras para microscopía y un cubreobjetos. Antes de la observación, el cubreobjetos se frotó suavemente contra el portamuestras para obtener una buena dispersión de las partículas.

Ejemplo 6B. Caracterización inmediatamente después de precipitación

Los resultados se resumen en la tabla 5. La precipitación se produjo tan pronto como la disolución ácida se mezcló con los anti-disolventes. Al principio, los precipitados fueron coloidales. En general, los colores fueron amarillo o naranja claro. El sólido resultante era pegajoso. La observación microscópica de estos sólidos mostró que estaban constituidos por partículas muy pequeñas con muy buena birrefringencia bajo luz polarizada. Se observaron al menos seis patrones de PXRD

diferentes en los sólidos obtenidos a partir de nueve sistemas disolventes. (Véase figura 3). La cadena lateral amida de esta molécula es flexible y toma diferentes conformaciones en forma **B** de la base libre y en su sal de hidrocloreuro. Por lo tanto, la molécula en las diferentes formas sólidas puede tener polimorfos conformacionales.

5 Los patrones de PXRD de los sólidos precipitados en acetato de etilo, hexano e IPA parecen ser los mismos. Sin embargo, una comparación detallada con otros patrones de PXRD fue difícil de realizar debido a la baja señal de difracción de los sólidos obtenidos en estos tres disolventes. Consecuentemente, no se asignaron como una forma nueva. El precipitado en metanol es el mismo que el del lote de referencia

10 35282-CS-51 (denominado forma I). Los datos por TGA de todos los precipitados indicaron disolvente residual a un nivel de 1,7-4,7%. De estos sólidos, el precipitado en CH_2Cl_2 parecía ser un sólido que retuvo disolvente en los cristales. La curva de TGA mostró una disminución brusca en el peso de la muestra a una temperatura de aproximadamente 125°C (véase la figura 4). Este fenómeno se recoge como una

15 endoterma a aproximadamente la misma temperatura por DSC. Además, este polvo estaba constituido por cristales de morfología bien definida y presentaba fluidez libre, una propiedad muy diferente de los otros lotes de precipitados. El polvo presentaba una cristalinidad media por PXRD pero buena cristalinidad cuando se observó con el microscopio con luz polarizada. Otros lotes estaban constituidos por cristallitos muy

20 pequeños. Sobre la curva de DSC de estos polvos, se observó una endoterma ancha y aplanada tan pronto como se cargó la muestra en la célula portamuestras. Esta observación se refleja por TGA como una pérdida de peso gradual desde el principio del calentamiento para la TGA. Por lo tanto, para estos lotes, los disolventes residuales fueron probablemente la fuente de disolventes adsorbidos y no hubo disolventes en la

25 red cristalina.

Tabla 5. Caracterización física de los sólidos aislados inmediatamente después de precipitación

Nombre asignado al patrón de PXRD	Disolvente orgánico	Cristalinidad por PXRD	Observación al microscopio	TGA % de pérdida de peso ^a	Fenómenos térmicos por DSC (°C) ^b	Color del sólido	Fluidez libre (S = sí; N = no)
Forma I	Agua + ACN	Alta	Irregular	0,3	296	Naranja	S
Forma II	EtOH	Pobre	Agregado ^e	2,5	81 ^c , 226, 293	Amarillo	N (pegajoso)
Forma I	MeOH	Alta	Irregular	1,7	298	Naranja-rojo	S
Forma III	Acetona	Media	Agregado ^e	2,5	88 ^c , 155, 222, 228, 286	Amarillo	N (pegajoso)
Forma IV	Acetonitrilo (ACN)	Alta	Agregado ^e	2,9	97 ^c , 142, 156, 172, 227, 230, 281	Amarillo	N (pegajoso)
Forma V	THF	Alta	Agregado ^e	2,5,	82 ^c , 161, 175, 227, 292	Amarillo	N (pegajoso)
ND ^f	Acetato de etilo	Pobre	Partículas finas	4,7	98 ^c , 196, 222	Naranja claro	N (pegajoso)
ND ^f	Hexano	Pobre	Agregado ^e			Naranja claro	N (pegajoso)
Forma VI ^g	CH ₂ Cl ₂	Media	Placa + grano uniforme + fino	3,3	123 ^c , 164, 228, 296	Naranja-rojo	S
ND ^f	IPA	Pobre	Agregado ^e	1,9	76 ^c , 222, 229, 296	Amarillo	N (pegajoso)

^a Pérdida de peso hasta 160°C. ^b Por claridad, las temperaturas listadas en la tabla son solo temperaturas de pico. ^c Temperaturas de pico de un fenómeno de endoterma ancha a partir de la temperatura inicial de una medida por DSC. Estos fenómenos también se reflejan por TGA por una pérdida de peso gradual. Este tipo de fenómeno térmico es típico de pérdida de disolvente adsorbido en la superficie. ^d Temperaturas de pico de un fenómeno de endoterma relativamente bien marcado por DSC. Este fenómeno también se registra por TGA como una pérdida repentina de peso al correspondiente pico de temperatura. Este tipo de fenómeno térmico es típico de desolvatación de un solvato. ^e Los agregados están constituidos por partículas muy finas. ^f ND significa que no se puede asignar una forma concreta porque la baja señal de los picos de difracción de los correspondientes patrones de PXRD impide una comparación detallada con los patrones de PXRD de otras formas.

Ejemplo 6C. Precipitación después de reposo durante tres días en el disolvente

Estos resultados se resumen en la tabla 6. Después de un tiempo de reposo de hasta tres días en el disolvente apareció una nueva fase sólida de color naranja-rojo y poco ligera. Los precipitados ligeros obtenidos en todos los disolventes orgánicos, excepto el precipitado en metanol, se transformaron. Aparentemente, los sólidos que precipitaron inmediatamente después de la precipitación eran metaestables en estos casos, por lo que se convirtieron en una forma más estable (forma I) a lo largo del tiempo. Parece ser que esta conversión se completó en un par de horas en la mayoría de los sistemas disolventes. Sin embargo, se permitió que reposaran durante un periodo de tiempo mucho mayor para asegurar la finalización del proceso con el fin de evitar recoger una mezcla de dos formas sólidas. La curva de TGA mostró una pérdida brusca de peso a aproximadamente 124°C y 153°C para los sólidos obtenidos en hexano y acetonitrilo respectivamente, acoplada con una endoterma a similar temperatura por DSC. Por lo tanto, parece que también contenían disolvente retenido en la red cristalina. Las estequiometrias de los disolventes retenidos son de aproximadamente 0,6 para el acetonitrilo y aproximadamente 0,14 para el hexano. Después de reposar durante tres días en el acetonitrilo crecieron cristales con forma de aguja. Los patrones de PXRD del sólido con acetonitrilo retenido eran únicos, mientras que el patrón de PXRD del solvatado con hexano es similar a al del sólido que retiene CH_2Cl_2 que se ha identificado anteriormente (véase figura 3). Ambos sólidos que retienen disolvente (hexano y acetonitrilo) perdieron peso en el recipiente de TGA. Se observaron patrones de PXRD únicos para ambos sólidos después de que el correspondiente disolvente retenido se eliminó por calentamiento (tabla 7, figura 3), lo que indica que la eliminación de las moléculas de disolvente de los sólidos produjo cambios estructurales en los cristales del solvato (por lo tanto, las moléculas de disolvente estaban en la red cristalina y no simplemente sobre las superficies del cristal). Sin embargo, el patrón de PXRD del sólido desolvatado obtenido en acetonitrilo tenía una intensidad de señal pequeña. El perfil de DSC del sólido desolvatado cristalizado en acetonitrilo presentaba dos fenómenos térmicos adicionales a 74°C y 174°C en comparación con el perfil de DSC del solvatado con acetonitrilo, mientras que no se observó el fenómeno de desolvatación a 153°C. El enfriamiento de la muestra después de la desolvatación puede haber cambiado el sólido que presenta un cambio energético a 174°C.

Cuando se utilizaron otros disolventes orgánicos, los periodos de reposo más largos de los precipitados produjeron sólidos con el mismo patrón de PXRD que el de la forma I (lote 35282-CS-51) aunque la morfología de los cristales era diferente (tabla 6).

21

El mismo patrón de PXRD indicaba que dichos sólidos tenían la misma estructura de red cristalina. La diferente morfología debe deberse a efectos del disolvente. Es evidente que la forma I es el sólido más estable entre todos los polimorfos no solvatados descritos en esta memoria. Otras formas sin disolvente fueron metaestables y se transformaron en la forma I rápidamente cuando se pusieron en contacto con el disolvente. El sólido cristalizado en CH_2Cl_2 parecía fluir más fácilmente que el sólido cristalizado en hexano. La TGA, morfología y fluidez indicaron que eran dos sólidos diferentes.

Tabla 6. Caracterización física de los sólidos aislados después de diferentes periodos de reposo después de la precipitación

Nombre asignado al patrón de PXRD	Disolvente orgánico (periodo de reposo)	Cristalinidad por PXRD	Observación al microscopio	% de pérdida de peso ^a	Fenómenos térmicos por DSC (°C) ^b	Color del sólido	Fluidez libre (S = si; N = no)
Forma I	Agua + ACN	Alta	irregular	0.3	296	Naranja	S
Forma I	Acetato de etilo (durante la noche)	Alta	comprimidos			Naranja-rojo	S
Forma VII ^g	Hexano (durante la noche)	Media	placas	2.4	124 ^c , 228, 295	Naranja-rojo	N
Forma I	IPA (durante la noche)	Alta	grano uniforme (25 μ m) + fino	0.4	297	Naranja-rojo	S
Forma I	CH ₂ Cl ₂ (durante la noche)	Alta	grano uniforme (25 μ m) + fino	0.6	293	Naranja-rojo	S
Forma I	EtOH (3 días)	Alta	Agregado ^e			Naranja-rojo ^d	S
Forma I	Acetona (3 días)	Alta	placas			Naranja-rojo ^d	S
Forma VIII ^g	acetonitrilo (3 días)	Media	agujas	4.9	153 ^c , 229, 231, 239, 291	Naranja-rojo ^e	N
Forma I	THF (3 días)	Alta	punta de arpón	0.3	295	Naranja claro ^f	N
Forma I	MeOH (durante la noche)	Alta				Naranja-rojo	S
Forma I	MEK (durante la noche)	Alta	barras	0.6	297	Naranja	N
Forma I	Dioxano (durante la noche)	Alta	placas		295	Naranja	N

^a Pérdida de peso hasta 160°C por TGA. ^b Por claridad, las temperaturas listadas en la tabla son solo temperaturas de pico. ^c Temperaturas de pico de un fenómeno de endoterma relativamente bien marcado por DSC. Este fenómeno también se registró por TGA como una pérdida de peso repentina a la temperatura del pico correspondiente. ^d La conversión fue completa en 5 horas (de amarillo a naranja-rojo). ^e La conversión no fue obvia en 5 horas, pero fue prácticamente total en tres días (precipitado suelto amarillo a cristales bien formados con forma de aguja de aguja de color naranja-rojo). ^f La conversión fue completa en cinco horas. El cambio de color no fue evidente (de amarillo a naranja claro). ^g Las formas VII y VIII son sólidos que contienen disolvente.

Tabla 7. Caracterización física de los sólidos producidos después de desolvatación.

Nombre asignado al patrón de PXRD	Método de generación de los cristales	Cristalinidad por PXRD	Fenómenos térmicos por DSC (°C) ^b	Color del sólido
Forma IX	Desolvatación del solvato ACN	Pobre	74, 227230; 231, 239, 291	Naranja
Forma X	Desolvatación del solvato hexano	Media		Naranja

Ejemplo 7. Inhibición de la fosforilación de la KIT en tumores de mastocitos caninos.

Objetivo. El desarrollo de terapias dirigidas para el cáncer ofrece la oportunidad de evaluar directamente los efectos del fármaco sobre la diana molecular y correlacionar estos efectos con la biología del tumor y la farmacocinética del fármaco. Esto puede ser eficaz en el desarrollo de fármacos en oncología porque establece una relación farmacodinámica/farmacocinética y proporciona información crítica con respecto al impacto terapéutico del agente dirigido. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de una dosis única del inhibidor de la tirosina cinasa receptora, fosfato del compuesto I, sobre la actividad de su diana molecular, KIT, en tumores de mastocitos (MCT) caninos, en pacientes caninos con MCT avanzados usando la fosforilación de la KIT como un marcador de la inhibición directa de la diana. También se estudió la fosforilación de las ERK1/2 (una proteína cinasa mitógeno-activada (MAPK) posteriormente a la señalización de la KIT), la concentración plasmática del fosfato del compuesto I y el estado mutacional del *c-kit* para determinar si estos parámetros se podían correlacionar con el estado de fosforilación de la KIT después del tratamiento con el fosfato del compuesto I.

Fármaco del estudio. El fosfato del compuesto I estuvo disponible en comprimidos marcados de 20 mg.

Diseño del estudio. Este estudio fue una comprobación del estudio de modulación dirigida en perros con MCT de grado II/III recurrente o metaestático. Los pacientes recibieron una dosis oral única de fosfato del compuesto I a razón de 3,25 g/kg. Usando un instrumento de biopsia con punzón de 6 mm, se obtuvieron muestras del tumor antes de la administración del fosfato del compuesto I y 8 horas (h) después del tratamiento. Se tomaron varias biopsias cuando fue posible. Cada muestra se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70° centígrados (C) antes del análisis. Las muestras de sangre para el análisis de los niveles plasmáticos de fosfato del compuesto I se obtuvieron al mismo tiempo que las biopsias del tumor (véase a continuación).

74

Niveles plasmáticos de fosfato del compuesto I. Se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular y se pusieron en un tubo de vidrio de recogida de suero a vacío con la parte superior roja. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente, se dejó que se coagularan, se centrifugaron a 1.500 rpm a 4°C durante 10 minutos, se transfirieron a frascos de criogenización y se congeló el plasma a -70°C hasta el análisis. Brevemente, las muestras de plasma (20 µL) o patrones de fosfato del compuesto I en plasma canino se mezclaron con metanol (200 µL) que contenía hidrocloreuro de DL-propranolol (patrón interno) en una placa de polipropileno de 96 pozos (Orochem Technology, Westmont, IL). La placa se mezcló con movimiento espiral durante 1 minuto y las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4.000 rpm. Se inyectaron 10 microlitros del sobrenadante en un sistema LC/MS/MS en el que se realizó la separación en una columna de cromatografía de líquidos de altas prestaciones en fase inversa BataBasic C-18 (5 µm, 100 X 4,6 mm) (Keystone Scientific, Foster City, CA). La cantidad de fosfato del compuesto I y el patrón interno de cada muestra de plasma canino se cuantificaron en función de las curvas de calibrado generadas utilizando cantidades conocidas del compuesto que iban de 0,2 a 500 ng/mL.

Análisis de la mutación del *c-kit*. En la mayoría de las muestras, se extrajo el ARN usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, se generó entonces el ADN-c a partir del ARN usando dNTPs, iniciadores aleatorio, disolución tampón 5X First Strand Buffer, DTT 0,1M y Taq polimerasa (todo ello de Promega, Madison, WI). Se cuantificó el ADN-c para cada muestra. Para las muestras restantes, se preparó el ADN genómico como se ha descrito previamente (Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F. y London, C. A. *Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-kit in mast cell tumors of dogs. Am. J. Vet. Res.*, 63: 1718-1723, 2002; que se incorpora como referencia en su totalidad). Para ambas reacciones se realizó la PCR durante 40 ciclos que consistían en 94°C (1 min), 59°C (1 min) y 72°C (1 min), con una extensión de 5 minutos a 72°C al final de la reacción. Como controles se usaron un ADN-c del *c-kit* generado a partir de la línea de mastocitos caninos C2 y un ADN-c generado a partir de cerebelo canino normal.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 4%; el producto esperado de la PCR del *c-kit* de fenotipo salvaje tiene un tamaño de 196 bp para la PCR del ADN-c y un tamaño de 190 bp para la PCR del ADN genómico. En aquellos casos en los que la ITD no era evidente (solo había un banda única), los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit Promega PCR Wizard Clean-Up

75

(Promega) y se secuenciaron usando bien iniciadores P1 (directo) y P5 o P2 (inverso) en las instalaciones de secuenciación de la Universidad de California-Davis para descartar la presencia de mutaciones ITD muy pequeñas, deleciones o mutaciones puntuales. El alineamiento de las secuencias y la comparación se realizaron utilizando el programa de análisis de secuencias DNASIS.

Análisis de la fosforilación de la KIT y ERK. Se congelaron las biopsias de tumor en nitrógeno líquido y se pulverizaron posteriormente utilizando un criomortero y mano enfriados por nitrógeno líquido, luego se almacenaron a -70°C hasta su utilización. Para el análisis de la KIT, los tumores pulverizados se homogeneizaron, lisaron e inmunoprecipitaron a partir de 1 mg de lisato de tumor inicial, como se ha descrito previamente (Abrams, T. J., Lee, L. B., Murray, L. J., Pryer, N. K., Cherrington, J. M. *SU 11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. Mol. Cancer Ther.* 2: 471-478, 2003; que se incorpora como referencia en su totalidad) utilizando un anticuerpo conjugado con agarosa para KIT (SC- 1493AC; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Cuando se disponía de varias biopsias, la inmunoprecipitación repetida/análisis de transferencia de Western se realizaron en biopsias separadas. La cantidad de KIT fosforilada en cada muestra se determinó por transferencia de Western utilizando un anticuerpo para la fosfotirosina 719 de KIT murina (3391; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), que corresponde a la tirosina 721 de la KIT canina y es un sitio de autofosforilación y, por lo tanto, un sustituto para la actividad cinasa de la KIT. Para el análisis total de la KIT, se pusieron en bandas las manchas, se volvieron a colocar en bloques y se volvieron a ensayar con anticuerpo para KIT (A-4542; DAKO Corp., Carpinteria, CA). Para el análisis de p42/44 ERK, los mismos lisatos de tumor utilizados para el análisis de la KIT se ensayaron por transferencia de Western con un anticuerpo para fosfo-Thr 202/Tyr 204 ERK1/2 (9101B; Cell Signaling Technology) y luego se pusieron en bandas y se volvieron a ensayar con un anticuerpo para la ERK total ERK (9102; Cell Signaling Technology). Se consideraron pares de biopsia de tumor evaluables para la KIT y ERK1/2 aquellos en los que había proteína total detectable en ambas biopsias del par. Se midió ocularmente la modulación dirigida por tres observadores y se relacionó con el estatus del JM y la concentración plasmática. Una reducción >50% en la señal de la fosfo-proteína con respecto a la señal de la proteína total en la muestra de biopsia tomada después del tratamiento se consideró como positiva para la modulación dirigida, mientras que una reducción <50% se consideró negativa.

Resultados. En este estudio clínico se utilizaron catorce perros con el objetivo principal de determinar si se produjo una reducción en la fosforilación de la KIT tirosina después de la administración de una dosis única de fosfato del compuesto I. Se evaluó la fosforilación de la KIT tirosina utilizando un anticuerpo fosfo-específico dirigido contra el sitio de autofosforilación en la KIT, sirviendo como sustituto de la actividad cinasa de la KIT. Además, se determinó el estado mutacional JM del *c-kit* (ITD+ o ITD-) a partir de la biopsia del tumor de la línea base y se midió la concentración plasmática del fosfato del compuesto I 8 horas después de la dosificación para correlacionar estos parámetros con la inhibición de la fosforilación de la KIT. Once de los 14 perros fueron evaluables con respecto a la modulación dirigida de la KIT. Los tres perros considerados no evaluables presentaban una proteína KIT total no detectable o disminuida de forma importante en una o ambas biopsias, por lo que no se pudo determinar la modulación dirigida. Los datos para todos los perros utilizados en este estudio se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Sumario de los datos para todos los pacientes

Número de paciente	Grado del tumor	Presencia de mutación ITD del <i>c-kit</i>	Niveles plasmáticos de fosfato del compuesto I después de la dosis (ng/mL)	Reducción de la P-KIT después de la dosis ^a	Reducción de la P-ERK1/2 después de la dosis
1	III	Si	81,0	Si	NO
2	III	Si	33,2	Si	NO
3	II	Si	83,5	NE	Si
4	III	Si	98,0	Si	Si
5	III	Si	116,0	Si	Si
6	III	NO	121,0	Si	Si
7	III	NO	186,0	NE	NE
8	III	NO	0,3	Si	NO
9	II	NO	103,0	NE	NE
10	II	NO	111,0	NO	Si
11	II	NO	158,0	NO	Si
12	II	NO	65,3	Si	Si
13	II	NO	95,4	NO	NO
14	III	NO	119,0	Si	NE

^a NE, no evaluable, P-KIT, fosfo-Tyr721 KIT, P-ERK1/2, fosfo-Thr202/Tyr204 ERK1/2

De los 14 perros analizados, 5 (36%) presentaban ITD por análisis de PCR (Fig.

5, Líneas 1-5); los cinco tumores tenían evidencia de una ITD. De forma interesante, el paciente 2 había perdido aparentemente el alelo *c-kit* de fenotipo salvaje. Los productos de la PCR de los nueve perros restantes que no presentaban evidencia de ITD (Fig. 5, Líneas 6-14) se secuenciaron directamente y ninguno presentó ningún tipo de mutación (inserción, delección o mutación puntual). Para las líneas 3, 6, 8 y 9 se utilizó ADN genómico para la reacción de PCR lo que produjo un producto de fenotipo salvaje ligeramente menor (190 bp).

El nivel de KIT total y fosforilado expresado en los MCT en la línea base varió de un animal a otro. Una mayor expresión de la KIT se correlacionó con un grado tumoral más elevado. Cuatro de los ocho tumores de grado III presentaban una expresión de la KIT alta, en comparación con uno de los seis tumores de grado II (Fig. 6). Por ejemplo, la expresión de la KIT total en el tumor del paciente 2 (grado II) fue considerablemente superior que la del tumor del paciente 11 (grado II). Los perros con tumores de grado II también tenían una mayor incidencia de niveles altos de KIT fosforilada en la línea base que aquellos con tumores de grado II, lo que es consistente con la frecuencia aumentada de mutaciones ITD del *c-kit* en tumores avanzados y, consecuentemente, niveles elevados de KIT fosforilada independientemente del ligando. Cinco de los siete perros evaluables con tumores de grado III tenían niveles elevados de KIT fosforilada en la línea base; cuatro de estos dieron positivo para la presencia de una ITD en el *c-kit*. Sólo 1 tumor de grado II presentaba una KIT fosforilada significativa; este animal también expresó *c-kit* con mutación ITD.

Ocho de los 11 perros evaluables dieron positivo para la modulación dirigida usando el criterio de una reducción $\geq 50\%$ en la KIT fosforilada con respecto a la KIT total en la muestra de biopsia tomada después del tratamiento con fosfato del compuesto I en comparación con la muestra antes del tratamiento. En la figura 6 se muestran ejemplos de KIT fosforilada y KIT total en inmunoprecipitados de biopsias de tumor tomadas antes y después del tratamiento con el fosfato del compuesto I. Cinco tumores (Fig. 6, izquierda) dieron positivo para la modulación dirigida, mientras que dos tumores (Fig. 6, derecha) dieron negativo. Los pares de biopsia que dieron negativo para la inhibición de la fosforilación de la KIT después del tratamiento con fosfato del compuesto I presentaban marcadamente menos KIT fosforilada en la línea base que los que dieron positivo (Fig. 6).

Para evaluar los efectos de inhibición del fosfato del compuesto I en las vías de señalización posteriores reguladas por la fosforilación de la KIT, se evaluaron los niveles de MAPK ERK1/2 fosforilada por análisis de transferencia de Western de los mismos pares de biopsia utilizados para el análisis de la KIT. Once de los 14 tumores

fueron evaluables para la modulación dirigida a la fosfo-ERK1/2 (dos de ellos no eran evaluables para la modulación dirigida a la KIT). De los 11 evaluables, 7 mostraron una reducción en la relación entre la fosfo-ERK1/2 y la ERK1/2 total en muestras de tumores tomadas después de la administración de fosfato del compuesto I, en comparación con muestras de tumor de la línea base (véase Fig. 6). La modulación dirigida a la ERK se detectó más frecuentemente en los MCT con expresión y fosforilación de la ERK en la línea base relativamente alta que en aquellos con ERK baja.

Basándose en el trabajo preclínico en modelos de roedores, el intervalo terapéutico del compuesto I para la inhibición dirigida se consideró que era de 50-100 ng/mL para un periodo de dosificación de 12 horas o 24 horas. La concentración en plasma del fosfato del compuesto I, 8 horas después de una dosis única (aproximadamente C_{max}) de 3,25 mg/kg varió de 33,2 a 186 ng/mL, con una media de 105 ± 9 ng/mL (tabla 8). En un animal, la concentración en plasma de fosfato del compuesto I estaba fuera del intervalo de las otras muestras (0,3 ng/mL). Doce de los 14 perros tenían niveles plasmáticos que se consideran dentro del intervalo terapéutico establecido en el estudio clínico en fase I del compuesto I. (London, C. A., Hannah, A. L., Zadovoskaya, R., Chien M. B., Kollias-Baker, C., Rosenberg, M., Downing, S., Post, G., Boucher, J., Shenoy, N., Mendel, D. B. y Cherrington, J. M. *Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. Clin. Cancer Res.*, 2755-2768, 2003). La concentración plasmática media para perros con evidencia de modulación dirigida a la KIT (79,2 ± 41 ng/mL) y de aquellos que se consideró que no presentaban modulación dirigida a la KIT (137 ± 36 ng/mL) no fue significativamente diferente (P = 0,08).

Discusión. Este estudio correlativo se diseñó para investigar la modulación dirigida en una población clínica comparable mediante el estudio de los efectos de una dosis única clínicamente eficaz de fosfato de compuesto I sobre la fosforilación de la KIT en MCT caninos y el consiguiente impacto de la señalización a través de MAPK. Las concentraciones plasmáticas de fosfato del compuesto I obtenidas en este estudio se midieron cerca de la C_{max} esperada, basándose en estudios farmacológicos preclínicos, y fueron consistentes con los niveles de fármaco medidos en el estudio clínico en fase I que investiga la dosis eficaz y el régimen del compuesto I (Tabla 8).

Ocho de los 11 (73%) pares de biopsia de MCT evaluables presentaban inhibición detectable de la activación de la KIT medida por una reducción de la KIT fosforilada después de una dosis única de fosfato de compuesto I. Los tres pacientes que no mostraron modulación dirigida a la KIT detectable después del tratamiento

79

habían expresado niveles bajos de KIT y fosfo-KIT en la línea base. La falta de una modulación dirigida significativa en estos pacientes se puede atribuir a límites técnicos en el método de detección; la sensibilidad del anticuerpo fosfo-específico para la KIT fosforilada con respecto a la KIT no fosforilada puede ser insuficiente en muestras con expresión de la KIT baja en la línea base. La inhibición de la actividad KIT se correlaciona más cercanamente con la fosforilación de la KIT en la línea base que con el genotipo ITD del *c-kit*. Basándose en ensayos celulares, se podría predecir que tanto la KIT de fenotipo salvaje como la KIT con mutación ITD serían inhibidas por el fosfato del compuesto I *in vivo*, porque el compuesto I *in vitro* bloqueó la fosforilación de la KIT con fenotipo salvaje y de la KIT con mutación ITD con una potencia similar.

El fosfato del compuesto I también afectó a una vía de señalización posterior de la KIT. Se ha informado de mutaciones en el *c-kit* en GIST y afecciones hematopoyéticas para activar diferentes vías de señalización entre ellas y en la KIT de fenotipo salvaje. En MCT caninos, todos los tumores, excepto uno, tenían ERK 1/2 fosforilada detectable en la línea base. En 7 de los 11 pares de biopsia de tumor evaluables, se inhibió la ERK1/2, medido por una reducción en la ERK1/2 fosforilada después del tratamiento. No todos los tumores que dieron positivo para la inhibición de la ERK1/2 fueron también positivos para la fosforilación de la KIT. La modulación dirigida de la ERK1/2 no se correlacionó con el grado del tumor ni con la presencia o ausencia de mutación ITD en el *c-kit*. Con respecto a la modulación dirigida a la KIT, la modulación dirigida a la ERK1/2 se detectó más frecuentemente en tumores que expresaban niveles altos de ERK1/2 y ERK1/2 fosforilada en la línea base.

La detección de la inhibición de una diana molecular del fosfato del compuesto I después del tratamiento de MCT sirve como prueba de la modulación dirigida del fosfato del compuesto I en este experimento. La relevancia clínica de este descubrimiento se apoya en la correlación entre la inhibición de la diana molecular y las concentraciones plasmáticas de fármaco en el intervalo terapéutico, y las respuestas clínicas objetivas de las que se ha informado previamente al compuesto I en pacientes caninos con MCT que expresaban mutaciones activantes en el gen diana, lo que proporciona una prueba de concepto para el fosfato del compuesto I en esta población de pacientes. Debido a que perros con otras afecciones (incluyendo carcinoma de mama, sarcoma de tejidos blandos y mieloma múltiple) también presentaron respuestas objetivas duraderas frente al tratamiento con el compuesto I, la inhibición de la KIT en esta concentración plasmática puede extrapolarse razonablemente a la inhibición con éxito de las otras dianas relacionadas de forma cercana con la tirosina cinasa receptora para el compuesto I expresadas por estos tumores, basándose en la

potencia *in vitro* e *in vivo* del compuesto I, proporcionando una base lógica molecular para respuestas objetivas en estos tumores. Por ejemplo, los tumores de mama caninos expresan el VEGFR que se inhibe por inhibidores de la indolina tirosina cinasa a concentraciones similares a las de la KIT en ensayos celulares *in vitro*. (Liao, A. T., Chien, M. B., Shenoy, N., Mendel, D. B., McMahon, G., Cherrington, J. M. y London, C. A. *Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. Blood*, 100: 585-593, 2002). La inhibición del fosfato del compuesto I bien en fenotipos salvajes o bien en *c-kit* con mutación ITD en MCT puede, por lo tanto, servir como sustituto para la inhibición de las RTK relacionadas

10 dianas del fosfato del compuesto I, VEGFR y PDGFR, que se expresan y/o se regulan de forma anormal en muchos tipos diferentes de tumor. Finalmente, la inhibición de la diana molecular, acoplada con respuestas objetivas clínicas en tumores caninos, dirige el desarrollo de compuestos relacionados en cáncer humano hacia poblaciones clínicas que expresan activación de KIT, VEGFR o PDGFR.

15

Ejemplo 8. Estudio de varios centros, controlado con placebo, doble ciego, aleatorio de la administración oral del fosfato del compuesto I en el tratamiento de perros con tumores de mastocitos recurrentes.

Objetivo. La eficacia de comprimidos orales del fosfato del compuesto I para el

20 tratamiento de tumores de mastocitos en animales que tenían la enfermedad de forma medible y recurrente se evaluó después de cirugía en un estudio enmascarado controlado negativamente. El estudio evaluó la dosificación en días alternos de fosfato del compuesto I a 3,25 mg equivalentes de la base libre (FBE)/kg de peso corporal sobre la respuesta de la enfermedad utilizando respuesta o criterios modificados

25 (RECIST). La presencia o ausencia de mutación en los tumores de mastocitos se evaluó como un covariante en este estudio. Con el objetivo de toma de decisiones, la duración de este estudio fue de 6 semanas.

Ciento cincuenta y tres (153) perros se dispusieron aleatoriamente en una relación de 4:3 en uno de los dos grupos de tratamiento: T01 (Placebo en el que n =

30 65) y T02 (fosfato del compuesto I en el que n = 88). Se eligieron diez oncólogos veterinarios en Estados Unidos y suministraron casos. Para la admisión los perros debían tener tumor de mastocitos recurrente (al menos una lesión diana debía tener un diámetro mínimo mayor que 20 mm) ± implicación de ganglios linfáticos regionales. En la línea base se identificaron por dos evaluadores un máximo de tres lesiones diana

35 (tumores de mastocitos medibles) y todas las lesiones no diana (todo el resto de lesiones, medibles y no medibles). La eficacia se basó en la respuesta objetiva

(respuesta total o respuesta parcial) en la visita de la 6ª semana en la que la media para los dos evaluadores de la suma del diámetro mayor de las lesiones diana (Media Sum LD) se comparó con la media de la suma de línea base para el cálculo del porcentaje de reducción o aumento. La evaluación de las lesiones no diana fue subjetiva. Se definió respuesta completa (CR) como la desaparición de todas las lesiones diana y no diana y la no aparición de nuevas lesiones; se definió una respuesta parcial (PR) como al menos una disminución del 30% en la Media Sum LD de las lesiones diana en comparación con la Media Sum LD de la línea base y la no progresión de las lesiones no diana y no aparición de nuevas lesiones. Se tomaron muestras de tejido del tumor y de piel normal alejada antes del estudio aleatorio y se sometió para evaluación del estado de mutación del *c-kit*.

Se incluyeron ochenta y seis (86) animales de T02 y 65 de T01 en el análisis de la eficacia. El análisis de los datos indicó una mejora estadísticamente significativa en el punto final principal (respuesta objetiva) para el fosfato del compuesto I (T02) en comparación con el placebo (T01). Los animales del grupo T02 tenían una tasa de respuesta objetiva significativamente mayor (38,3%; 33/86) en comparación con los animales del grupo T01 (7,9%; 5/63) ($p < 0,001$). Casi el doble de los animales del grupo T01 (66,7%; 42/63) presentaron enfermedad progresiva en comparación con los animales del grupo T02 (33,7%; 29/86). Casi en el doble de los perros del grupo T02 que dieron positivo para la mutación del *c-kit* era probable que tuvieran una respuesta objetiva en comparación con los que dieron negativo para la mutación del *c-kit* (60%, 12/20 vs. 32,8%, 21/64, respectivamente).

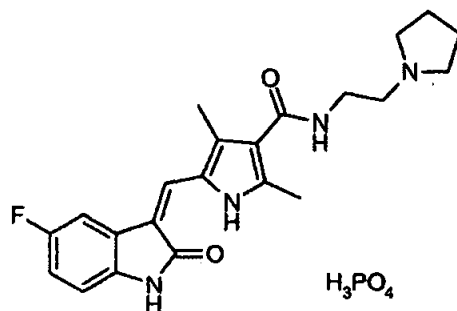
En conclusión, este estudio demostró la eficacia de los comprimidos orales de fosfato del compuesto I para el tratamiento de tumores de mastocitos recurrentes en perros mascotas.

Se espera que los expertos en la técnica encuentren numerosas modificaciones y variaciones de la invención como se ha descrito en los ejemplos ilustrativos anteriores. Consecuentemente, sólo las limitaciones que aparecen en las siguientes reivindicaciones deberían ser consideradas para la invención.

REIVINDICACIONES

1.- Forma salina de una base, en la que la base es la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico, y en la que la forma salina se elige entre el grupo que consiste en las sales de citrato y fosfato, y sus solvatos y polimorfos.

2.- Una forma salina según la reivindicación 1, en la que la sal es la sal de fosfato con la estructura:

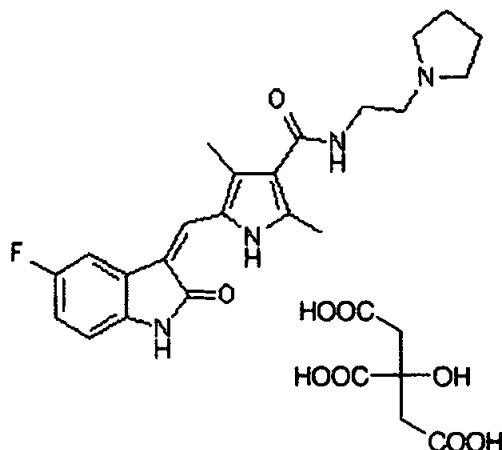


y sus solvatos y polimorfos.

3.- La forma salina según la reivindicación 2, con una fórmula molecular de $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ y un punto de fusión de aproximadamente 285°C a aproximadamente 290°C .

4.- Un polimorfo (forma I) de la sal de fosfato según la reivindicación 2, en el que dicho polimorfo tiene un espectro de difracción de rayos X en polvo que comprende picos expresados en grados ($\pm 0,1$ grados) del ángulo dos theta de 20,8, 24,5, 25,9 y 27,0, obtenido utilizando emisión de $\text{CuK}\alpha 1$ (longitud de onda = 1,5406 Angstroms).

5.- Una forma salina según la reivindicación 1, en la que la sal es la sal de citrato con la estructura:



y sus solvatos y polimorfos.

5

6.- La forma salina según la reivindicación 5 con una fórmula molecular de $C_{22}H_{25}FN_4O_2 \cdot C_6H_8O_7$ y un punto de fusión de aproximadamente 178 a aproximadamente 183°C.

10 7.- La forma salina según la reivindicación 5 que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos expresados en grados ($\pm 0,1$ grados) del ángulo dos theta de 9,1, 9,4, 14,2, 25,4 y 26,8, obtenido utilizando emisión de $CuK\alpha_1$ (longitud de onda = 1,5406 Angstroms).

15 8.- Una composición farmacéutica que comprende la sal de fosfato según la reivindicación 2, la sal de citrato según la reivindicación 5, o uno de sus solvatos o polimorfos, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 9.- Un método para la modulación de la actividad catalítica de proteína cinasas que comprende poner en contacto dicha proteína cinasa con la sal de fosfato según la reivindicación 2, la sal de citrato según la reivindicación 5 o uno de sus solvatos o polimorfos.

25 10.- Una proteína cinasa según la reivindicación 9, en la que la proteína cinasa se elige entre el grupo que consiste en las tirosina cinasas receptoras, las proteína tirosina cinasas no receptoras y las serina/treonina proteína cinasas.

11.- Un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con una proteína cinasa en un organismo que comprende administrar a dicho organismo una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según la reivindicación 8.

5 12.- El método según la reivindicación 11, en el que el trastorno relacionado con una proteína cinasa es tumor de mastocitos o mastocitosis.

13.- Un método para preparar cristales de la sal del fosfato de la base según la reivindicación 1 que comprende:

- 10 (a) introducir una cantidad estequiométrica de ácido fosfórico en la base en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes,
(b) cristalizar la sal de fosfato de la disolución, y
(c) separar los cristales de sal de fosfato de la disolución del disolvente.

15 14.- Un método para preparar polimorfos de la sal de fosfato según la reivindicación 2 que comprende:

- (a) introducir la sal de fosfato en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes,
(b) opcionalmente, añadir un disolvente puente a la disolución,
20 (c) cristalizar los cristales del polimorfo de la disolución, y
(d) separar los cristales de polimorfo de la disolución del disolvente.

15.- El método según la reivindicación 14, en el que el disolvente en la etapa (a) comprende metanol.

25

16.- Un método para preparar cristales de la sal de citrato de la base según la reivindicación 1 que comprende:

- (a) introducir una cantidad estequiométrica de ácido cítrico en la base en una disolución que comprende un disolvente o una mezcla de disolventes,
30 (b) cristalizar los cristales de la sal de citrato de la disolución, y
(c) separar los cristales de sal de citrato de la disolución del disolvente.

17.- Una utilización de la sal de fosfato según la reivindicación 2, la sal de citrato según la reivindicación 5, o uno de sus solvatos o polimorfos, en la preparación de un
35 medicamento que es útil en el tratamiento de una enfermedad mediada por una actividad PK anormal.



RESUMEN

La presente invención se refiere a formas salinas sólidas del compuesto de 2-indolinona sustituido con 3-pirrol, (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico. También se refiere a polimorfos de la sal de fosfato de la ida. La invención se refiere además a la utilización de las sales y polimorfos en el tratamiento de trastornos relacionados con una proteína cinasa.

06

1/6

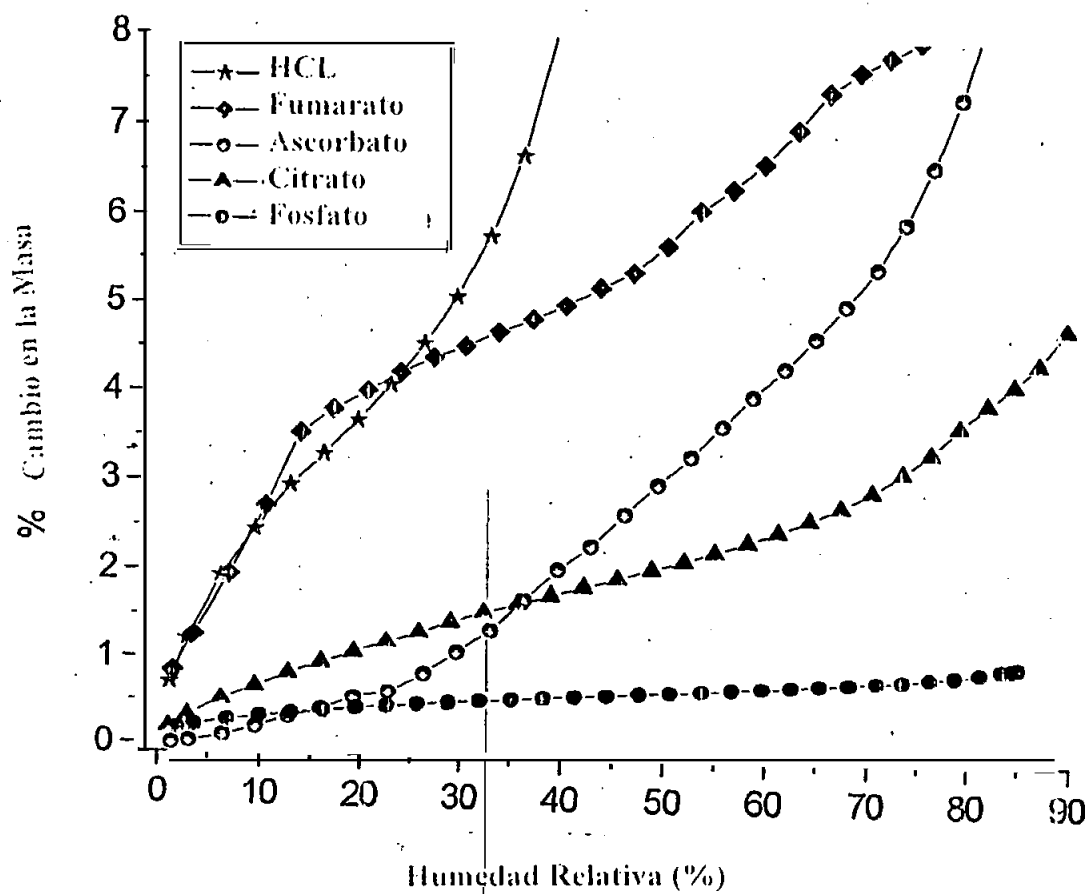
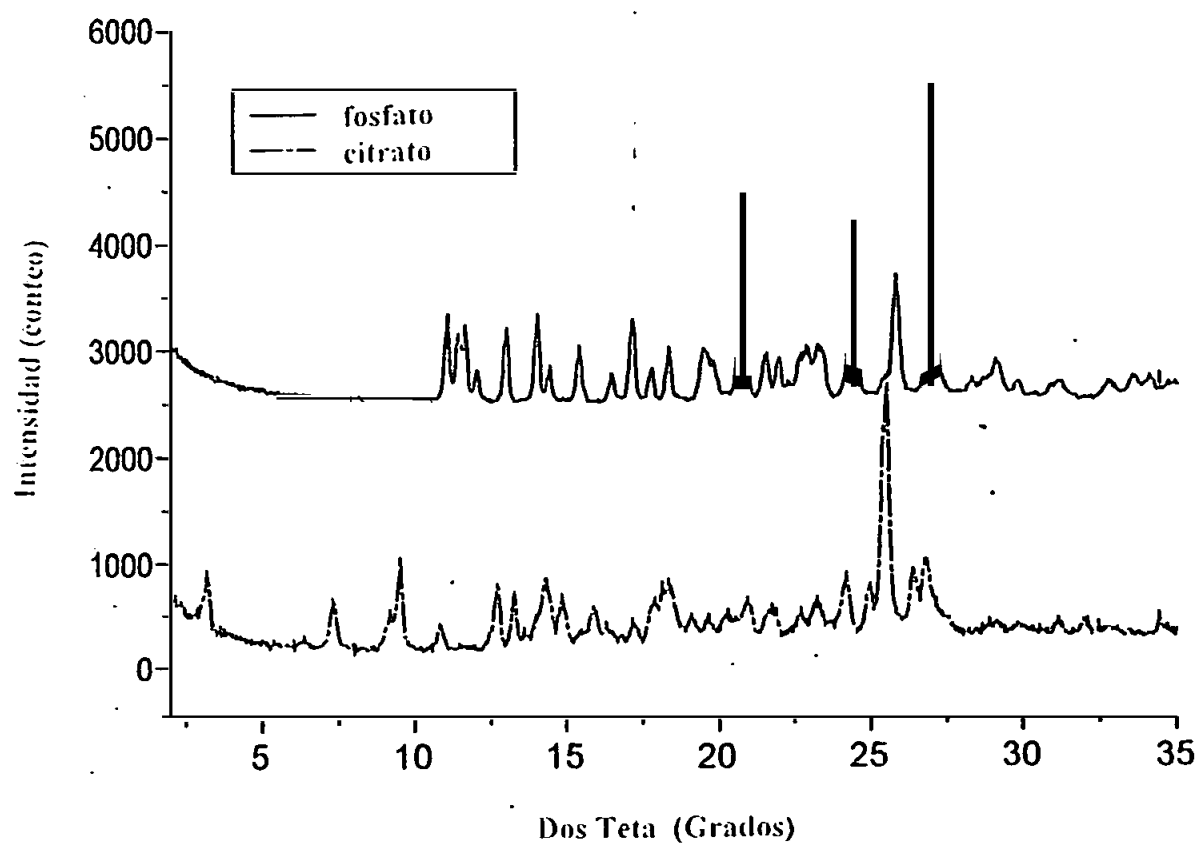
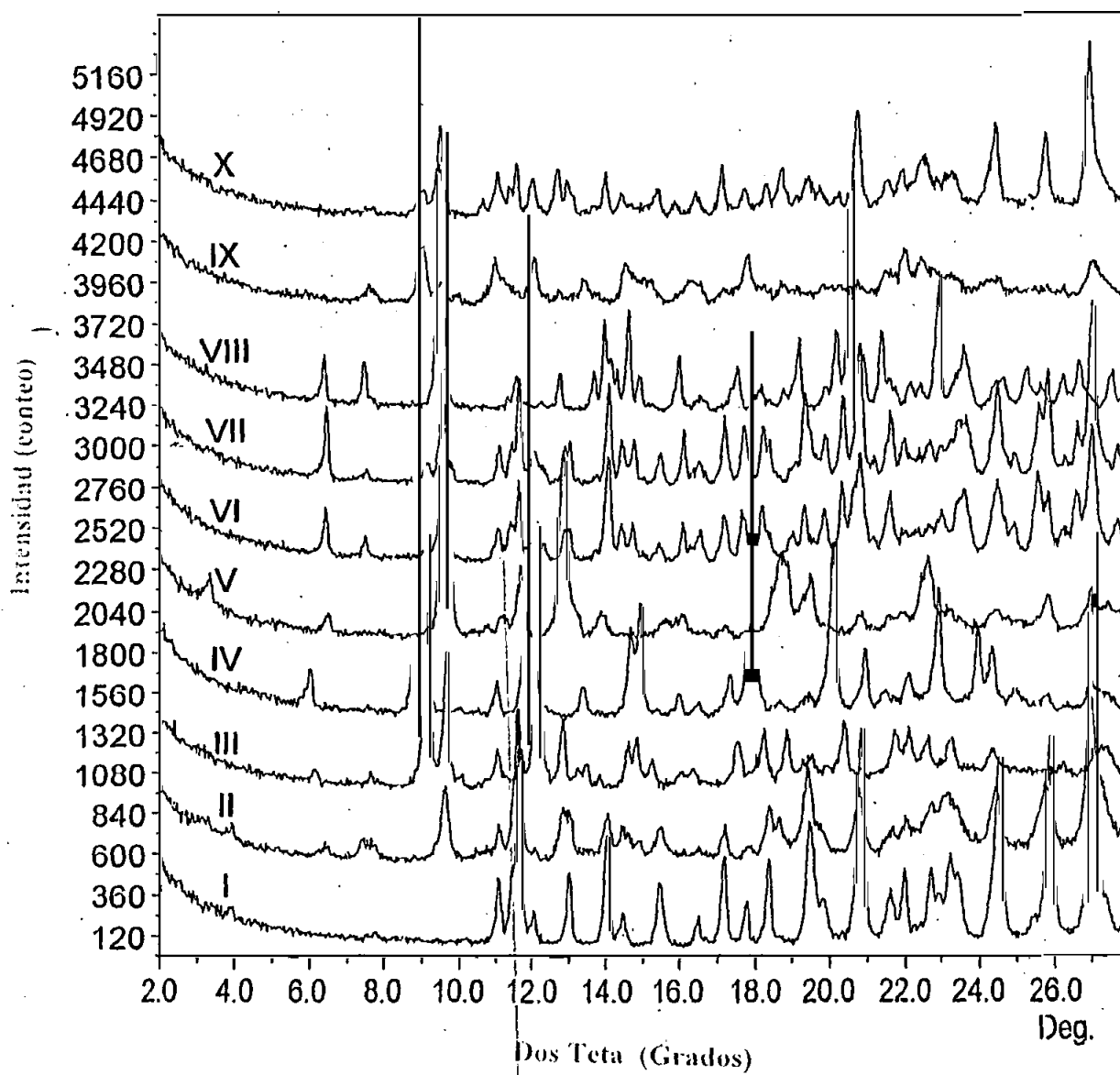


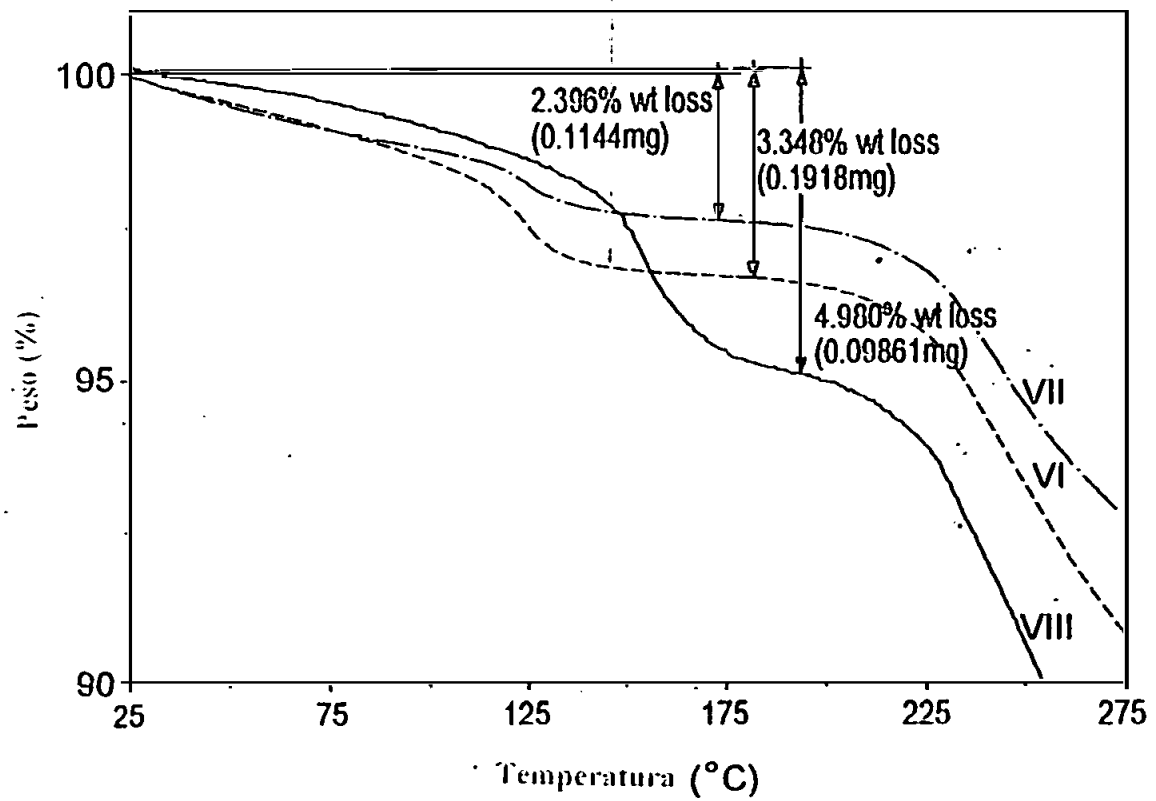
FIG. 1

**FIG. 2**

87

3/6

**FIG. 3**

**FIG. 4**

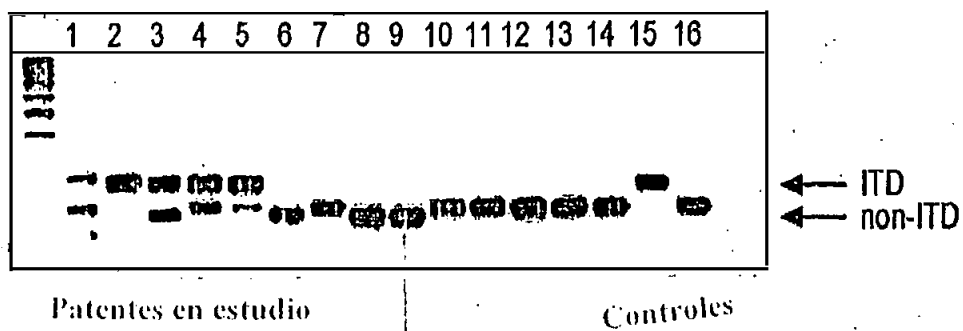


FIG. 5

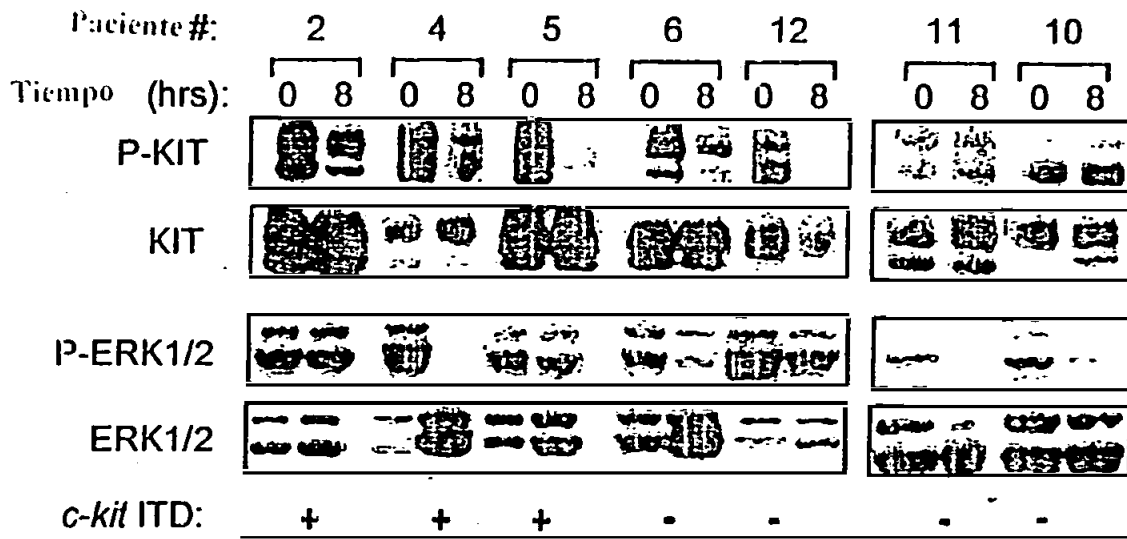


FIG. 6

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

COPY

To:

PFIZER INC.
Attn: Fuller, Grover F., Jr.
MS8260-1615
Eastern Point Road
Groton, CT 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

FEB 12 2007

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

02/02/2007

Applicant's or agent's file reference

PC27946A

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/IB2006/002506

International filing date
(day/month/year)

08/09/2006

Applicant

PFIZER PRODUCTS INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland. Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



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

Tatjana John

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

90

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC27946A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2006/002506	International filing date (day/month/year) 08/09/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 19/09/2005
Applicant PFIZER PRODUCTS INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D403/06 A61K31/404 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)

C07D 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, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	US 2006/009510 A1 (HAVENS, JEFFREY L. ET AL) 12 January 2006 (2006-01-12) page 18; example 2 -----	1-4, 8-15,17
A	WO 2004/076410 A2 (UPJOHN CO [US]; SUN CHANGQUAN [US]; FOSTER TODD P [US]; HAN FUSEN [US]) 10 September 2004 (2004-09-10) page 24 - page 25; claims -----	1-17
A	WO 03/016305 A (UPJOHN CO [US]; HAWLEY MICHAEL [US]; FLECK THOMAS J [US]; PRESCOTT STE) 27 February 2003 (2003-02-27) cited in the application claims; examples ----- -/--	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2007

Date of mailing of the international search report

02/02/2007

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

Fazzi, Raffaella

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/002506

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 573 293 B2 (TANG PENG CHO [US] ET AL) 3 June 2003 (2003-06-03) cited in the application table 1 -----	03
A	WO 01/60814 A2 (SUGEN INC [US]; TANG PENG CHO [US]; MILLER TODD [US]; LI XIAOYUAN [US]) 23 August 2001 (2001-08-23) examples -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2006/002506

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 9-12 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. 94
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

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/002506

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006009510	A1	12-01-2006	NONE	
WO 2004076410	A2	10-09-2004	AU 2004215407 A1 BR PI0407795 A CA 2516900 A1 EP 1599200 A2 JP 2006518755 T KR 20050107588 A MX PA05008959 A US 2004259929 A1	10-09-2004 14-02-2006 10-09-2004 30-11-2005 17-08-2006 14-11-2005 04-11-2005 23-12-2004
WO 03016305	A	27-02-2003	BG 108553 A BR 0211612 A CA 2455050 A1 CN 1543462 A CN 1789264 A CZ 20040196 A3 EP 1419151 A1 HR 20040112 A2 JP 2005503386 T MA 27058 A1 MX PA04001452 A NO 20041054 A NZ 531232 A OA 12650 A SK 902004 A3 UA 76483 C2 ZA 200400706 A	30-04-2005 24-08-2004 27-02-2003 03-11-2004 21-06-2006 12-01-2005 19-05-2004 30-06-2004 03-02-2005 20-12-2004 20-05-2004 12-03-2004 26-11-2004 19-06-2006 04-03-2005 15-04-2004 09-03-2005
US 6573293	B2	03-06-2003	US 2004063773 A1 US 2002156292 A1	01-04-2004 24-10-2002
WO 0160814	A2	23-08-2001	AU 3977001 A BG 107078 A BR 0108394 A CA 2399358 A1 CN 1439005 A CZ 20023081 A3 EP 1255752 A2 HR 20020751 A2 HU 0204433 A2 IS 6501 A JP 3663382 B2 JP 2003523340 T MX PA02008021 A NO 20023831 A NZ 520640 A PL 361209 A1 SK 13262002 A3	27-08-2001 30-04-2003 22-06-2004 23-08-2001 27-08-2003 12-02-2003 13-11-2002 31-12-2004 28-04-2003 13-08-2002 22-06-2005 05-08-2003 05-04-2004 15-10-2002 29-04-2005 20-09-2004 04-03-2003

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

46

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/B2006/002506

International filing date (day/month/year)

08.09.2006

Priority date (day/month/year)

19.09.2005

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

INV. C07D403/06 A61K31/404 A61P35/00

Applicant

PFIZER PRODUCTS INC.

1. This opinion 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 Rule 43bis.1(a)(i) 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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Fazzi, Raffaella

Telephone No. +49 89 2399-8510



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/IB2006/002506

97

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

98

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

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. 9-12

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 9-12 with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international search (*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 (*specify*):

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

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13 *ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

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

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/B2006/002506

99

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-17
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-17
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-8, 13-17
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

100

1) Reference is made to the following documents:

D1: US 2006/009510
D2: WO 2004/076410
D3: WO 03/016305
D4: US-B2-6 573 293
D5: WO 01/60814 A2

1.1) Intermediate documents (Reference to section VI)

The content of D1, which has a publication date of 12 January 2006, will not be used in this Written Opinion, but it could become relevant to the question of novelty under Article 54(3) EPC after the entrance into the European Phase, if the present priority were found invalid.

2) Reference to section III

Claims 9-12 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).

3) Novelty (Reference to section V)

D2 relates to polymorphs of the present compound I and to a HCl salt thereof (cf. claims and page 20 of the description).

No citrate or phosphate salts of the present compound I are mentioned.

D3 describes an anhydrous crystal salt of N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxamide.

This compound differs from present compound I in that the pyrrolidine group is absent.

D4 discloses the synthesis of present compound I (cf. compound 130 of table 1, columns 109-110 and column 212). No salts or polymorphs thereof are mentioned.

Present compound I is also described on page 45 of D5 (cf. example 129) but no citrate or

phosphate salts thereof are mentioned.

107

Accordingly, the subject-matter of present claims 1-17 meets the requirements of Article 33(2) PCT.

4) Inventive step (Reference to section V)

D2, which may be considered to represent the closest state of the art, discloses the preparation of some polymorphs of present compound I, which is useful in the treatment of diseases mediated by abnormal protein kinase activity (cf. treatment of different tumour forms).

The problem to be solved by the present application may thus be regarded as the provision of alternative salts and polymorphs of the same compound for the same therapeutical use. D2 mentions the formation of a HCl salt of polymorph I of compound I (cf. page 20) but no reference to other salts thereof has been observed.

The preparation of a new salt or polymorph of a known compound is considered *prima facie* obvious; however, the Applicant has shown that present salts would possess some physical and biological properties which could not have been foreseen by the state of the art.

In particular, on page 19 it is underlined that the hydrochloride, fumarate and ascorbate salts of the compound I were very hygroscopic, while the citrate and phosphate salts had lower moisture sorption and possessed a relatively high crystallinity.

On page 23 it is mentioned that the wettability of compound I phosphate is much better than that of compound I free base.

Further evidence has been given for the efficiency of present salts of compound I in the modulation of the activity of protein kinases (cf. pages 31-39).

Therefore, it appears that the better physical properties of present salts of compound I lead to a positive influence on the bio-availability of the active agent.

Thus, the subject-matter of present claims 1-17 meets the requirements of Article 33(3) PCT.

5) Industrial applicability (Reference to section V)

For the assessment of the present claims 9-12 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

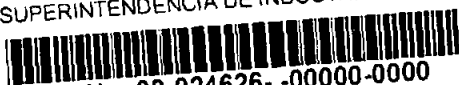
International application No.

PCT/IB2006/002506

W02

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.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-024626-00000-0000

 Fecha: 2008-03-07 16:53:53
 Tra. 11 PATENTE IYI
 Act. 411 PRESENTACION

 Dep. 2020 NUECREACION
 Eve: 378 FASENACIONAL
 Folios: 102

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

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 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 y 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 se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

[Firma manuscrita]
 Firma Responsable

Fecha

Marzo 7-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Corrutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

104

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 104

2020
Bogotá D.C.,

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

REFERENCIA	Radicación No.	8 24626
	Solicitud internacional	PCT/IB2006/002506
	Fecha inicio fase nacional	19/04/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	5831
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

08 ABR. 2008

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

adpall