

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 809**

51 Int. Cl.:

C07D 417/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2013** **E 16189661 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 3133073**

54 Título: **Inhibidores de IAP**

30 Prioridad:

03.01.2012 US 201261582760 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.06.2018

73 Titular/es:

CURIS, INC. (50.0%)
4 Maguire Road
Lexington, MA 02421, US y
GENENTECH, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

COHEN, FREDERICK;
FLYGARE, JOHN A.;
GAZZARD, LEWIS J. y
TSUI, VICKIE HSIAO-WEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de IAP

La presente invención se refiere a un método para preparar compuestos orgánicos útiles para la terapia y/o la profilaxis en un mamífero, y, en particular, a inhibidores de las proteínas IAP útiles para el tratamiento del cáncer.

5 Antecedentes de la invención

La apoptosis o la muerte celular programada es un mecanismo regulado genéticamente y bioquímicamente que juega un papel importante en el desarrollo y la homeostasis en los invertebrados, así como en los vertebrados. Las aberraciones en la apoptosis que conducen a la muerte celular prematura se han relacionado con una variedad de trastornos del desarrollo. Las deficiencias en la apoptosis que resultan en la falta de muerte celular se han relacionado con el cáncer y las infecciones virales crónicas (Thompson et al., (1995) *Science* 267, 1456-1462).

10 Una de las moléculas efectoras clave en la apoptosis es la caspasa (proteasa específica de aspartato que contiene cisteína). Las caspasas son proteasas fuertes, que dividen después de los restos de ácido aspártico y una vez activadas, digieren las proteínas celulares vitales desde dentro de la célula. Ya que las caspasas son proteasas tan fuertes, es necesario un control estricto de esta familia de proteínas para evitar la muerte celular prematura. En general, las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos en gran medida que requieren un procesamiento proteolítico con el fin de ser activas. Este procesamiento proteolítico es sólo una de las formas en que se regulan las caspasas. El segundo mecanismo es a través de una familia de proteínas que se unen e inhiben las caspasas.

20 Una familia de moléculas que inhiben las caspasas son los inhibidores de la apoptosis (IAP) (Deveraux et al, *J Clin Immunol* (1999), 19: 388-398). Los IAP fueron descubiertos originalmente en los baculovirus por su capacidad funcional para sustituir a la proteína P35, un gen anti-apoptótico (Crook y col. (1993) *J Virología* 67, 2168-2174). Los IAP se han descrito en organismos que van desde la *Drosophila* al ser humano. Independientemente de su origen, estructuralmente, los IAP comprenden de uno a tres dominios de repetición de IAP de baculovirus (BIR), y la mayoría de ellos también poseen un motivo RING finger carboxilo-terminal. El dominio BIR en sí es un dominio de unión de zinc de aproximadamente 70 restos que comprende 4 hélices alfa y láminas beta 3, con restos cisteína e histidina que coordinan el ion zinc (Hinds et al., (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6,648-651). Es el dominio BIR el que se cree que causa el efecto anti-apoptótico mediante la inhibición de las caspasas y, por tanto, la inhibición de la apoptosis. Como un ejemplo, el IAP ligado al cromosoma X humano (XIAP) inhibe a la caspasa 3, caspasa 7 y la activación de la caspasa 9 mediada por Apaf-1-citocromo C (Deveraux et al., (1998) *EMBO J.* 17, 2215-2223). Las caspasas 3 y 7 son inhibidas por el dominio BIR2 de XIAP, mientras que el dominio BIR3 de XIAP es responsable de la inhibición de la actividad de la caspasa 9. XIAP se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos adultos y fetales (Liston et al., *Nature*, 1996, 379 (6563): 349), y se sobreexpresa en una serie de líneas celulares tumorales del panel de la línea celular NCI 60 (Fong et al, *Genomics*, 2000, 70: 113; Tamm et al, *Clin. Cancer Res.* 2000, 6(5): 1796). La sobreexpresión de XIAP en células tumorales se ha demostrado que confiere protección contra una variedad de estímulos pro-apoptóticos y promueve la resistencia a la quimioterapia (LaCasse et al, *Oncogene*, 1998, 17 (25): 3247). Consistente con esto, se ha demostrado una fuerte correlación entre los niveles de proteína XIAP y la supervivencia para los pacientes con leucemia mielógena aguda (Tamm et al, *supra*). El descenso de regulación de la expresión de XIAP por oligonucleótidos antisentido se ha demostrado que sensibiliza a las células tumorales a la muerte inducida por una amplia gama de agentes pro-apoptóticos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sasaki et al, *Cancer Res.*, 2000, 60 (20): 5659; Lin et al, *Biochem J.*, 2001, 353: 299; Hu et al, *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9 (7): 2826). También se ha demostrado que los péptidos derivados de Smac/DIABLO sensibilizan a un número de diferentes líneas de células tumorales frente a la apoptosis inducida por una variedad de fármacos pro-apoptóticos (Arnt et al, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (46): 44236; Fulda et al., *Nature Med.*, 2002, 8 (8): 808; Guo et al, *Blood*, 2002, 99 (9): 3419; Vucic et al, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (14): 12275; Yang et al, *Cancer Res*, 2003, 63 (4): 831).

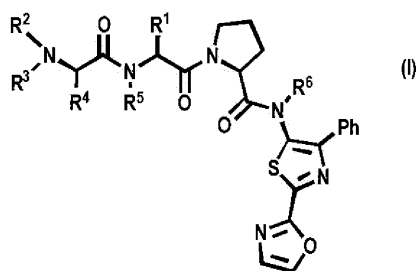
45 El IAP de melanoma (ML-IAP) es un IAP no detectable en la mayoría de los tejidos de adultos normales, pero está fuertemente regulado positivamente en el melanoma (Vucic et al, (2000) *Current Bio.* 10: 1359-1366). La determinación de la estructura de la proteína demostró una homología significativa del ML-IAP BIR y los dominios RING finger frente a los dominios correspondientes presentes en XIAP humano, C-AIDP y C-IAP2. El dominio BIR de ML-IAP parece tener la mayor cantidad de similitudes con el BIR2 y BIR3 de XIAP, C-IAP1 y C-IAP2, y parece ser responsable de la inhibición de la apoptosis, tal como se determina por el análisis de delección. Además, Vucic et al. demostraron que ML-IAP podía inhibir la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos. Agentes, tales como adriamicina y butilfenol 4-terciario (4-TBP), se ensayaron en un sistema de cultivo celular de melanomas que sobreexpresaban ML-IAP y los agentes quimioterapéuticos fueron significativamente menos eficaces en la eliminación de las células en comparación con un control normal de los melanocitos. El mecanismo por el cual ML-IAP produce una actividad anti-apoptótica es, en parte, a través de la inhibición de la caspasa 3 y 9. ML-IAP no inhibió eficazmente las caspasas 1, 2, 6, u 8.

Dado que la apoptosis es una ruta estrictamente controlada con múltiples factores que interactúan, el descubrimiento de que los PAI en sí mismos se regulan no era inusual. En la mosca de la fruta *Drosophila*, las proteínas Reaper (RPR), Head Involution Defective (HID) y GRIM interactúan físicamente e inhiben la actividad anti-apoptótica de la familia de los PAI de *Drosophila*. En los mamíferos, las proteínas SMAC/DIABLO actúan para

5 bloquear a los IAP y permiten que la apoptosis proceda. Se ha demostrado que durante la apoptosis normal, SMAC se procesa en una forma activa y se libera de la mitocondria en el citoplasma donde se une físicamente a IAPs y evita que el IAP se una a una caspasa. Esta inhibición de IAP permite que la caspasa permanezca activa y que así proceda con la apoptosis. Curiosamente, la homología de secuencia entre los inhibidores de IAP muestra que existe un motivo de cuatro aminoácidos en el extremo N-terminal de las proteínas activas procesadas. Este tetrapéptido parece unirse en un bolsillo hidrofóbico en el dominio BIR e interrumpe la unión de las caspasas al dominio BIR (Chai et al, (2000), Nature 406: 855-862, Liu et al, (2000), Nature 408: 1004- 1008, Wu et al., (2000), Nature 408 1008- 1012).

Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para preparar nuevos inhibidores de proteínas IAP que tienen la fórmula general (I)



en la que

R^1 es cicloalquilo C_{3-7} ,

15 Ph es fenilo,

R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son cada uno independientemente en cada aparición H o alquilo C_{1-6} , o

una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

La fórmula I incluye todos los estereoisómeros.

20 En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden compuestos de fórmula I y un vehículo, diluyente o excipiente.

En otro aspecto, se proporciona un método para inducir la apoptosis en una célula que comprende introducir en dicha célula un compuesto de fórmula I.

En otro aspecto, se proporciona un método para sensibilizar una célula frente a una señal apoptótica que comprende introducir dentro de dicha célula un compuesto de fórmula I.

25 En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la unión de una proteína IAP a una proteína de caspasa que comprende poner en contacto dicha proteína IAP con un compuesto de fórmula I.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una enfermedad o condición asociada con la sobreexpresión de una proteína IAP en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I

30 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra la eficacia de la solo, así como en combinación con Apomab, junto con los datos de eficacia para el compuesto III de la técnica anterior solo y en combinación con Apomab, en el modelo de xenoinjerto utilizando células de adenocarcinoma de pulmón Calu-6. la se administró p.o. III se administró i.v. Se seleccionaron las dosis para producir la dosis máxima tolerada del fármaco.

La figura 2 muestra la eficacia de la solo, así como en combinación con Apomab, junto con los datos de eficacia para el compuesto III de la técnica anterior solo y en combinación con Apomab, en el modelo de xenoinjerto utilizando células de adenocarcinoma colorrectal Colo205. la se administró p.o. III se administró i.v. Se seleccionaron las dosis para producir la dosis máxima tolerada del fármaco.

El término de la entidad "un" o "una", tal como se utiliza en este documento, se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o a al menos a un compuesto. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en la presente memoria.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, ya sea en una frase de transición o en el cuerpo de la solicitud, los términos "comprende(n)" y "que comprende" se han de interpretar como teniendo un significado abierto. Es decir, los términos se han de interpretar como sinónimos de las frases "que tiene al menos" o "que incluye al menos". Cuando se utiliza en el contexto de un proceso, la expresión "que comprende" significa que el proceso incluye al menos las etapas citadas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se utiliza en el contexto de un compuesto o composición, la expresión "que comprende" significa que el compuesto o la composición incluyen al menos las características o componentes citados, pero pueden incluir también características o componentes adicionales.

10 El término "independientemente" se usa en este documento para indicar que una variable se aplica en cualquier instancia sin tener en cuenta la presencia o ausencia de una variable que tiene la misma o una definición diferente dentro del mismo compuesto. Así, en un compuesto en el que R" aparece dos veces y se define como "independientemente carbono o nitrógeno", ambos R" pueden ser carbono, ambos R" pueden ser nitrógeno, o un R" puede ser carbono y el otro nitrógeno.

15 El término "opcional" u "opcionalmente", como se usa en el presente documento, significa que un acontecimiento o circunstancia descritos posteriormente pueden ocurrir, aunque no lo necesitan, y que la descripción incluye casos en los que ocurre y casos en que no lo hace el evento o circunstancia. Por ejemplo, "opcionalmente sustituido" significa que el resto opcionalmente sustituido puede incorporar un hidrógeno o un sustituyente.

20 El término "aproximadamente" se usa en este documento para significar aproximadamente, en la región de, más o menos, o alrededor. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza en conjunción con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" se utiliza en este documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado por una varianza del 20%.

25 Como se usa en este documento, la recitación de un intervalo numérico para una variable pretende dar a entender que la invención puede ponerse en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Por lo tanto, para una variable que es inherentemente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero del intervalo numérico, incluyendo los puntos extremos del intervalo. Del mismo modo, para una variable que es inherentemente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real del intervalo numérico, incluyendo los puntos extremos del intervalo. Como ejemplo, una variable que se describe que tiene valores entre 0 y 2, puede ser 0, 1 ó 2 para variables que son inherentemente discretas, y puede ser 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualquier otro valor real para variables que son inherentemente continuas.

30 Los compuestos de fórmula I presentan tautomería. Los compuestos tautómeros pueden existir como dos o más especies interconvertibles. Los tautómeros prototrópicos resultan de la migración de un átomo de hidrógeno unido covalentemente entre dos átomos. Los tautómeros generalmente existen en equilibrio y los intentos de aislar un tautómero individual normalmente producen una mezcla cuyas propiedades químicas y físicas son consistentes con una mezcla de compuestos. La posición del equilibrio depende de las características químicas dentro de la molécula. Por ejemplo, en muchos aldehídos y cetonas alifáticos, tales como acetaldehído, la forma ceto predomina mientras que; en fenoles, la forma enol predomina. Los tautómeros prototrópicos comunes incluyen tautómeros ceto/enol (-C(=O)-CH- \rightleftharpoons C(OH)=CH-), amida/ácido imídico (-C(=O)-NH- \rightleftharpoons -C(OH)=N-) y amidina (-C(=NR)-NH-C- \rightleftharpoons (-NHR)=N-). Los dos últimos son particularmente comunes en anillos heteroarilo y heterocíclicos. La presente invención abarca todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en este documento.

35 "Alquilo" significa un grupo hidrocarburo alifático saturado ramificado o no ramificado que tiene hasta 6 átomos de carbono a menos que se especifique lo contrario, también cuando se utiliza como parte de otro término, por ejemplo "alquilamino". Ejemplos de grupos alquilo preferidos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 2-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, y similares. Los términos "alquilo inferior" "alquilo C₁-C₄" y "alquilo de 1 a 4 átomos de carbono" son sinónimos y se usan de forma intercambiable para significar metilo, etilo, 1-propilo, isopropilo, ciclopropilo, 1-butilo, sec-butilo o t-butilo.

40 Los grupos cicloalquilo pueden ser anillos alifáticos mono-, bi- o tricíclicos de 3 a 7 átomos de carbono. Los grupos preferidos incluyen los grupos ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo y más preferidos son ciclopropilo y ciclohexilo y más preferido es el ciclohexilo.

45 "Grupo protector de amino" se refiere a un derivado de los grupos comúnmente empleados para bloquear o proteger un grupo amino mientras que las reacciones se llevan a cabo en otros grupos funcionales en el compuesto. Ejemplos de tales grupos protectores incluyen los carbamatos, amidas, grupos alquilo y arilo, iminas, así como muchos derivados de N-heteroátomos que pueden eliminarse para regenerar el grupo amina deseado. Los grupos protectores de amino preferidos son Boc, Fmoc y Cbz. Otros ejemplos de estos grupos se encuentran en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª ed, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N. Y., 1991, capítulo 7.; E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press,

Nueva York, N. Y., 1973, Capítulo 5, y T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Nueva York, N. Y., 1981. La expresión "amino protegido" se refiere a un grupo amino sustituido con uno de los grupos protectores de amino mencionados. Estos grupos se pueden utilizar durante la síntesis.

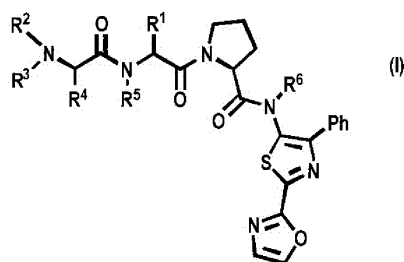
5 "Grupo protector de carboxi" se refiere a uno de los derivados éster del grupo ácido carboxílico comúnmente empleados para bloquear o proteger el grupo ácido carboxílico mientras se realizan reacciones sobre otros grupos funcionales en el compuesto. Ejemplos de tales grupos protectores de ácido carboxílico incluyen 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,4,6-trimetoxibencilo, 2,4,6-trimetilbencilo, pentametilbencilo, 3,4-metilendioxibencilo, benzhidrilo, 4,4'-dimetoxibenzhidrilo, 2,2',4,4'-tetrametoxibenzhidrilo, alquilo tal como t-butilo o t-amilo, tritilo, 4-metoxitritilo, 4,4'-dimetoxitritilo, 4,4',4'-trimetoxitritilo, 2-fenilprop-2-ilo, trimetilsililo, t-butildimetilsililo, fenacilo, 2,2,2-tricloroetilo, beta-(trimetilsilil)etilo, beta-(di(n-butil)metilsilil)etilo, p-toluenosulfoniletilo, 4-nitrobencilsulfoniletilo, aliilo, cinamilo, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-en-3-ilo y restos similares. La especie de grupo protector de carboxi empleada no es crítica siempre que el ácido carboxílico derivatizado sea estable en las condiciones de reacción subsiguiente(s) en otras posiciones de la molécula y pueda eliminarse en el punto apropiado sin alterar el resto de la molécula. En particular, es importante no someter una molécula carboxi-protegida a bases nucleófilas fuertes, tales como hidróxido de litio o NaOH, o condiciones reductoras que emplean hidruros metálicos altamente activados tales como LiAlH₄. (Tales condiciones de eliminación severas son también a evitar al retirar los grupos protectores de amino y grupos protectores de hidroxilo). Los grupos protectores de ácido carboxílico preferidos son los grupos alquilo (por ejemplo, grupos metilo, etilo, t-butilo), aliilo, bencilo y p-nitrobencilo. Los grupos protectores de carboxi similares utilizados en la ténica de la cefalosporina, penicilina y péptidos también se pueden utilizar para proteger a sustituyentes del grupo carboxi. Otros ejemplos de estos grupos se encuentran en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª ed, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N. Y., 1991, capítulo 5.; E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, Nueva York, N. Y., 1973, Capítulo 5, y T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Nueva York, N. Y., 1981, Capítulo 5. La expresión "carboxi protegido" se refiere a un grupo carboxi sustituido con uno de los grupos protectores de carboxi anteriores. Estos grupos se pueden utilizar durante la síntesis.

30 "Grupo protector de hidroxilo" se refiere a un derivado del grupo hidroxilo empleado comúnmente para bloquear o proteger el grupo hidroxilo mientras que las reacciones se llevan a cabo en otros grupos funcionales en el compuesto. Ejemplos de tales grupos protectores incluyen los grupos tetrahidropiraniilo, benzoilo, acetoxi, carbamilo, bencilo, y sililéteres (por ejemplo, TBS, TBDPS). Otros ejemplos de estos grupos se encuentran en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª ed, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N. Y., 1991, capítulo 2-3.; E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, Nueva York, N. Y., 1973, Capítulo 5, y T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Nueva York, N. Y., 1981. La expresión "hidroxilo protegido" se refiere a un grupo hidroxilo sustituido con uno de los grupos protectores de hidroxilo anteriores. Estos grupos se pueden utilizar durante la síntesis.

"Inhibidor" significa un compuesto que reduce o impide la unión de proteínas IAP a las proteínas de caspasa o que reduce o impide la inhibición de la apoptosis por una proteína IAP (por ejemplo, c-IAP1, c-IAP2, X-IAP o ML-IAP). Alternativamente, "inhibidor" significa un compuesto que impide la interacción de la unión de X-IAP con caspasas o la interacción de la unión de ML-IAP con SMAC.

40 "Sales farmacéuticamente aceptables" incluye tanto sales de adición de ácidos como de bases. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y que no son biológicamente o de otra forma indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos pueden ser seleccionadas de las clases alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos, y sulfónicos de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido maloneico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. "Sales de adición de base farmacéuticamente aceptables" incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Particularmente preferidas son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas de origen natural sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, poliaminas y similares. Bases particularmente no tóxicas orgánicas preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína. La Fórmula I también se pretende que abarque hidratos y solvatos de los compuestos.

La presente invención proporciona nuevos compuestos que tienen la fórmula general I,



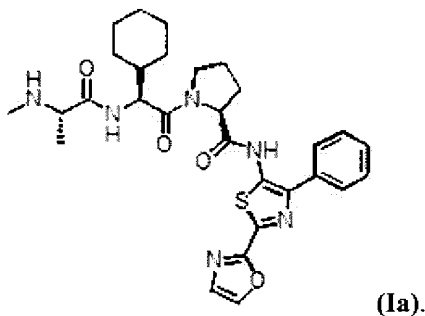
En una realización específica, R¹ es ciclohexilo. En otra realización específica, R¹ es ciclopentilo. En una realización particular, R¹ está orientado de tal manera que el aminoácido, o un análogo del aminoácido, que lo comprende está en la configuración L.

5 R² y R³ son independientemente H o alquilo C₁₋₆. En una realización, R² y R³ son ambos H. En otra realización, R² es metilo y R³ es H.

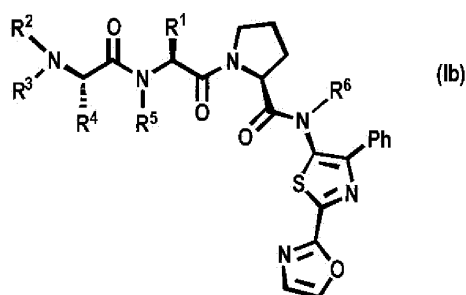
R⁴ es H o alquilo C₁₋₆. En una realización específica, R⁴ es H o metilo. En otra realización, R⁴ es metilo. En otra realización, R⁴ está orientado de tal manera que el aminoácido, o un análogo del aminoácido, que lo comprende está en la configuración L.

10 R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆. En una realización, R⁵ y R⁶ son H o metilo. En una realización, R⁵ es H y R⁶ es metilo. En otra realización, R⁵ es metilo y R⁶ es H. En otra realización, R⁵ y R⁶ son ambos metilo. En otra realización, R⁵ y R⁶ son ambos H.

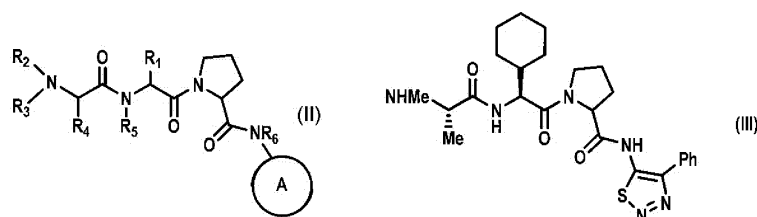
En otro aspecto de la presente invención, el compuesto según la fórmula I es (2-oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidina-2-carboxílico (Ia).



15 Los compuestos de la invención contienen uno o más átomos de carbono asimétricos. De acuerdo con ello, los compuestos pueden existir como estereoisómeros, incluyendo diastereoisómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. Las síntesis de los compuestos pueden emplear racematos, diastereoisómeros o enantiómeros como materiales de partida o como productos intermedios. Los compuestos diastereómeros se pueden separar por métodos cromatográficos o de cristalización. Del mismo modo, las mezclas de enantiómeros se pueden separar por métodos cromatográficos o de cristalización. Cada uno de los átomos de carbono asimétricos puede estar en la configuración R o S y ambas de estas configuraciones están dentro del alcance de la invención. Preferiblemente, los compuestos de la invención tienen la siguiente configuración estereoquímica de la fórmula Ib en la que R¹, R², R³, R⁵ y R⁶ son como se describen en el presente documento.



25 Los compuestos de fórmula II, en la que A es un heterociclo de 5 miembros opcionalmente sustituido que comprende de 1 a 4 heteroátomos se han descrito en la Publicación de Estados Unidos N° 20060014700. En algunos compuestos descritos en esta publicación A es N-(4-feniltiazol-5-ilo).

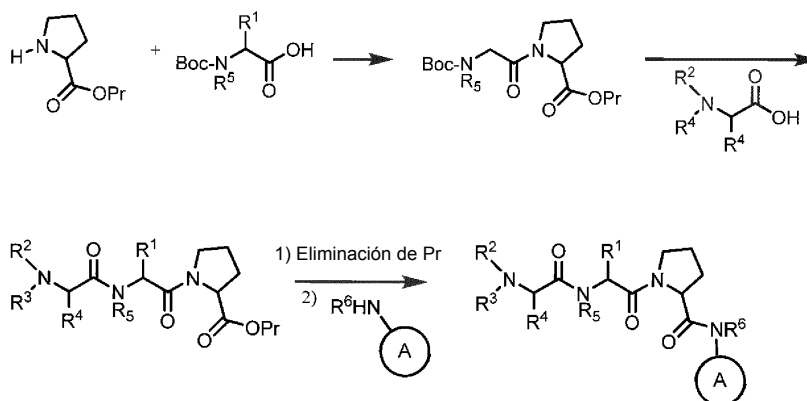


Ahora se ha encontrado que los compuestos en los que A es 2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol-5-ilo por la invención proporcionan un aumento inesperado en la potencia y la biodisponibilidad oral. Además, los compuestos de la invención tienen efectos secundarios generalmente más bajos, incluyendo la mejora de la toxicidad pulmonar, por ejemplo, en comparación con el compuesto III, un compuesto descrito en la Publicación de Estados Unidos N° 20060014700. Las Figs. 1 y 2 muestran una actividad comparativa en modelos de tumor de xenoinjerto entre la administración iv del compuesto III, en comparación con el compuesto la de la presente invención administrado oralmente.

Síntesis

Los compuestos de la invención se preparan usando técnicas de síntesis orgánica estándar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles y reactivos. Las técnicas generales se describen en el documento WO 98/46576 y la patente de EE.UU. No. 7.244.851, que se incorporan por referencia a la presente memoria para los métodos de preparación descritos en ellas. Se apreciará que los procedimientos sintéticos empleados en la preparación de compuestos de la invención dependerán de los sustituyentes particulares presentes en un compuesto y que pueden ser necesarios varias protecciones y desprotecciones como es habitual en la síntesis orgánica. En un esquema sintético general, los compuestos de la invención se pueden preparar utilizando técnicas típicas de la química de péptidos mediante el acoplamiento de los análogos de restos de aminoácidos con los procedimientos de acoplamiento de amida típicos. En el esquema 1, los análogos de restos de aminoácidos amino-protectados se acoplan y se desprotegen secuencialmente para dar los compuestos finales utilizando protocolos de síntesis de péptidos.

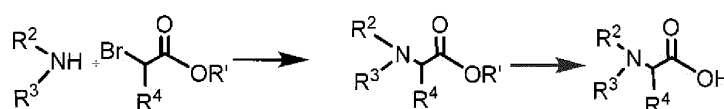
Esquema 1



Se apreciará que los análogos de aminoácidos pueden acoplarse en cualquier orden y se pueden preparar usando soportes en fase sólida que son de rutina en la técnica.

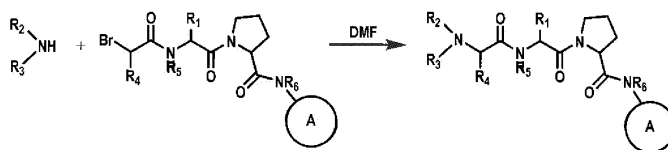
Cuando los compuestos de la invención incorporan sustituyentes R² o R³ distintos de H, también se pueden preparar por sustitución de un ácido adecuado intermedio que incorpora un grupo saliente con una amina deseada. Por ejemplo Br-CH(R⁴)-C(O)-OH está sustituido con una amina R²-NH₂ o R²-NH-R³ de acuerdo con el esquema 2.

Esquema 2



Alternativamente, la reacción de sustitución mediante la introducción de los sustituyentes R² o R³ puede llevarse a cabo como una etapa final en la preparación del compuesto como se ilustra en el esquema 3.

Esquema 3

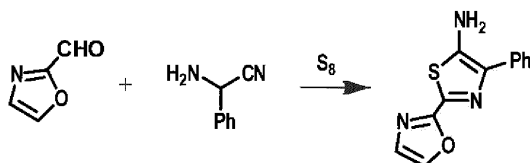


En una realización particular, el ácido 2-bromopropiónico se hace reaccionar con las aminas apropiadas disueltas en DMF y burbujeadas hasta que la sustitución esté completa para formar el resto de alanina N-sustituido.

- 5 Los compuestos de anillo A sustituidos con amina que sirven como intermedio para la preparación de los compuestos de la invención están disponibles comercialmente o bien se preparan a partir de reactivos disponibles en el mercado que emplean técnicas estándar de química orgánica. La 2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol-5-amina se puede preparar por condensación de un hidrocloreto de α -aminofenilacetnitrilo y oxazol-2-carbaldehído en presencia de azufre y TEA (Esquema 4).

10

Esquema 4



Utilidad

- 15 Los compuestos de la invención inhiben la unión de proteínas IAP a las caspasas, en particular, la interacción de unión de X-IAP a las caspasas 3 y 7. Los compuestos también inhiben la unión de ML-IAP a la proteína Smac. De acuerdo con ello, los compuestos de la invención son útiles para inducir la apoptosis en células o la sensibilización de las células a las señales de apoptosis, en las células de cáncer en particular. Los compuestos de la invención son útiles para inducir la apoptosis en células que sobreexpresan proteínas IAP (por ejemplo, c-IAP1, c-IAP2, X-IAP o ML-IAP). Alternativamente, los compuestos de la invención son útiles para inducir la apoptosis en células en las que la ruta apoptótica mitocondrial se altera de tal manera que la liberación de Smac a partir de proteínas ML-IAP se inhibe, por ejemplo, hasta la sobre-regulación de Bc1-2 o la infra-regulación de Bax/Bak. En términos más generales, los compuestos se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer.

- 25 Son especialmente útiles para el tratamiento de todos los tipos de cáncer que no pueden sufrir apoptosis. Los ejemplos de tales tipos de cáncer incluyen neuroblastoma, carcinoma del intestino tales como el carcinoma de recto, carcinoma de colon, carcinoma de la poliposis adenomatosa familiar y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, carcinoma de esófago, carcinoma labial, carcinoma de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de las pinzas, carcinoma de glándula salival, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma renal, carcinoma parénquima renal, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de corpus uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma de corion, carcinoma pancreático, carcinoma de próstata, carcinoma testicular, carcinoma de mama, carcinoma urinario, melanoma, tumores cerebrales tales como el glioblastoma, astrocitoma, meningioma, el meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, la leucemia linfática aguda (ALL), leucemia linfática crónica (LLC), la leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de leucemia de células T del adulto, carcinoma hepatocelular, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma bronquial, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma coroidea, seminoma, rhabdomyosarcoma, craneofaringioma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, el sarcoma de Ewing y plasmocitoma. Útil es el tratamiento de tumores sólidos. Útil también es el tratamiento de cáncer de mama, adenocarcinoma de páncreas o el melanoma maligno.

- 35 Los compuestos de la invención son útiles para sensibilizar células frente a las señales de apoptosis. En consecuencia, los compuestos se pueden administrar antes de, concomitantemente con, o después de la administración de la radioterapia o quimioterapia citostática o antineoplásica. Los compuestos quimioterapéuticos citostáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a (i) antimetabolitos, tales como citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, hidroxiurea o metotrexato; (ii) agentes de fragmentación de ADN, tales como bleomicina, (iii) agentes de reticulación de ADN, tales como clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida o mostaza nitrogenada; (iv) agentes intercalantes tales como adriamicina (doxorubicina) o mitoxantrona; (v) inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina o toxina de la difteria; (vi) venenos de la topoisomerasa I, tales como camptotecina o topotecán; (vii) venenos de la topoisomerasa II, tales como etopósido (VP-16) o tenipósido; (viii) agentes dirigidos a microtúbulos, tales como colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina o vincristina; (ix) inhibidores de la quinasa tales como flavopiridol, estaurosporina, ST1571 (CPG 57148B) o UCN-01 (7-

hidroxiestaurosporina); (x) agentes de investigación diversos tales como tioplatino, PS-341, fenilbutirato, ET-18-OCH₃, o inhibidores de la farnesil transferasa (L-739749, L-744832); polifenoles tales como quercetina, resveratrol, piceatannol, galato de epigallocatequina, teaflavinas, flavanoles, procianidinas, ácido betulínico y derivados del mismo; (xi) hormonas tales como glucocorticoides o fenretinida; (xii) antagonistas de hormonas, tales como tamoxifeno, finasterida o antagonistas de LHRH. En una realización preferida, los compuestos de la presente invención se coadministran con un compuesto citostático seleccionado del grupo que consiste en cisplatino, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel y mitomicina C. Lo más preferido, el compuesto citostático es doxorubicina. Son útiles las combinaciones con 5-FU, gemcitabina, capecitabina, vinorelbina, bevacizumab, o taxanos.

Otra clase de compuestos activos que se pueden utilizar en la presente invención son aquellos que son capaces de sensibilizar o inducir la apoptosis por unión a receptores de muerte ("agonistas de los receptores de muerte"). Tales agonistas de receptores de muerte incluyen ligandos de receptores de muerte tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (TNF- β , linfotóxina- α), LT- β (linfotóxina- β), TRAIL (Apo2L, ligando DR4), ligando CD95 (Fas, APO-1), ligando TRAMP (DR3, Apo-3), ligando DR6 así como fragmentos y derivados de cualquiera de dichos ligandos. Preferiblemente, el ligando del receptor de muerte es TNF- α . Más preferiblemente, el ligando del receptor de muerte es Apo2L/TRAIL. Por otra parte, los receptores de muerte agonistas comprenden anticuerpos agonistas a los receptores de muerte tales como anticuerpo anti-CD95, anticuerpo anti-TRAIL-R1 (DR4), anticuerpo anti-TRAIL-R2 (DR5), anticuerpo anti-TRAIL-R3, anticuerpo anti-TRAIL-R4, anti-DR6, anticuerpo anti-TNF-R1 y anticuerpo anti-TRAMP (DR3) así como fragmentos y derivados de cualquiera de dichos anticuerpos.

A los efectos de sensibilización de las células para la apoptosis, los compuestos de la presente invención pueden también utilizarse en combinación con radioterapia. El término "radioterapia" se refiere a la utilización de radiación electromagnética o de partículas en el tratamiento de la neoplasia. La radioterapia se basa en el principio de que altas dosis de radiación suministradas a una zona objetivo darán lugar a la muerte de la reproducción de las células tanto en tejidos tumorales como normales. El régimen de dosificación de la radiación se define generalmente en términos de dosis de radiación absorbida (rad), tiempo y fraccionamiento, y debe ser cuidadosamente definido por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de varias consideraciones, pero las dos consideraciones más importantes son la localización del tumor en relación con otras estructuras críticas u órganos del cuerpo, y la medida en la que el tumor se ha diseminado. Ejemplos de agentes radioterapéuticos se proporcionan, pero no se limitan a, radioterapia y se conocen en la técnica (Hellman, Principles of Radiation Therapy, Cancer, en Principles I and Practice of Oncology, 24875 (Devita et al., Cuarta ed., vol 1, 1993). Los recientes avances en la radioterapia incluyen radiación de haz externo tridimensional conformal (IMRT), radioterapia de intensidad modulada, radiocirugía estereotáctica y braquiterapia (radioterapia intersticial), esta última colocando la fuente de radiación directamente en el tumor como "semillas" implantadas. Estas modalidades de tratamiento más nuevas ofrecen mayores dosis de radiación al tumor, lo que explica su mayor eficacia en comparación con la radioterapia de haz externo estándar.

La radiación ionizante con radionucleidos emisores beta se considera la más útil para aplicaciones radioterapéuticas debido a la transferencia de energía lineal moderada (LET) de la partícula ionizante (electrón) y su alcance intermedio (típicamente varios milímetros en el tejido). Los rayos gamma suministran dosis a niveles inferiores sobre distancias mucho mayores. Las partículas alfa representan el otro extremo, que entregan dosis LET muy altas, pero tienen un alcance extremadamente limitado y deben, por lo tanto, estar en contacto íntimo con las células del tejido a tratar. Además, los emisores alfa son generalmente metales pesados, lo que limita la posible química y presenta peligros indebidos por fugas de radionucleidos de la zona a tratar. Dependiendo del tumor a tratar todo tipo de emisores son concebibles dentro del alcance de la presente invención.

Además, la presente invención abarca tipos de radiación no ionizante, como por ejemplo, ultravioleta (UV), luz visible de alta energía, radiación de microondas (terapia de hipertermia), infrarrojo (IR) y el láser. En una realización particular de la presente invención, se aplica la radiación UV.

Más en general, los compuestos de la invención se pueden usar en terapia de combinación. La "terapia de combinación" incluye la administración de los presentes compuestos en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero no limitados a, un segundo y diferente agente antineoplásico) y tratamientos no farmacológicos (tales como, pero no limitados a, la cirugía o el tratamiento por radiación). Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden usar en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, preferiblemente compuestos que son capaces de aumentar el efecto de los compuestos de la invención. Los compuestos de la invención se pueden administrar simultáneamente (como una sola preparación o preparación por separado) o secuencialmente a la otra terapia con fármacos. En general, una terapia de combinación contempla la administración de dos o más fármacos durante un único ciclo o curso de la terapia.

Por lo tanto, en un aspecto de la invención, los presentes compuestos se pueden administrar en combinación con uno o más agentes distintos que modulan las proteínas quinasas implicadas en diversos estados o dianas consecuentes de las mismas. Ejemplos de tales quinasas pueden incluir, pero no se limitan a: quinasas específicas de serina/treonina, quinasas específicas del receptor de tirosina y quinasas específicas no receptor de tirosina. Las serina/treonina quinasas incluyen las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), quinasa específicas de meiosis (MEK), RAF y aurora quinasa. Ejemplos de familias de quinasas de receptores incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, HER2/neu, HER3, HER4, ErbB, ErbB2, ErbB3, ErbB4, Xmrk, DER,

Let23); el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF-R1, R2-GFF/BEK/CEK3, FGF-R3/CEK2, FGF-R4/TKF, KGF-R); el receptor del crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGFR) (por ejemplo, MET, RON, MAR, SEX); receptor de la insulina (por ejemplo, IGF-I-R, PI3K, AKT, mTOR); Eph (por ejemplo, CEK5, CEK8, EBK, ECK, EEK, EHK-1, 2-EHK, ELK, EPH, ERK, HEK, MDK2, MDK5, SEK); Axl (por ejemplo, Mer/NYK, Rse); RET; y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (por ejemplo, PDGF α -R, PDGF β -R, CSF1-R/FMS, SCF-R/C-KIT, VEGF-R/FLT, NEK/FLK1, FLT3/FLK2/STK-1). Las familias de tirosina quinasa de no receptor incluyen, pero no se limitan a, BCR-ABL (por ejemplo P43^{abl}, ARG); BTK (por ejemplo, ITK/EMT, TCE); CSK, FAK, FPS, JAK, SRC, BMX, FER, CDK y SYK.

En otro aspecto de la invención, los presentes compuestos se pueden administrar en combinación con uno o más agentes distintos que modulan objetivos o procesos biológicos no quinasa. Tales objetivos incluyen histona desacetilasas (HDAC), ADN metiltransferasa (DNMT), proteínas de choque térmico (por ejemplo, HSP90), inhibidores y proteosomas de erizo.

En una realización preferida, los compuestos objeto se pueden combinar con agentes antineoplásicos (por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos monoclonales, ARN antisentido, y proteínas de fusión) que inhiben uno o más objetivos biológicos tales como Erivedge, Zolinzá, Tarceva, Iressa, lapatinib, Gleevec, Sutent, Sprycel, Nexavar, CNF2024, RG108, BMS387032, Affinitak, Avastin, Herceptin, Erbitux, AG24322, PD325901, ZD6474, PD184322, Obatodax, ABT737 y AEE788. También se incluyen los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia quinasa específicas y/o receptores, por ejemplo, los mencionados en el presente documento y otros. Tales combinaciones pueden mejorar la eficacia terapéutica sobre la eficacia lograda por cualquiera de los agentes por sí solos y pueden prevenir o retrasar la aparición de variantes mutacionales resistentes.

En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos abarcan una amplia gama de tratamientos terapéuticos en el campo de la oncología. Estos agentes se administran en diversas etapas de la enfermedad para los fines de reducción de los tumores, la destrucción de las células de cáncer restantes que quedan después de la cirugía, la inducción de la remisión, el mantenimiento de la remisión y/o para aliviar los síntomas relacionados con el cáncer o su tratamiento. Ejemplos de tales agentes (algunos de los cuales también son discutidos más arriba) incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes tales como derivados del gas mostaza (mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, melfalán, ifosfamida), etileniminas (tiotepa, hexametilmelanina), alquilsulfonatos (Busulfan), hidracinas y triazinas (altretamina, procarbazona, dacarbazina y temozolomida), nitrosoureas (carmustina, lomustina y estreptozocina), ifosfamida y sales metálicas (carboplatino, cisplatino y oxaliplatino); alcaloides de plantas, tales como Podofilotoxinas (etopósido y tenipósido), taxanos (paclitaxel y docetaxel), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), y análogos de la camptotecina (irinotecán y topotecán); antibióticos anti-tumorales tales como Cromomicinas (dactinomicina y plicamicina), antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, mitoxantrona, valrubicina e idarrubicina), y antibióticos diversos tales como mitomicina, actinomicina y bleomicina; antimetabolitos tales como antagonistas de ácido fólico (metotrexato, pemetrexed, raltitrexed, aminopterina), antagonistas de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, Capecitabina, y gemcitabina), antagonistas de purina (6-mercaptopurina y 6-tioguanina) e inhibidores de la adenosina desaminasa (cladribina, fludarabina, mercaptopurina, clofarabina, tioguanina, pentostatina y nelarabina); inhibidores de la topoisomerasa tales como inhibidores de la topoisomerasa I (irinotecán, topotecán) e inhibidores de la topoisomerasa II (Amsacrine, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido); anticuerpos monoclonales (alemtuzumab, Gemtuzumabozogamicina, rituximab, trastuzumab, IbritumomabTioxetan, Cetuximab, Panitumumab, tositumomab, bevacizumab); y diversos antineoplásicos tales como los inhibidores de la ribonucleotido reductasa (hidroxiurea); inhibidor de esteroides adrenocorticales (mitotano); enzimas (asparaginasa y pegaspargasa); agentes anti-microtúbulos (estramustina); y los retinoides (bexaroteno, isotretinoína, tretinoína (ATRA), etc.

La invención también incluye composiciones farmacéuticas o medicamentos que contienen los compuestos de la invención y un vehículo terapéuticamente inerte, diluyente o excipiente, así como métodos de uso de los compuestos de la invención para preparar tales composiciones y medicamentos. Típicamente, los compuestos de fórmula I utilizados en los métodos de la invención se formulan mezclando a temperatura ambiente en el pH apropiado, y en el grado de pureza deseado, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas en una forma de administración galénica. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero preferiblemente oscila entre aproximadamente 3 a aproximadamente 8. La formulación en un tampón acetato a pH 5 es una realización adecuada.

El compuesto inhibidor para uso en esta invención es preferiblemente estéril. El compuesto ordinariamente se almacenará como una composición sólida, aunque formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas son aceptables.

La composición de la invención se formulará, dosificará y administrará de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad eficaz" del compuesto a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para el tratamiento de las enfermedades objeto, por ejemplo, para inhibir la interacción IAP con caspasas, inducir la

apoptosis o sensibilizar una célula maligna frente a una señal apoptótica. Tal cantidad está preferiblemente por debajo de la cantidad que es tóxica para las células normales, o el mamífero como un todo.

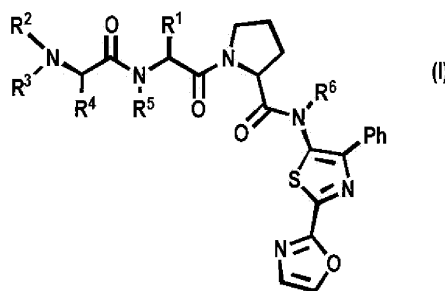
5 Generalmente, los compuestos de esta invención se pueden dosificar una vez o múltiples veces al día. También pueden ser dosificados en un horario diario continuo sin interrupciones del tratamiento. También pueden ser, por lo tanto, dosificados con pausas de tratamiento. Estas opciones también están disponibles cuando se utiliza con otros agentes o modalidades. La cantidad inicial farmacéuticamente efectiva del compuesto de la invención administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial típico de compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día. Las formas de dosificación unitaria oral, tales como comprimidos y cápsulas, contienen preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 mg del compuesto de la invención. Se prefiere la administración oral. Esquemas de dosificación continuo/interrumpido se pueden utilizar como son comunes para los tratamientos contra el cáncer, por ejemplo, una dosis oral diaria para 1, 2, 3, 4, etc., semanas, seguido de un descanso de tratamiento de 1, 2, etc., semanas, seguido por la dosificación oral diaria de 1, 2, 3, 4, etc., semanas, etc. En una opción preferida, los compuestos de la invención se dosifican diariamente en un intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 3000 mg por día, más preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1500 mg de compuesto por día.

El compuesto de la invención puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo la vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea, para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Un ejemplo de una forma de dosificación oral adecuada es un comprimido que contiene aproximadamente 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, o 500 mg del compuesto de la invención combinado con aproximadamente 90-30 mg de lactosa anhidra, aproximadamente 5-40 mg de sodio croscarmelosa, aproximadamente 5-30 mg de polivinilpirrolidona (PVP) K30, y aproximadamente 1-10 mg de estearato de magnesio. Los ingredientes en polvo se mezclan primero juntos y luego se mezclan con una solución de la PVP. La composición resultante puede ser secada, granulada, mezclada con el estearato de magnesio y se comprimen para formar el comprimido utilizando un equipo convencional. Una formulación de aerosol puede prepararse disolviendo el compuesto, por ejemplo 5-400 mg, de la invención en una solución tampón adecuada, por ejemplo un tampón fosfato, añadiendo un tónico, por ejemplo, un cloruro de sodio como sal, si se desea. La solución se filtra típicamente, por ejemplo, usando un filtro de 0,2 micrómetros, para eliminar las impurezas y contaminantes.

Más en general, los compuestos de esta invención se pueden usar de acuerdo con la descripción dada en el documento WO 98/46576 y la patente de EE.UU. N° 7.244.851, cuyas descripciones se incorporan por referencia a la presente memoria por su guía general sobre como usar los compuestos.

Las siguientes realizaciones son una parte de la invención:

35 1. Un compuesto de fórmula I:



en la que

Ph es fenilo,

R¹ es cicloalquilo C₃₋₇,

40 R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente en cada aparición H o alquilo C₁₋₆, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

2. El compuesto de la realización 1 que es (2-oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidina-2-carboxílico (Ia) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

45 3. Un compuesto de la realización 1, en donde R²-R⁶ son cada uno independientemente H o metilo.

4. Un compuesto de la realización 1, en donde R¹ es ciclohexilo.
5. Un compuesto de la realización 3, en donde R¹ es ciclohexilo.
6. Un compuesto de la realización 3, en donde uno de R² y R³ es H y el otro es metilo; o R⁴ es metilo; o R⁵ y R⁶ son cada uno H.
- 5 7. Un método para inhibir la unión de una proteína IAP a una proteína de caspasa que comprende poner en contacto dicha proteína IAP con un compuesto de la realización 1.
8. Un método para tratar una enfermedad o condición asociada con la sobreexpresión de una proteína IAP en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de la realización 1.
- 10 9. Un método para inducir la apoptosis en una célula que comprende introducir en dicha célula un compuesto de la realización 1.
10. Un método para sensibilizar una célula frente a una señal apoptótica que comprende introducir dentro de dicha célula un compuesto de la realización 1.
- 15 11. El método de la realización 10, en el que dicha señal de apoptosis es inducida poniendo en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, metotrexato, bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, adriamicina (doxorubicina), mitoxantrona, camptotecina, topotecan, colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, finasterida, docetaxel y mitomicina C.
12. El método de la realización 10, en el que dicha señal de apoptosis es inducida poniendo en contacto dicha célula con Apo2L/TRAIL.
- 20 13. Un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de la realización 1.
14. Un método para inhibir la unión de una proteína IAP a una proteína caspasa que comprende poner en contacto dicha proteína IAP con un compuesto de la realización 2.
- 25 15. Un método para tratar una enfermedad o condición asociada con la sobreexpresión de un IAP en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de la realización 2.
16. Un método para inducir la apoptosis en una célula que comprende introducir en dicha célula un compuesto de la realización 2.
17. Un método de sensibilizar una célula a una señal apoptótica que comprende introducir en dicha célula un compuesto de la realización 2.
- 30 18. El método de la realización 17, en el que dicha señal de apoptosis es inducida poniendo en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, metotrexato, bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, adriamicina (doxorubicina), mitoxantrona, camptotecina, topotecan, colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, finasterida, docetaxel y mitomicina C.
- 35 19. El método de la realización 17, en el que dicha señal de apoptosis es inducida poniendo en contacto dicha célula con Apo2L/TRAIL.
20. Un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de la realización 2.
- 40 21. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la realización 1 y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
22. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la realización 2 y al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
23. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para inhibir la unión de una proteína IAP a una proteína de caspasa, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha proteína IAP con dicho compuesto de la realización 1 o de la realización 2.
- 45 24. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para inhibir la unión de una proteína IAP a una proteína de caspasa de acuerdo con la realización 23, caracterizado porque dicho método es un método in vitro.

25. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para inducir la apoptosis en una célula, en donde dicho método comprende introducir dentro de dicha célula dicho compuesto de la realización 1 o de la realización 2.

5 26. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para inducir la apoptosis en una célula de acuerdo con la realización 25, caracterizado porque dicho método es un método in vitro.

27. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para sensibilizar una célula frente a una señal apoptótica, en donde dicho método comprende introducir dentro de dicha célula dicho compuesto de la realización 1 o de la realización 2.

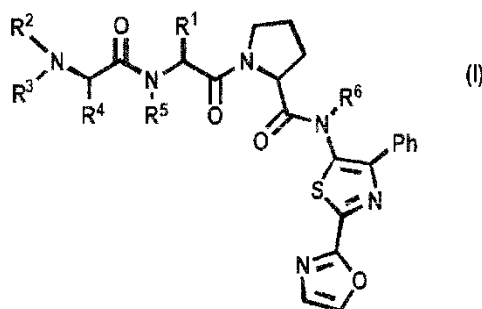
10 28. Un compuesto de la realización 1 o de la realización 2 para uso en un método para sensibilizar una célula frente a una señal apoptótica de acuerdo con la realización 27, caracterizado porque dicho método es un método in vitro.

15 29. El método de cualquiera de las realizaciones 27 a 28, en el que dicha señal apoptótica es inducida poniendo en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en citarabina, fludarabina, 5-fluoro-2'-desoxiuridina, gemcitabina, metotrexato, bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, adriamicina (doxorubicina), mitoxantrona, camptotecina, topotecan, colcemid, colchicina, paclitaxel, vinblastina, vincristina, tamoxifeno, finasterida, docetaxel y mitomicina C.

30. El método de cualquiera de las realizaciones 27 a 28, en el que dicha señal apoptótica es inducida poniendo en contacto dicha célula con Apo2L/TRAIL.

Las realizaciones adicionales siguientes son también parte de la invención:

1. Un método para preparar un compuesto de fórmula I



20

en donde

Ph es fenilo;

R¹ es cicloalquilo C₃₋₇;

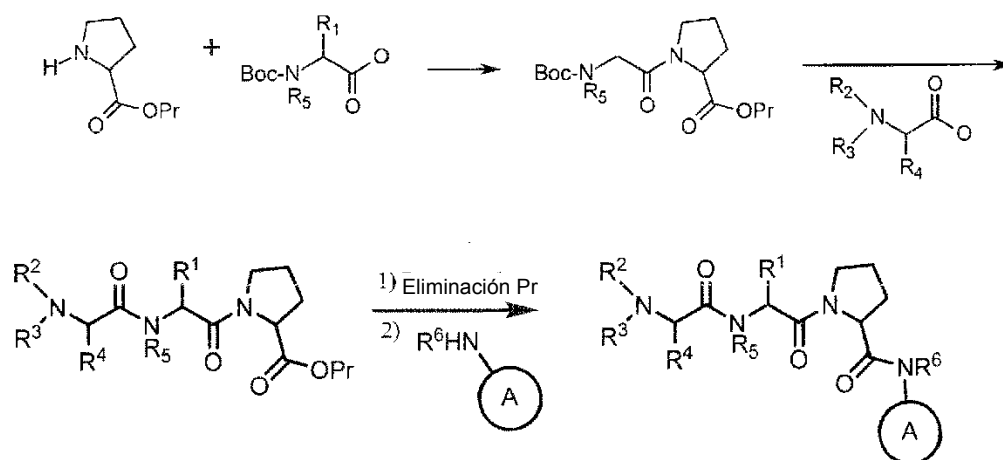
R², R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno independientemente en cada caso H o alquilo C₁₋₆; o

25 una sal del mismo farmacéuticamente aceptable,

que comprende las etapas de acoplar un análogo del resto de amoniácido protegido con amina y desprotegerlo.

2. El método de la realización 1, en donde dicho acoplamiento y desprotección de un resto de amoniácido protegido con amina se define como se representa a continuación:

Esquema 1



en donde

A es un grupo oxazol-feniltiazol como se define en la fórmula I de la realización 1,

5 Pr es un grupo protector carboxi,

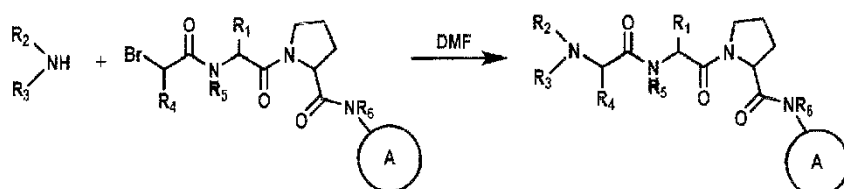
R¹ es cicloalquilo C₃₋₇;

R², R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno independientemente de cada caso H o alquilo C₁₋₆.

3. El método de la realización 1, en donde alternativamente los sustituyentes R² o R³ se introducen mediante una reacción de sustitución.

10 4. El método de la realización 3, en donde dicha reacción alternativa de sustitución se define como se representa a continuación

Esquema 3



en donde A es el grupo oxazol-feniltiazol como se define en la fórmula (I) de la realización 1,

15 Pr es un grupo protector carboxi,

Br es bromo, y DMF es dimetilformamida.

5. El método de la realización 1, en donde el compuesto de fórmula I es (2-oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico (Ia).

6. El método de la realización 1, en donde R² - R⁶ son cada uno independientemente H o metilo.

20 7. El método de la realización 1, en donde R¹ es ciclohexilo.

8. El método de la realización 6, en donde R¹ es ciclohexilo.

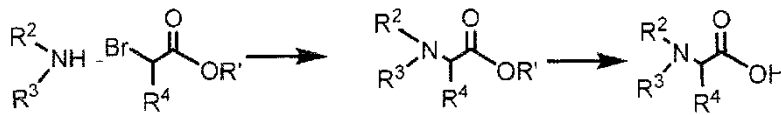
9. El método de la realización 6, en donde uno de R² y R³ es H y el otro es metilo; o R⁴ es metilo; o R⁵ y R⁶ son cada uno H.

10. El método de la realización 1, en donde el resto aminoácido se proporciona sobre un soporte en fase sólida.

25 11. El método de la realización 1, en donde en un compuesto de fórmula I como se define en la realización 1, cuando R² o R³ son sustituyentes distintos de H, el método además comprende una sustitución de un intermedio ácido que incorpora un grupo saliente con una amina.

12. El método de la realización 11, en donde cada sustitución de un intermedio ácido se define como se representa a continuación

Esquema 2



5 en donde

R², R³, R⁴ son cada uno independientemente de cada caso H o alquilo C₁₋₆; y

Br es bromo.

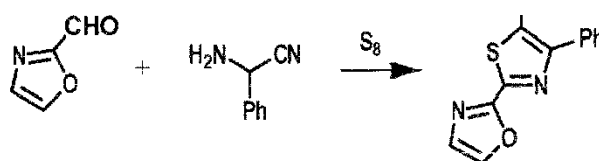
13. El método de la realización 11, en donde el ácido 2-bromopropiónico se hace reaccionar con una amina disuelta en DMF y se hace burbujear hasta que la sustitución es completa para formar el resto alanina N-sustituido.

10 14. El método de la realización 1, en donde la 2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol-5-amina, que sirve como un intermedio para preparar el compuesto de fórmula (I), se prepara por condensación de un hidrocloreto de α-aminofenilacetnitrilo y oxazol-2-carbaldehído en presencia de azufre y TEA.

15. El método de la realización 14, en donde dicha condensación de un hidrocloreto de α-aminofenilacetnitrilo y oxazol-2-carbaldehído se define como se representa a continuación:

15

Esquema 4



Ejemplos

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deberían constituir una limitación del alcance de la invención. Las abreviaturas en este documento son las siguientes:

20 ACN: acetonitrilo;

Chg: ciclohexilglicina;

DCM: diclorometano

DIPEA: diisopropiletilamina;

DMAP: 4-dimetilaminopiridina;

25 DME: 1,2-dimetoxietano;

DMF: dimetilformamida;

DMSO: dimetilsulfóxido

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida;

EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina

30 LCMS: espectrometría de masas de cromatografía líquida;

HATU: hexafluorofosfato de O-(7-Azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio;

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametil-uronio

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución;

35 NBS: N-bromosuccinimida;

TASF: difluorotrimetilsilicato de tris(dimetilamino)sulfonio;

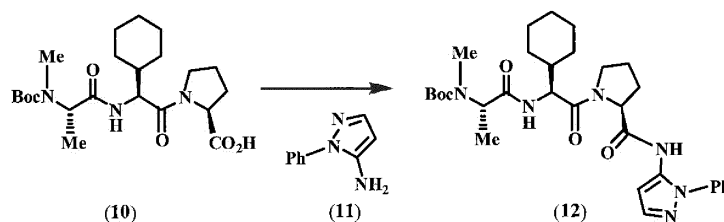
TEA: trietilamina;

TFA: trifluoroacetato;

THF: tetrahidrofurano;

5 Ejemplo de referencia 1

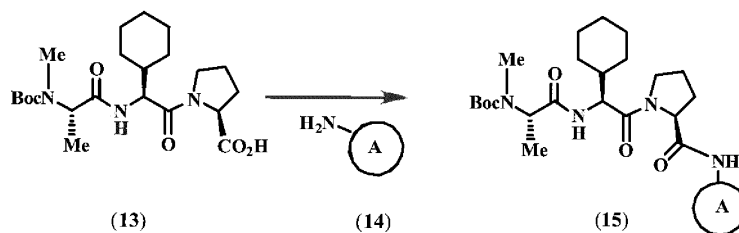
(2-Fenil-2H-pirazol-3-il)-amida del ácido 1-[2-ciclohexil-2-(2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico



Una solución de Boc-MeAla-CHG-Pro-OH (47,0 mg, 0,107 mmol) y piridina (26 μ l, 0,32 mmol) en diclorometano anhidro (300 μ l) se enfrió a 0°C y una solución de cloruro de oxalilo en diclorometano (54 μ l, 2,0 M, 0,11 mmol) se añadió gota a gota durante 10 minutos. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos, después a temperatura ambiente durante 45 minutos, y una solución de 5-amino-1-fenilpirazol (15,9 mg, 0,100 mmol; TCI América nº de catálogo A0174) y se añadió piridina (15,5 μ l, 0,191 mmol) en diclorometano (0,5 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, se diluyó con diclorometano a 20 ml, y se lavó con hidróxido de sodio acuoso 0,2 N (20 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo 60% en hexanos, a continuación, 100% acetato de etilo) para producir un aceite de color amarillo: m/z 581 (M + H⁺). El aceite se trató con ácido trifluoroacético 5% en diclorometano (2 ml), y después de 18 horas se eliminó el disolvente a vacío. El aceite resultante (29,3 mg, rendimiento del 57% en 2 etapas) se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa para dar el producto (sal TFA, 9,6 mg, 15% de rendimiento): m/z 481 (M + H⁺), 503 (M + Na⁺).

20 Ejemplo de Referencia 2

Procedimiento de acoplamiento de fluoruro de ácido

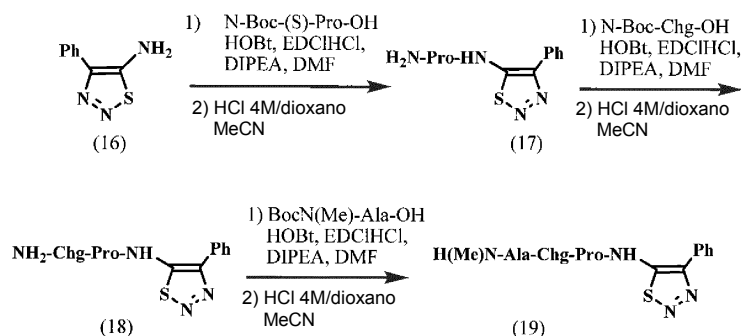


Una solución de Boc-MeAla-Chg-Pro-OH (2,3 mmol) y piridina (6,9 mol) en DCM anhidro (23 ml) se enfrió a 0°C y se añadió fluoruro cianúrico (2,3 mmol) gota a gota durante 30 seg. La mezcla se agitó a 0°C durante 15 min, a temperatura ambiente durante 5 h, y después se inactivó con agua. La mezcla se extrajo tres veces con DCM (total 100 ml), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron (Na₂SO₄). La filtración y la concentración al vacío produjeron el fluoruro de ácido del péptido como un aceite claro e incoloro usado directamente sin purificación adicional.

Se añadió una solución del fluoruro de ácido bruto (0,50 mmol) y piridina (1,5 mmol) en DCM (2,5 ml) a la amina sólida (14, 0,50 mmol), y la mezcla resultante se agitó bien a TA o a 50°C (recipiente cerrado). La mezcla se vertió en NaHCO₃ acuoso y después se extrajo tres veces con diclorometano (total 100 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. La amida de péptido en bruto se usó directamente sin purificación adicional.

Ejemplo de Referencia 3

35 (4-Fenil-[1,2,3]tiadiazol-5-il)-amida del ácido 1-[2-ciclohexil-2-(2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico



Etapa 1: A una solución de Boc-L-Pro-OH (2 eq), HOBT (1,9 eq), EDC-HCl (1,9 eq) y DIPEA (5 eq) en DMF (10-15 vol) se añadió 4- fenil-1,2,3-tiadiazol-5-amina (16). La reacción, inicialmente ligeramente exotérmica, se calentó a 75°C y se agitó durante la noche, se enfrió a TA y se eliminó la DMF parcialmente a vacío. La solución se diluyó con EtOAc (10-15 vol) seguido de lavado con HCl 1 M (2 x), NaHCO₃ (1 x), y salmuera (1 x) (1:1 ac/org). La capa orgánica se concentró a vacío y el sólido resultante se suspendió en reflujo MeCN (un volumen mínimo necesario para una fácil agitación) durante 30 min y después se enfrió a TA. La filtración por succión dio un producto de conjugación protegido con Boc como un sólido cristalino de color blanquecino a un rendimiento de aprox. el 77%. El producto protegido con Boc se suspendió en una solución de HCl 4 M/dioxano (4-5 ácido eq) y MeCN (1 vol eq a la solución de dioxano) y se agitó a TA hasta que LCMS indicó la desprotección completa (aprox. 1 h). La mezcla de reacción se concentró a vacío y el sólido resultante se puso en suspensión vigorosamente en MeCN a reflujo (un volumen mínimo necesario para una fácil agitación), se enfrió a TA, y el sólido se recogió mediante filtración por succión y se lavó con MeCN frío hasta que el color residual se eliminó de la torta que dio la sal de HCl de (S)-N-(4-fenil-1,2,3-tiadiazol-5-il)pirrolidina-2-carboxamida (17) como un sólido de color blanquecino en rendimiento aproximadamente cuantitativo.

Etapa 2: A una solución de 17 y DIPEA (5 eq) en DMF (10 a 15 vol) se añadió el Boc-L-Chg (1,5 eq), HOBT (1,4 eq) y EDC-HCl (1,4 eq). La reacción se agitó durante aprox. 2 h, después se diluyó con EtOAc (15 vol) y se lavó con HCl 1 M (2 x), NaHCO₃ (1 x), y salmuera (1 x) (1:1 ac/org). El extracto orgánico se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío. El sólido resultante se suspendió en EtOH/hexano (20:80) (un volumen mínimo necesario para una fácil agitación) y se filtró para dar el producto conjugado protegido con Boc como un sólido blanco mullido en aprox. un rendimiento del 80%. El Boc-protegido se disolvió en una solución de HCl 4 M/dioxano (4-5 ácido eq) y MeCN (0,25 eq volumen a la solución de dioxano) y se agitó a TA durante aprox. 1 h. La reacción se concentró a sequedad con tolueno (2 x) (el mismo volumen que la solución de desprotección) para producir la sal de HCl de (S)-1-((S)-2-amino-2-ciclohexilacetil)-N-(4-1,2,3-tiadiazol-5-il)pirrolidina-2-carboxamida (18) como un sólido cristalino blanco con un rendimiento aproximadamente cuantitativo.

Etapa 3: A una solución de 18 y DIPEA (5 eq) en DMF (10 a 15 vol) se añadió el Boc-LN-metil Ala (1,5 eq), HOBT (1,4 eq), y EDC-HCl (1,4 eq). La reacción se agitó durante 1 h, se diluyó con EtOAc (15 vol) y se lavó con HCl 1 M (2 x), NaHCO₃ (1 x), y salmuera (1 x) (1:1 ac/org). El extracto orgánico se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío para dar el producto conjugado protegido con Boc como un sólido espumoso beige a aprox. un rendimiento del 85%. El producto protegido con Boc se disolvió en una solución de HCl 4 M/dioxano (4-5 ácido eq) y MeCN (0,25 volumen eq a la solución de dioxano) y se agitó a TA durante aprox. 1 h. La reacción se concentró a sequedad con tolueno (2 x) (mismo volumen que la solución de desprotección) y el sólido resultante se suspendió en una solución de MTBE/EtOAc (70:30) (volumen mínimo necesario para una fácil agitación), se filtró y se recogió para dar en bruto (S)-1-((S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-(metilamino)propanamido)acetil)-N-(4-fenil-1,2,3-tiadiazol-5-il)pirrolidina-2-carboxamida (d) en forma de un sólido blanco de flujo libre. La sal de HCl en bruto se suspendió en MeOH (mínimo 4 vol) y se disolvió con agitación a 65°C, se añadió en dos porciones de acetato de isopropilo caliente (6-8 vol), manteniendo la temperatura a aprox. 60°C y después la solución se dejó enfriar con agitación. La cristalización se llevó a cabo rápidamente, la suspensión se agitó a TA durante varias horas, después se agitó a 0°C durante una hora antes de que el sólido se recogiera mediante filtración por succión. El producto en bruto se lavó con MeOH/iPrOAc (1:4, 2 vol) y se secó a 19 como un sólido cristalino de color blanco/blanquecino en aprox. un rendimiento del 80%.

Ejemplo de Referencia 4

5-Amino-2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol

Una suspensión de hidrocloreto de α-aminofenilacetronitrilo (1,52 g, 8,99 mmol), azufre en polvo (289 mg, 9,01 mmol) y oxazol-2-carbaldehído (873 mg, 8,99 mmol) en EtOH (18 ml) se trató con TEA (1,88 ml, 13,5 mmol), y la mezcla se agitó a 50°C durante 60 minutos. La mezcla enfriada se trató con hidroxilamina acuosa (1,00 ml, 50% en peso, 15 mmol) a TA durante la noche, se filtró y se concentró a vacío. El resto se repartió entre EtOAc y NaHCO₃ acuoso, y la fase orgánica separada se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró a vacío hasta un aceite marrón oscuro. El aceite bruto se preabsorbió sobre SiO₂ y se purificó por cromatografía ultrarrápida automatizada

eluyendo con un gradiente de acetato de etilo 5-70% en hexanos para producir 5-amino-2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol (20, 159 mg, 7,3%).

Ejemplo 1

5 (2-Oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico (1a)

Etapa 1: A una solución Boc-L-prolina (4,5 g, 0,02 mmol) y piridina (8,45 ml, 0,104 mmol) en DCM (20 ml) enfriada en un baño de hielo se añadió gota a gota de fluoruro cianúrico (5,35 ml, 0,0627 mmol). Después de la adición, la reacción se volvió lechosa. La solución se agitó a 0°C durante 10 min y después se calentó a TA y se agitó durante 4 h. La reacción se inactivó con agua, y se extrajo tres veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron, y se concentraron a vacío para proporcionar 2-(fluorocarbonil)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo. El fluoruro de ácido en bruto se usó en la siguiente reacción de acoplamiento inmediatamente.

15 El fluoruro de ácido recientemente preparado (4,55 g, 0,02 mmol) se disolvió en MeCN (20 ml), y se trató con 20 (1,7 g, 0,007 mmol) y piridina (2,82 ml, 0,035 mmol). La reacción se calentó a 50°C durante la noche. La mezcla de reacción se inactivó con una solución sat. NaHCO₃ y se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en SiO₂ eluyendo con un gradiente de EtOAc en hexano (de 50 a 80% EtOAc) para proporcionar 2-(2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol-5-ilcarbamoyl) pirrolidin-1-carboxilato de (S)-terc-butilo (21).

20 La eliminación del grupo protector de Boc y el acoplamiento secuencial con BocHN-Chg-OH y H(Me)N-Ala-OH se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones de las etapas 2 y 3 del ejemplo de referencia 3. La purificación del producto de acoplamiento Chg también se llevó a cabo mediante cromatografía de SiO₂ eluyendo con un gradiente de EtOAc/hexano (de 50 a 80% EtOAc). El producto tripéptido protegido con Boc en bruto se purificó mediante ISCO (EtOAc 50-80%/hexano). Después de quitar el grupo Boc del producto final se purificó por HPLC Prep para proporcionar la puro: (M + H)⁺ = 565,3 ms

25 Ejemplo 2

Otros compuestos de esta invención, por ejemplo,

1. (2-oxazol-2-il-4-fenil tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclopropil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil] pirrolidin-2-carboxílico;
- 30 2. (2-oxazol-2-il-4-fenil tiazol-5-il) -amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclopentil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico;
3. (2-oxazol-2-il-4-fenil tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-cicloheptil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico;
4. (2-oxazol-2-il-4-fenil tiazol-5-il) -N-metil-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-etilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico;
- 35 5. (2-oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico; y
6. (2-oxazol-2-il-tiazol-5-il-4-fenil)-amida del ácido (S)-1- [(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-2-metil-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico,

40 se pueden preparar de forma análoga al compuesto del Ejemplo 1 usando materiales de partida correspondientemente análogos en el procedimiento del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Ensayos de inhibición de IAP

45 En los siguientes experimentos se usó un dominio BIR quimérico denominado MLXBIR3SG en el que 11 de 110 restos corresponden a los encontrados en XIAP-BIR3, mientras que el resto corresponde a ML-IAP-BIR. La proteína quimérica MLXBIR3SG se demostró que se unía e inhibía la caspasa-9 significativamente mejor que cualquiera de los dominios BIR nativos, pero que se unía a los péptidos basados en Smac y Smac maduro con afinidades similares a las de ML-IAP-BIR nativo. La inhibición mejorada de la caspasa-9 del dominio BIR quimérico MLXBIR3SG se ha correlacionado con un aumento de la inhibición de la apoptosis inducida por la doxorubicina cuando se transfecta en células MCF7.

50 Secuencia MLXBIR3SG:

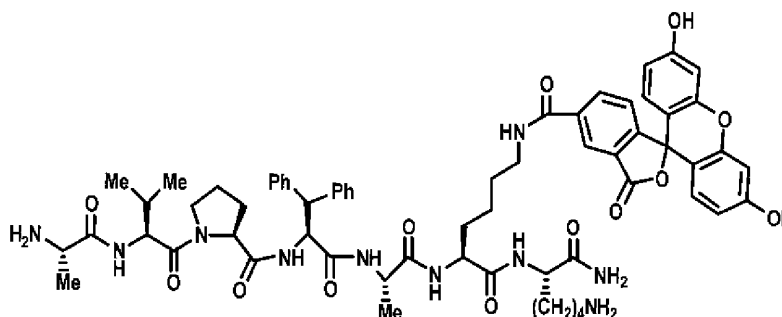
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLETEEEEEEGAGATLSRGPAPFGMGSEELRLASFYD
 WPLTAEVPPPELLAAAGFFHTGHQDKVRCFFCYGGLQSWKRGDDPWTEHAKWFPGCQFLLR
 KGQEYINNIHLTHSL (SEQ ID NO.: 1)

Ensayo de unión de péptidos TR-FRET

Se realizaron experimentos de competición de transferencia de energía de resonancia fluorescente por resolución temporal en un Lector contador Multi-marcado Wallac Victor2 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc.) de acuerdo con los procedimientos de Kolb et al (Journal of Biomolecular Screening, 1996, 1 (4): 203). Un cóctel de reactivos que contenía MLXBIR3SG 300 nM marcado con His; el péptido SMAC 200 nM biotinilado (AVPI); 5 µg/ml de alofocianina anti-his (XL665) (CISBIO Internacional); y 200 ng/ml de estreptavidina-europio (Perkin Elmer) se preparó en tampón reactivo (Tris 50 mM [pH 7,2], NaCl 120 mM, 0,1% de globulinas de la especie bovina, DTT 5 mM y 0,05% de octilglucósido). (Alternativamente, este cóctel puede hacerse utilizando anti-His marcado con europio (Perkin Elmer) y estreptavidina-alofocianina (Perkin Elmer) a concentraciones de 6,5 nM y 25 nM, respectivamente). El cóctel de reactivo se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadió el cóctel a 1:3 diluciones seriadas de un compuesto antagonista (a partir de la concentración de 50 mM) en placas de 384 pocillos negras de FIA (Greiner Bio-One, Inc.). Después de una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente, la fluorescencia se leyó con filtros para la excitación del europio (340 nm) y para las longitudes de onda de emisión de europio (615 nm) y una alofocianina (665 nm). Los datos de antagonista se calcularon como una relación de la señal de emisión de alofocianina a 665 nm respecto a la de la emisión de europio a 615 nm (estas proporciones se multiplicaron por un factor de 10.000 para facilidad de manipulación de los datos). Los valores resultantes se representaron como una función de la concentración de antagonista y se ajustaron a una ecuación de 4 parámetros usando el software Kaleidograph (Synergy Software, Reading, PA.). Las indicaciones de la potencia del antagonista se determinaron a partir de los valores de IC₅₀. Los compuestos de la invención se encontraron que tenían una actividad inhibidora de IAP que se demostró en este ensayo.

Ensayo de unión del péptido por polarización de fluorescencia

Se realizaron experimentos de polarización en un Analyst HT 96-384 (Molecular Devices Corp.) de acuerdo con el procedimiento de Keating, SM, Marsters, J, Beresini, M., Ladner, C., Zioncheck, K., Clark, K., Arellano, F., y Bodary, S. (2000) en Proceedings of SPIE: In Vitro Diagnostic Instrumentation (Cohn, GE, Ed.) pp 128-137, Bellingham, Washington. Las muestras para mediciones de afinidad de polarización de fluorescencia se prepararon mediante la adición de diluciones en serie 1:2 a partir de una concentración final de 5 mM de MLXBIR3SG en tampón de polarización (Tris 50 mM [pH 7,2], NaCl 120 mM, 1% globulinas de la especie bovina, TDT 5 mM y 0,05% de octilglucósido) a AVPdi-Phe-NH₂ 5-carboxifluoresceína conjugado (AVP-DipHE-FAM) a 5 nM de concentración final.



Sonda AVP-DipHE-FAM

Las reacciones se leyeron después de un tiempo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente con filtros de corte estándar para el fluoróforo de fluoresceína ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) en placas de 96 pocillos HE96 negras (Molecular Devices Corp.). Los valores de fluorescencia se representaron gráficamente como una función de la concentración de proteína, y las IC₅₀ se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de 4 parámetros usando el software Kaleidograph (software Synergy, Reading, PA.). Los experimentos de competición se realizaron mediante la adición de MLXBIR3SG a 30 nM a los pocillos que contenían 5 nM de la sonda AVP-DipHE-FAM así como diluciones en serie 1:3 de compuestos antagonistas a partir de una concentración de 300 mM en el tampón de polarización. Las muestras se leyeron después de una incubación de 10 minutos. Los valores de polarización de fluorescencia se representaron como una función de la concentración de antagonista, y los valores de IC₅₀ se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de 4 parámetros usando el software Kaleidograph (software Synergy, Reading, PA.). Las constantes de inhibición (K_i) para los antagonistas se determinaron a partir de los valores de IC₅₀. Los compuestos de la invención se encontraron que tenían actividad inhibidora de IAP que se demostró en este ensayo. Por ejemplo, el valor de K_i para el compuesto la es 0,014 (ML-IAP-BIR).

Ejemplo 4

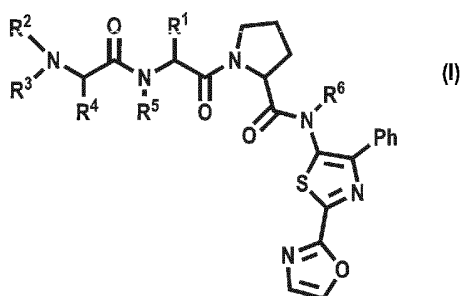
Estudios de xenoinjerto de Tumor (figuras 1 y 2)

5 Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices del Comité para el Cuidado y
Uso de Animales institucional Genentech. Las células de cáncer como las células de cáncer de MDA-MB-231 de
mama humano, colorrectal, Colo205, o NSCLC, Calu6 se obtuvieron de la American Type Culture Collection
(Manassas, Va.). Las células se resuspendieron en HBSS (Colo205) o la suspensión de células se mezcló 1:1 con
10 Matrigel (BD Biosciences; MDA-MB-231, Calu6). Las células ($1,5 \times 10^7$ para MDA-MB-231; $5,0 \times 10^7$ para Colo205,
Calu6) luego se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones desnudos hembra (Charles River
Laboratories, Hollister, California) de 6-8 semanas. Los volúmenes tumorales se calcularon utilizando el diámetro
medio medido con pie de rey usando la fórmula $v = 0,5 \times a \times b^2$, donde a y b esran los diámetros tumorales
perpendiculares más grandes y más pequeños, respectivamente. Diez ratones con el volumen tumoral medio
apropiado fueron asignados aleatoriamente a cada uno de seis grupos. El volumen medio del tumor \pm el error
15 estándar de la media (SEM) para los seis grupos fue $168 \pm 3 \text{ mm}^3$ en el inicio del tratamiento (día 0). Los ratones se
observaron en cada día del estudio, y los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron dos veces por
semana. La inhibición del crecimiento tumoral por ciento se calculó utilizando la fórmula $\% \text{ TGI} = 100 \times (1 - \text{Volumen}$
de Tumor_{dosis}/Volumen de Tumor_{vehículo}).

En este ensayo usando células MDA-MB-231X1 de mama humano, el compuesto la de la invención tiene un valor
de MED de 3,4 mg/kg (iv QWK). Esto es cinco veces menos que la cantidad necesaria para el compuesto III de la
técnica anterior en el mismo ensayo en las mismas condiciones (MED = 18,6 mg/kg). El AUC para la es cuatro
20 veces menor que el de III para una eficacia similar.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un compuesto de fórmula I:



en donde

5 Ph es fenilo;

R¹ es cicloalquilo C₃₋₇;

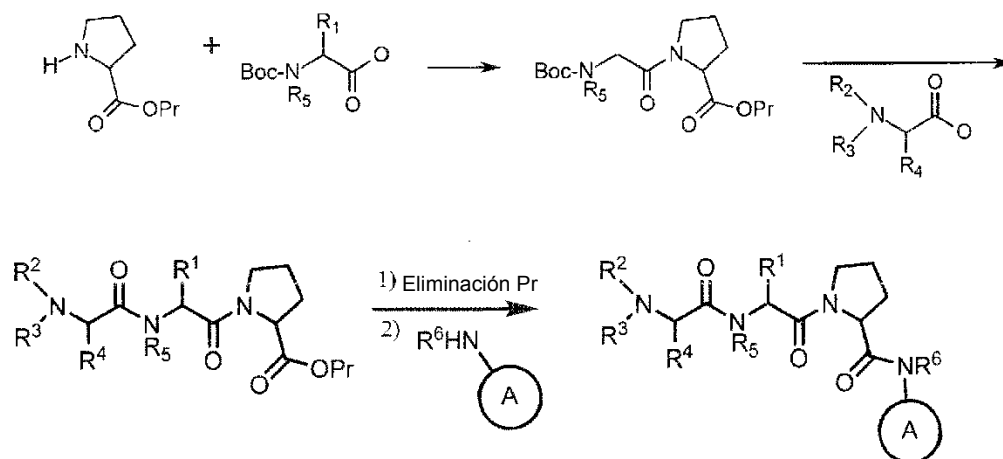
R², R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno independientemente en cada caso H o alquilo C₁₋₆; o

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

10 que comprende las etapas de acoplamiento de un análogo de un resto de aminoácido protegido con amina y su desprotección.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho acoplamiento y desprotección de un resto de aminoácido protegido con amina se define como se representa a continuación:

Esquema 1



15 en donde

A es un grupo oxazol-feniltiazol como se define en la fórmula I de la reivindicación 1

Pr es un grupo protector carboxi,

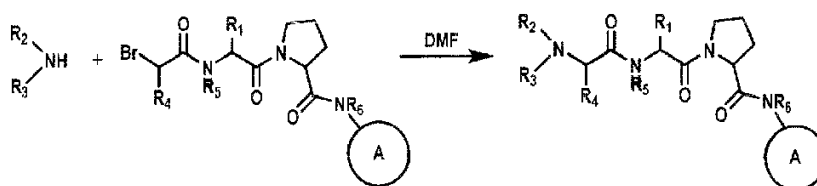
R¹ es cicloalquilo C₃₋₇;

R², R³, R⁴, R⁵, y R⁶ son cada uno independientemente de cada caso H o alquilo C₁₋₆.

20 3. El método de la reivindicación 1, en donde alternativamente los sustituyentes R² o R³ se introducen mediante una reacción de sustitución.

4. El método de la reivindicación 3, en donde dicha reacción alternativa de sustitución se define como se representa a continuación

Esquema 3



en donde A es el grupo oxazol-feniltiazol como se define en la fórmula (I) de la reivindicación 1,

Pr es un grupo protector carboxi,

5 Br es bromo, y

DMF es dimetilformamida.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula I es (2-oxazol-2-il-4-fenil-tiazol-5-il)-amida del ácido (S)-1-[(S)-2-ciclohexil-2-((S)-2-metilamino-propionilamino)-acetil]-pirrolidin-2-carboxílico (Ia).

6. El método de la reivindicación 1, en donde R² - R⁶ son cada uno independientemente H o metilo.

10 7. El método de la reivindicación 1, en donde R¹ es ciclohexilo.

8. El método de la reivindicación 6, en donde R¹ es ciclohexilo.

9. El método de la reivindicación 6, en donde uno de R² y R³ es H y el otro es metilo; o R⁴ es metilo; o R⁵ y R⁶ son cada uno H.

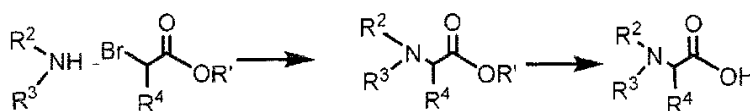
10. El método de la reivindicación 1, en donde el resto aminoácido se proporciona sobre un soporte en fase sólida.

15 11. El método de la reivindicación 1, en donde en un compuesto de formula I como se define en la reivindicación 1, cuando R² o R³ son sustituyentes distintos de H, el método además comprende una sustitución de un intermedio ácido que incorpora un grupo saliente con una amina.

12. El método de la reivindicación 11, en donde cada sustitución de un intermedio ácido se define como se representa a continuación

20

Esquema 2



en donde

R², R³, R⁴ son cada uno independientemente de cada caso H o alquilo C₁₋₆; y

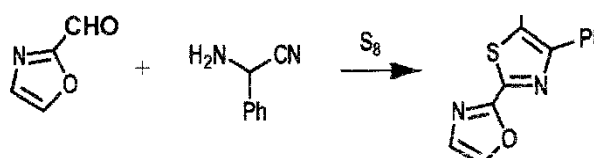
Br es bromo.

25 13. El método de la reivindicación 11, en donde el ácido 2-bromopropiónico se hace reaccionar con una amina disuelta en DMF y se hace burbujear hasta que la sustitución es completa para formar el resto alanina N-sustituido.

14. El método de la reivindicación 1, en donde la 2-(oxazol-2-il)-4-feniltiazol-5-amina, que sirve como un intermedio para preparar el compuesto de fórmula (I), se prepara por condensación de un hidrocloreto de α-aminofenilacetnitrilo y oxazol-2-carbaldehído en presencia de azufre y TEA.

30 15. El método de la reivindicación 14, en donde dicha condensación de un hidrocloreto de α-aminofenilacetnitrilo y oxazol-2-carbaldehído se define como se representa a continuación:

Esquema 4



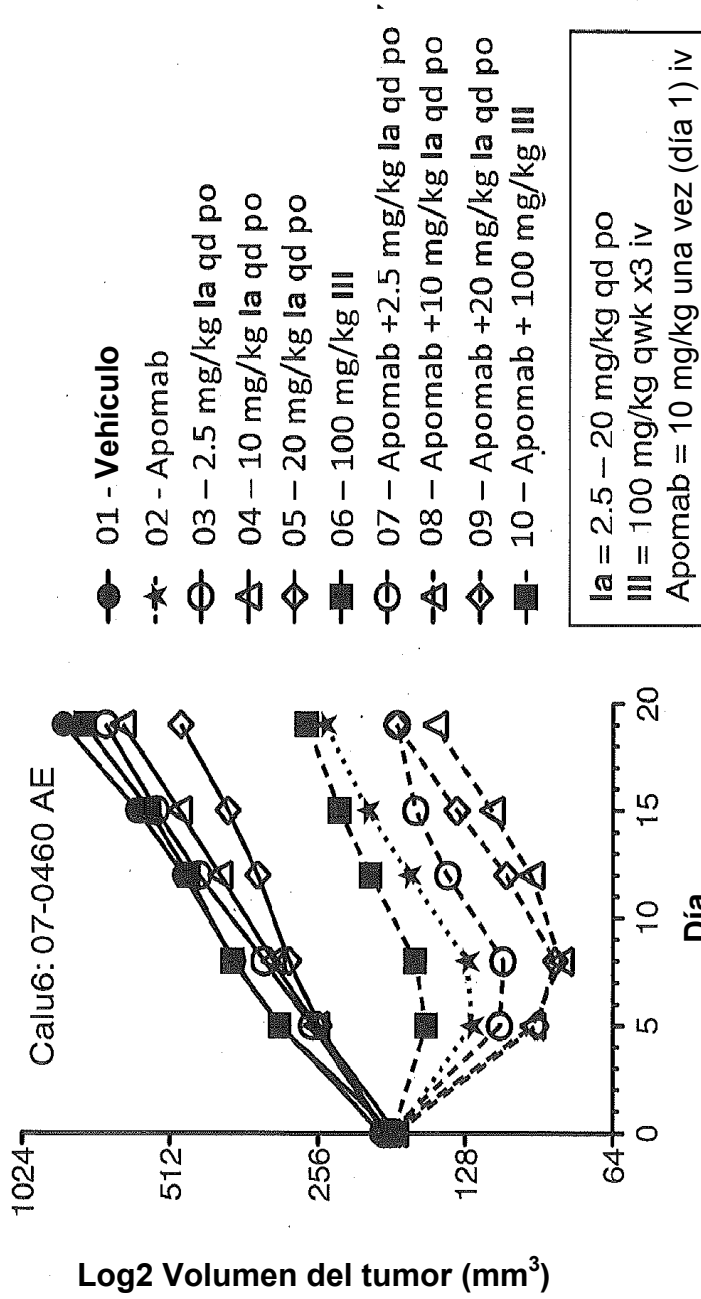


Figura 1

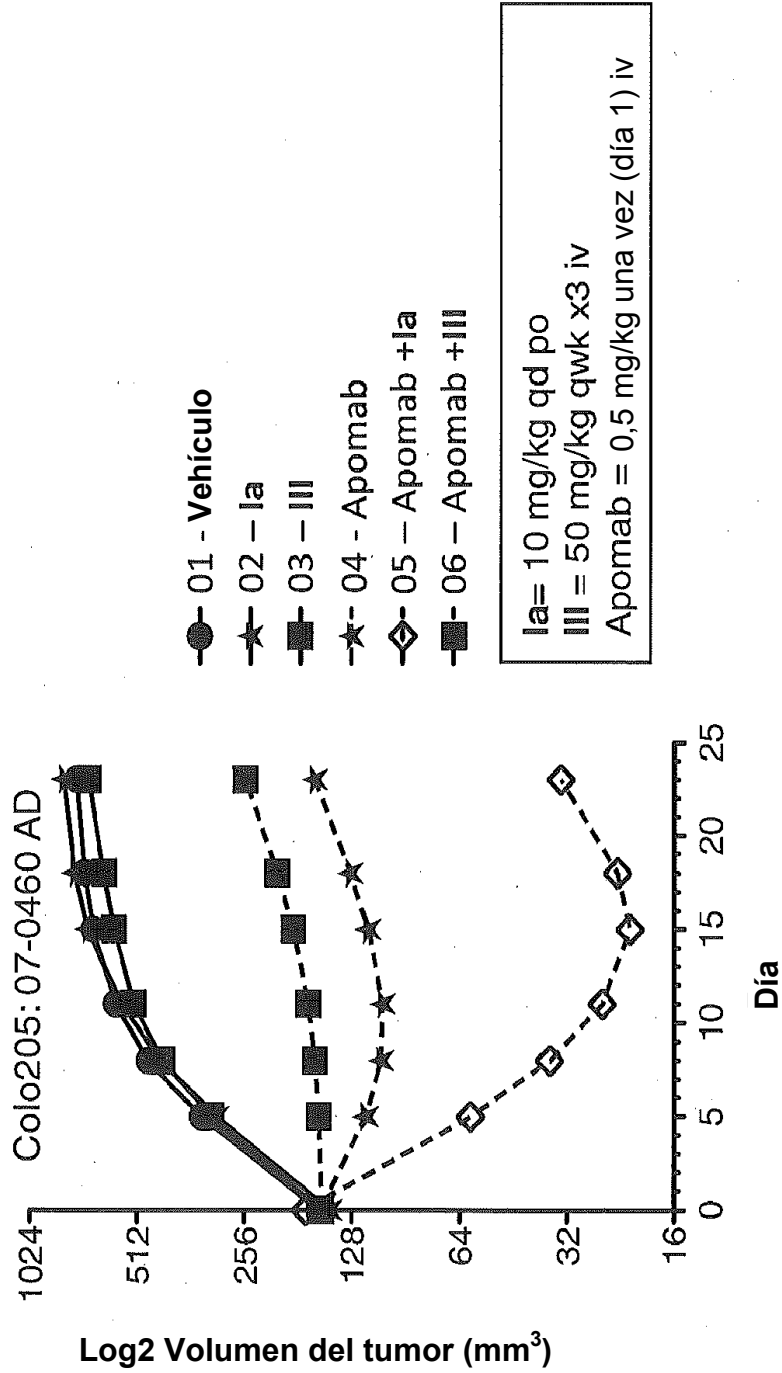


Figura 2