

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-009317- -00004-0000

Fecha: 2012-09-25 16:19:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 13

Re: Expediente No. 09-009.317

Solicitud de patente de invención titulada: "PEPTIDOMIMÉTICOS DE SMAC
ÚTILES COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNAS DE APOPTOSIS (IAP)"

Solicitante: NOVARTIS AG

Nuestra Ref.: P2009/000010

RESPUESTA AL OFICIO No. 11431, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 371

DE FECHA 29 DE JUNIO DE 2012

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. a- En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad el Capítulo Reivindicatorio presentado al momento de radicar la presente solicitud.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto contiene los siguientes cambios:

- se han eliminado las Reivindicaciones 1 a 18 y 20 a 25;
- se introduce la nueva Reivindicación 1, en donde se reivindica específicamente el compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- La nueva Reivindicación 2 corresponde a la antigua Reivindicación 19, dependiente de la nueva Reivindicación 1.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial, por el contrario, éstas corresponden a una drástica limitación de la materia reivindicada.

b- Adicionalmente, en virtud del Artículo 36 de la Decisión 486, me reservo el derecho de radicar solicitudes divisionales.

2. a- La Examinadora señala que las Reivindicaciones 21 a 25 reclaman materia no patentable.

b- Considero superada la anterior objeción, en tanto que las Reivindicaciones 21 a 25 han sido eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

3. a- La Examinadora encuentra los siguientes problemas de claridad y concisión en el Capítulo Reivindicatorio:

- las reivindicaciones son excesivamente amplias, solicitando realizar una generalización razonable de la materia ilustrada en el Capítulo Descriptivo;
- el Capítulo Reivindicatorio contiene diferentes géneros funcionales que no se encuentran definidos apropiadamente;
- las expresiones “que puede estar sustituida o insustituida”, “opcionalmente”, que se encuentra en las Reivindicaciones 1-3 y 14 es imprecisa, por lo que no se puede determinar el alcance real de las reivindicaciones;
- las sales de las Reivindicaciones 11, 17 y 18 no son claras, pues no se evidencia a qué sales se refiere específicamente, su forma, ni cómo se forman;
- en la Reivindicación 20 no se especifica cuál es el agente antiproliferativo adicional con el que se administra el compuesto de la presente invención, y tampoco se encuentra en el Capítulo Descripción soporte de lo anterior.

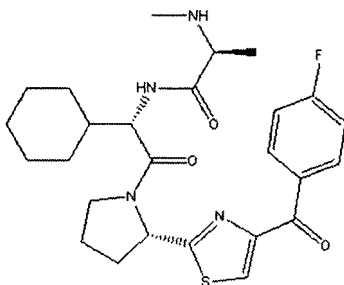
b- Considero superadas las anteriores objeciones, en tanto que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto se ha limitado exclusivamente al compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-{{(S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il}}-2-oxo-etil)-2-metilamino-

propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y composiciones farmacéuticas que lo contienen.

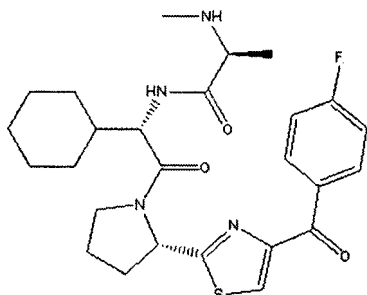
4. a- La Examinadora que aduce la patente WO2005/097791 (D1) afecta la novedad de la presente invención.

La Examinadora realiza un cuadro comparativo mediante el cual concluye que todas las características técnicas de los compuestos de la Reivindicación 1 ya se encontraban divulgadas en D1, por lo que la presente invención carece de novedad.

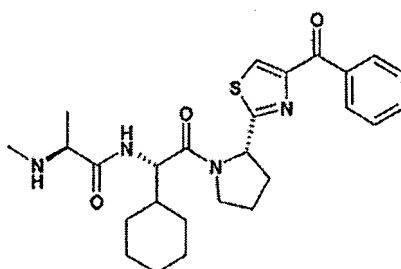
b- i) En primer lugar, me permito llamar nuevamente la atención de la Examinadora sobre el hecho que la presente invención se ha limitado exclusivamente al compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, que presenta la siguiente fórmula estructural:



Adicionalmente, presento para consideración de la Examinadora el ANEXO 1 de este memorial, en donde se exponen los resultados de dos ensayos *in vitro* y un ensayo *in vivo*, comparando el compuesto de la presente solicitud con el compuesto del Ejemplo 130 de D1, evidenciando las propiedades sorprendentes y completamente inesperadas del compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida de la Reivindicación 1.



Presente Solicitud



Ejemplo 130 de D1

Así entonces, se realizó un primer ensayo *in vitro* con el fin de determinar la IC₅₀ de dos sales de cada uno de los compuestos (sal citrato y trifluoroacetato) en la inhibición de la proliferación de células cancerosas, específicamente las células cancerosas SKOV3 (células de carcinoma ovárico). El compuesto de la presente invención obtuvo un IC₅₀ de 4.75nM y 2.45nM respectivamente (sal citrato y trifluoroacetato), mientras que el Ejemplo 130 de D1 obtuvo un IC₅₀ de 65nM y 45nM respectivamente (sal citrato y trifluoroacetato), demostrando consistentemente para las dos sales que el compuesto de la presente solicitud es mucho más potente que el compuesto de D1 (en promedio, **16 veces más potente**). Es decir, el compuesto de la presente invención fue capaz de inhibir el crecimiento de las células cancerigenas ováricas SKOV3 a una concentración mucho menor que el compuesto más cercano del arte previo (Ejemplo 130 de D1).

El segundo ensayo *in vitro* realizado determinó diferentes parámetros farmacocinéticos para ambos compuestos en un ensayo con microsomas hepáticos de rata y humanos. Específicamente se determinaron los siguientes parámetros: aclaramiento (µL/min.mg), aclaramiento intrínseco y tiempo de vida media (t_{1/2} expresado en minutos).

Estabilidad *in vitro* al metabolismo en microsomas hepáticos de rata y humanos

		Presente invención	Ejemplo 130 D1
Parámetros <i>in vitro</i> del metabolismo por microsomas hepáticos de rata (forma trifluoroacetato)	Aclaramiento intrínseco [ul min-1 mg-1]	22	70
	Rango de aclaramiento intrínseco	bajo	med
	t _{1/2} [min]	63	20
Parámetros <i>in vitro</i> del metabolismo por microsomas hepáticos humanos (forma trifluoroacetato)	Aclaramiento intrínseco [ul min-1 mg-1]	56	107
	Rango de aclaramiento intrínseco	med	med
	t _{1/2} [min]	25	13

Los resultados obtenidos, tanto en los microsomas de rata como en los humanos, demuestran que el compuesto de la presente invención tiene un **aclaramiento hepático *in vitro* menor** al del Ejemplo 130 de D1, lo que se ve reflejado también en el tiempo de vida media, que para el

compuesto aquí reivindicado es significativamente mayor en comparación con el tiempo de vida media del ejemplo 130 de D1. Lo anterior permite concluir que el compuesto de la presente invención es más estable frente a procesos metabólicos, por ejemplo, al exponerse a microsomas hepáticos de rata, por lo que éste permanece como agente farmacéutico activo por un periodo de tiempo mayor en el torrente sanguíneo que el Ejemplo 130 de D1.

Por último, se realizó un ensayo *in vivo* tanto para el compuesto de la presente invención, como para el Ejemplo 130 de D1, en donde se determinaron parámetros farmacocinéticos en ratones desnudos que tienen un tumor implantado.

Parámetros farmacocinéticos <i>in vivo</i> en ratón			
		Presente invención	Ejemplo 130 D1
Parámetros farmacocinéticos en tumores implantados en tumores en ratones desnudos	Sal	citrato	citrato
	Dosis de la sal (mg/kg)	25	25
	Dosis de base libre (mg/kg)	18.1	18
	Vía de administración	iv	iv
	AUC 0-16h (nM.h)	18086	10994
	Dosis de AUC normalizada (nM.h/mg/kg)	999	611
	C _{max} (nM)	15530	7645
	T _{max} (h)	0.083	0.083
	t _{1/2} * (h) [basado en los 3 últimos puntos de tiempo medibles con peso uniforme]	1.5	0.8
	V _{ss} (mL/kg)	2222	2570
	Aclaramiento (Cl) (mL/h/kg)	1999	3391

Los resultados de este ensayo permitieron concluir que cuando se administran dosis similares a ratones, la distribución entre el plasma y otros compartimentos del animal es similar (lo que se evidencia por que los valores del volumen de distribución para ambos compuestos es similar), sin embargo, la exposición en plasma (AUC) observada para el compuesto de la presente invención es mucho mayor que la observada para el Ejemplo 130 de D1. Lo anterior indica que la **proporción de aclaramiento** para el compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il}-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, **es mucho mejor** que para el Ejemplo 130 de D1. Esta diferencia en la proporción de aclaramiento resulta en una mayor vida media, permitiendo que la inhibición de IAP ocurra por un periodo de tiempo mayor en comparación con el Ejemplo 130 de D1, lo que se encuentra en concordancia con los

resultados obtenidos *in vitro* en los microsomas hepáticos de rata y humano, analizado anteriormente.

ii) Ahora bien, en cuanto al arte previo citado por la Examinadora, me permito citar en este punto el Manual Andino de Patentes que establece que una divulgación general no afecta la novedad de un compuesto específico o de un subgrupo específico incluido eventualmente en una fórmula general.¹ En este orden de ideas, para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el arte previo debe divulgar explícitamente todas y cada una de las características de la invención², y debe ser lo suficientemente completa para que una persona versada en la materia pueda usar dicha información obtener inequívocamente la invención, esperando además obtener los efectos esperados, tal como lo ha establecido el Tribunal Andino de Justicia.³

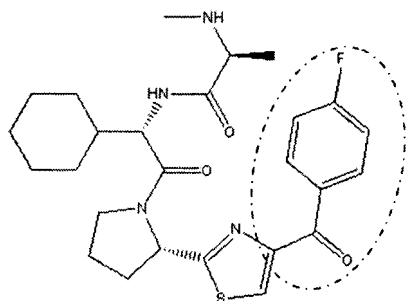
En el presente caso, ningún compuesto divulgado en D1 describe particularmente el compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, de hecho, la persona medianamente versada en la materia, sin indicación alguna, habría tenido que seleccionar arbitrariamente entre miles de opciones descritas en los compuestos de Fórmula I divulgados en D1, específicamente los siguientes sustituyentes: $n = 0$, R^1 o $R^2 = H$ o metilo, $R^3 =$ metilo, $R^4 =$ ciclohexilo, $A =$ triazol, $D = C(O)$, y $A_1 = 4$ -fluorofenilo, para llegar al compuesto de la presente invención.

Si bien el Ejemplo 130 de D1 es ciertamente el compuesto más cercano del estado de la técnica al compuesto de la presente invención, la persona medianamente versada en la materia habría tenido que elegir un compuesto particular entre los 195 Ejemplos divulgados en D1, además seleccionando arbitrariamente los sustituyentes anteriormente descritos, específicamente, un radical 4-fluorobenzoil en posición 4 del anillo tiazol, como se compara a continuación:

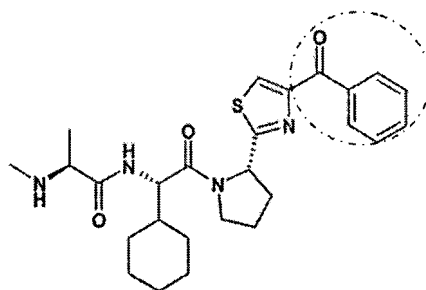
¹ Manual Andino de Patentes. OMPI, EPO, Secretaría de la Comunidad Andina. 2004. ISBN9978-43-855-6. Sección 9.4.4.1.

² Manual Andino de Patentes. OMPI, EPO, Secretaría de la Comunidad Andina. 2004. ISBN9978-43-855-6. Sección 9.4.

³ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>); y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)



Presente Solicitud



Ejemplo 130 de D1

iii) Me permito anotar que recientemente la Superintendencia de Industria y Comercio, en su Instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad define, adopta y acepta el concepto de patente de selección en cuanto a invenciones farmacéuticas, de manera que consiste en una patente que “reivindica un solo elemento, o un grupo pequeño de elementos que pertenecen a un grupo extenso de elementos ya conocidos”⁴. Así, la SIC define que para la evaluación de novedad de una patente de selección, es importante tener en cuenta que “una fórmula general del estado de la técnica no anula la novedad de un compuesto o subgrupo de compuestos reivindicados incluidos en ella”⁵, concluyendo que “si el grupo específico de compuestos reivindicado no está descrito explícitamente en algún antecedente del estado de la técnica por su nombre químico, ni por su fórmula química y está alejado de los ejemplos del estado de la técnica y de los extremos, tal grupo reivindicado es nuevo (selección)”⁶. Así, para la SIC es claro que si no existe tal divulgación concreta, entonces los compuestos serán considerados como una **selección nueva**.

Posteriormente, la SIC determina que “una invención de selección [...] que se considera nueva, tiene nivel inventivo si todos los compuestos del subgrupo presentan un efecto o actividad técnica sorprendente no descrita en el estado de la técnica y además inesperada”. Más adelante señala que “si el solicitante aporta datos comparativos, se aceptarán como evidencia experimental de que los compuestos de la selección tienen ventajas respecto a los conocidos en el estado de la técnica.”⁷

Teniendo en cuenta los parámetros de la SIC, cuando una invención dada se encuentra de manera general incluida en una divulgación más amplia e inespecífica, pero la invención presenta una

⁴ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 3.5.1 (disponible electrónicamente en http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/propiedad_industrial/Formatos/PI02-I06.pdf)

⁵ Ibídem. Sección 3.5.4.

⁶ Ibídem.

⁷ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 3.5.5.3. (disponible electrónicamente en http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/propiedad_industrial/Formatos/PI02-I06.pdf)

limitación que no se encuentra explícitamente revelada o sugerida en el arte previo y además proporciona un efecto técnico inesperado, su novedad y su nivel inventivo deben ser reconocidas.

En el presente caso, es claro que D1, al no revelar explícitamente el compuesto particularmente reivindicado en la Reivindicación 1 del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, ni brindar indicaciones acerca de cómo realizar la selección de sustituyentes, no puede afectar su novedad.

Ahora bien, en cuanto al nivel inventivo del compuesto aquí reivindicado, y a la luz de lo establecido por la SIC, es claro que D1 no sugiere que el compuesto que presenta las características estructurales específicas reivindicadas, presentaría una actividad *in vitro* **16 veces** mejor contra el cáncer celular, en comparación con compuesto del Ejemplo 130 de D1 (compuesto del arte previo más cercano). Es decir, el compuesto de la presente invención es capaz de inhibir el crecimiento de las células cancerígenas ováricas SKOV3 a una mucho menor concentración que el Ejemplo 130 de D1. Adicionalmente, de acuerdo los ensayos adicionales *in vitro* e *in vivo* realizados, se puede concluir que el compuesto de la presente invención presenta un menor aclaramiento hepático, un mayor tiempo de vida media, y por lo tanto, una mayor estabilidad metabólica, lo que permite concluir que se encontrará disponible terapéuticamente en plasma por una mayor cantidad de tiempo.

En conclusión, el compuesto de la presente invención proporciona inesperadamente una mejor actividad *in vitro* (para las sales citrato y trifluoroacetato), una mejor estabilidad metabólica *in vitro* (ensayo en microsomas hepáticos de rata y humano) e *in vivo* (determinación de parámetros farmacocinéticos en ratones desnudos que tienen un tumor implantado), al compararse con el Ejemplo 130 ilustrado en D1. Este efecto **no** podía predecirse de la información divulgada en el arte previo, puesto que allí no se proveen datos ni indicaciones que sugieran que el compuesto específico de la presente invención presentaría sorprendentemente un perfil de actividad y estabilidad superior, por lo cumple a todas luces con el criterio de la SIC y por lo tanto consiste en una selección ventajosa frente al arte previo.

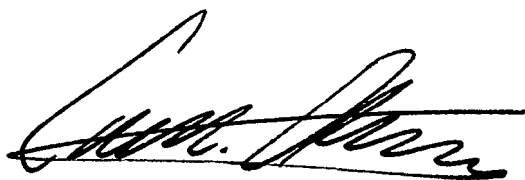
5. Finalmente, me permito informar que para el concepto inventivo comprendido en la presente solicitud, ha sido otorgado hasta el momento el privilegio de patente en Chile, Honduras, El Salvador y **Perú**.

Si bien es cierto que las concesiones de patentes en oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, considero que dicha concesión sugiere el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada,

ya que los criterios de evaluación y estudio aplicados para concluir la aceptación de dichas patentes resultan equivalentes a los que la SIC debe emplear, en especial en el caso de Perú.

6. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la Examinadora en su examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y se proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo:

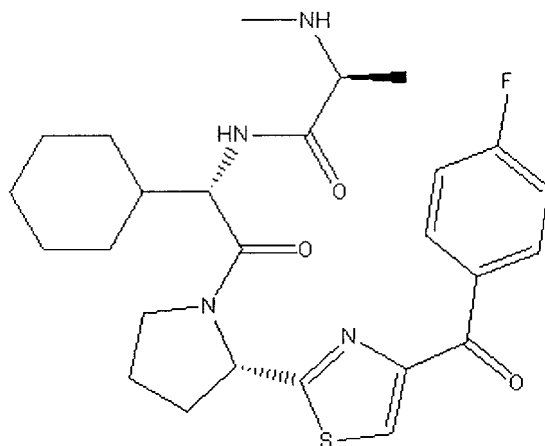
- Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- ANEXO 1: Ensayos comparativos *in vitro* e *in vivo* del (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-{(S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il}-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida vs. el Ejemplo 130 de la solicitud WO2005/097791 (D1).

10

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un compuesto que es (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable.



2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, o una sal farmacéuticamente aceptable, y un vehículo farmacéutico.

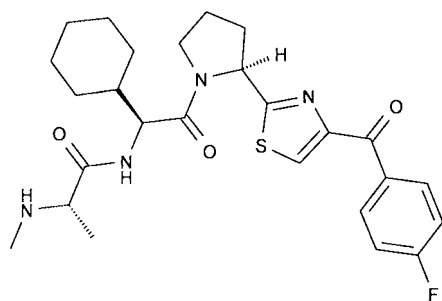
Handwritten signature

ANEXO 1

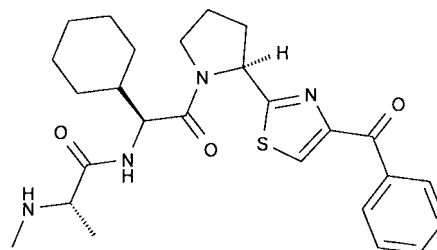
Ensayos comparativos *in vitro* e *in vivo* del (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida vs. Ejemplo 130 de la solicitud WO2005/097791 (D1).

Compound 1: (S)-N-((S)-1-ciclohexyl-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoyl)-thiazol-2-yl]-pyrrolidin-1-yl)-2-oxo-ethyl)-2-methylamino-propionamide

Compound 2: Example 130 of D1.



Compound 1



Compound 2

1. In vitro inhibition of cancer cell proliferation

Methods:

Treatment of SKOV3 tumor cells with IAP antagonists

On day one adherent SKOV3 cells are plated into two 96-well, clear, flat bottom plates. All wells in row A contain 90uL of media. All wells in rows B-G contain a total volume of 90uL per well and 1500 cells per well for the SKOV3 cell line. Plates are then incubated overnight for 18 hours at 37°C, 5% CO₂.

On day two, cells in plate 1 are treated with IAP antagonists. Treatments are done in triplicate. The IAP antagonists are serially diluted in media and the cells are treated with 10uL of serially diluted IAP antagonists at a final concentration of 10000nM, 2000nM, 400nM, 80nM, 16nM, 3.2nM, 0.62nM, 0.128nM, 0.026nM, and one untreated well. Plate 1 will be used to access the ability of the test compound to inhibit the growth of the SKOV3 cells after three days, while Plate 2 is used as a time zero plate ($a_{t=0}$).

To measure cell viability, 20uL of MTS/PMS* solution is added to rows containing media only and rows with cells and media. Plates are then incubated at 37°C, 5% CO₂ for two hours and absorbance (a) is read at 490nm wavelength.

On day two cell viability for plate 2 is determined and used as the time zero ($a_{t=0}$) data point for calculations below. On day five, cell viability for plate 1 is determined. Raw data is adjusted to account for the time zero plate as well as background noise. Triplicate values are averaged and percent control growth is calculated. If the absorbance (a) data point read for a particular well is greater than the time zero absorbance data point ($a_{t=0}$), the percent growth control is calculated by the following equation: $100 * [(a) - (a_{t=0})] / [(72\text{hour total growth}) - (a_{t=0})]$. Otherwise, the percent

growth control is calculated by the equation: $100 \cdot [(a) - (a_{t=0})] / [(a_{t=0})]$. Data is represented by line graph with the concentration of compound on the x axis and percent control growth on the y axis.

*MTS is purchased from Promega Corporation, catalog number G1111. PMS is purchased from Sigma, catalog number P-5812. MTS is prepared according to manufacturer's instructions, and PMS is added to the MTS solution at 20% of the final volume.

Results:

		Compound 1	Compound 2
Cell proliferation IC ₅₀ [nM] in SKOV3 cancer cells (avg)	citrate salt form	4.75 (StdDev 1.77)	65 (StdDev 5)
	trifluoroacetate salt form	2.45 (StdDev 2.38)	45

2. In vitro stability to metabolism by rat or human liver microsomes

Methods:

Both Compound 1 and Compound 2 (comparable salt forms) were evaluated *in vitro* for metabolic stability using preparations of human and rat livers enriched for the major drug metabolizing enzymes, Cytochromes P450 (CYPs) and Uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs). Briefly, hepatic endoplasmic reticulum membrane fractions (microsomes) were first pretreated with alamethacin (25 µg/mg liver microsomes) and then suspended to 0.5 mg/mL in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, and supplemented with 2.0 mM MgCL2, 1.0 mM CYP cofactor (NADPH*), 1.0 mM UGT cofactor (UDPGA*) and 1.0 µM test article. At <1, 5, 20 and 30 minutes, the incubation mixture was sampled by LC-MS/MS for loss of test article as a measure of *in vitro* half-life (t_{1/2}) and intrinsic metabolic clearance (CL_{int}, µL/min/mg).

*NADPH, b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; UDPGA, uridine 5'-diphosphoglucuronic acid

Results:

		Compound 1	Compound 2
in vitro rat liver microsome metabolism parameters (trifluoroacetate form tested)	Intrinsic Clearance [µl min-1 mg-1]	22	70
	Intrinsic Clearance rank	low	med
	t _{1/2} [min]	63	20

in vitro human liver microsome metabolism parameters (trifluoroacetate form tested)	Intrinsic Clearance [µl min-1 mg-1]	56	107
	Intrinsic Clearance rank	med	med
	t _{1/2} [min]	25	13

3. In vivo pharmacokinetic parameters in mice

Methods:

7-10 weeks old tumor implanted mice were administered with intravenous dose of Compound 1 or Compound 2. A total of 12 animals were dosed with each compound as their citrate salts in aqueous formulation vehicle. Two animals were sacrificed at each time point of 0.083, 0.5, 2, 4, 8, and 16 h after dosing and blood and tumor was collected. Further, blood was centrifuged to obtain plasma and excised tumors were homogenized. Plasma and tumor homogenates were analyzed for unchanged drug concentrations using LC/MS/MS analysis and data was used for calculation of pharmacokinetic parameters. A graph of plasma concentration-time profile was generated and area under the curve (AUC) was calculated using trapezoidal rule with WinNonlin software. The software was also used to calculate plasma clearance (CL) using the formula of (CL= Dose/AUC0-inf). Elimination rate constant (kel) was determined from slope of last 2-3 plasma time points, and half-life (t1/2) was calculated using formula of (t1/2 = 0.693/kel).

Results:

in vivo plasma PK parameters in tumor implanted nude mice	Salt Dosed	Compound 1	Compound 2
	Dose (mg/kg) (citrate salt)	citrate	citrate
	Dose (free base)(mg/kg)	25	25
	Dose (free base)(mg/kg)	18,1	18
	Route	iv	iv
	AUC0-16h (nM.h)	18086	10994
	Dose normalized AUC (nM.h/mg/kg)	999	611
	Cmax (nM)	15530	7645
	Tmax (h)	0,083	0,083
	t _{1/2} * (h) [based on last 3 measurable timepoints with uniform weighting]	1,5	0,8
	Volume of distribution at steady state (Vss) (mL/kg)	2222	2570
	Clearance (Cl) (mL/h/kg)	1999	3391