

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 508**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 409/14** (2006.01)  
**C07D 213/22** (2006.01)  
**C07D 213/30** (2006.01)  
**C07D 213/55** (2006.01)  
**C07D 213/57** (2006.01)  
**C07D 213/58** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2015 PCT/IB2015/051553**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132727**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2015 E 15710263 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3114119**

54 Título: **Compuestos moduladores de MCL-1 para tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**04.03.2014 EP 14305309**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.01.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT DE CANCÉROLOGIE DE L'OUEST  
RENÉ GAUDUCHEAU (33.3%)  
Boulevard Jacques Monod  
44805 Saint Herblain Cedex, FR;  
CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER  
FRANCOIS BACLESSE (33.3%) y  
UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE-NORMANDIE  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**POULAIN, LAURENT;  
VOISIN-CHIRET, ANNE-SOPHIE;  
SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS, JANA;  
BUREAU, RONAN;  
BURZICKI, GRÉGORY;  
DE GIORGI, MARCELLA;  
PERATO, SERGE;  
FOGHA, JADE;  
RAULT, SYLVAIN;  
JUIN, PHILIPPE y  
GAUTIER, FABIEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 739 508 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

Compuestos moduladores de Mcl-1 para tratamiento del cáncer

La presente invención se refiere a compuestos, composiciones y métodos para tratamiento de cánceres y trastornos de proliferación celular, y más particularmente, métodos de fabricación y utilización de compuestos que modulan Mcl-1; dichos compuestos pueden estar contenidos en composiciones farmacéuticas y utilizarse como agentes terapéuticos.

El cáncer es una causa principal de muerte en todo el mundo. La apoptosis, conocida también como muerte celular programada, es un proceso natural utilizado por los organismos multicelulares para eliminar células que han envejecido o dañadas implicadas también en diversos procesos fisiológicos tales como la morfogénesis y homeostasis tisular. La apoptosis es un proceso complejo, fuertemente regulado, que implica muchas proteínas. Algunas de estas proteínas promueven la muerte celular ("proteínas pro-apoptóticas") y algunas la previenen ("proteínas anti-apoptóticas"). Las células del cáncer tienden a sobreexpresar genes anti-apoptóticos. La sobre-expresión de genes anti-apoptóticos está asociada con la formación de tumores, el crecimiento metastásico y la resistencia a la quimioterapia, y existe una necesidad continuada de estrategias terapéuticas que destruyan selectivamente las células del cáncer.

Más específicamente, un defecto en el control de la apoptosis está implicado frecuentemente en la quimiorresistencia de las células del cáncer, tanto en enfermedades malignas hematológicas como en tumores sólidos, y la disregulación de la expresión de miembros de la familia Bcl-2 constituye uno de los eventos más frecuentes e importantes. Estas proteínas comparten dominios de homología de Bcl-2 (denominados dominios BH). Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>...) contienen los dominios BH1 a BH4, mientras que las proteínas pro-apoptóticas contienen, o bien los dominios BH1 a BH3 (miembros multidominio tales como Bax y Bak) o únicamente el dominio BH3 (grupo BH3-sólo tales como Bim, Puma, Bid, Bad, Noxa y Hrk) (Adams, J. M. y Cory, S. (2007) *Oncogene* 26, 1324-1337). En condiciones de estrés celular, las proteínas BH3-sólo inician la apoptosis por bloqueo de la actividad de miembros anti-apoptóticos o por activación directa de miembros pro-apoptóticos multidominio, que está mediada por interacción del dominio BH3 de una proteína con la bolsa hidrófoba de otra (Shamas-Din et al. (2011) *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 508-520).

Se están realizando esfuerzos constantes para impedir la actividad de miembros anti-apoptóticos tales como Bcl-2 o Bel-x<sub>L</sub>, entre los cuales el desarrollo de moléculas BH3-miméticas potentes representa una vía prometedora. Estas moléculas se fijan a la hendidura de fijación de BH3 en las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y promueven la muerte celular por la liberación de miembros de la familia pro-apoptótica Bcl-2 (Zhang, Lin et al. (2007) *Drug Resist. Updat.* 10, 207-217). ABT-737 (y el compuesto disponible por vía oral afín a ABT-737, ABT-263 o Navitoclax) permite una inhibición eficiente de la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 y Bel-x<sub>L</sub>. Se ha demostrado que el mismo es capaz de inducir la muerte celular apoptótica como un agente simple en enfermedades hematológicas malignas y, en menor proporción, en células de tumores sólidos. ABT-737 puede sensibilizar también las células del cáncer para la quimioterapia. Sin embargo, su actividad ha estado condicionada a la ausencia o a la desactivación de Mcl-1, mientras que la expresión y actividad fuerte de Mcl-1 está asociada a la ausencia de respuesta a ABT-737 (Dai, Y. y Grant, S. (2007) *Cancer Res.* 67(7), 2908-2911). La expresión y actividad de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 constituye por tanto un obstáculo importante para la actividad de ABT-737.

En el carcinoma ovárico, los inventores han demostrado anteriormente que Bcl-x<sub>L</sub> y Mcl-1 cooperan para proteger las células tumorales contra la apoptosis, y que su inhibición concomitante conduce a apoptosis masiva incluso en ausencia de ausencia de quimioterapia, mientras que la regulación decreciente de cualquiera de Bcl-x<sub>L</sub> o Mcl-1 sigue siendo ineficaz (Brotin et al. (2010) *Int J Cancer* 126, 885-895). En este contexto, los inventores demostraron también que se requería la regulación decreciente o desactivación de Mcl-1 para sensibilizar las células de cáncer de ovario a moléculas miméticas de BH3 direccionadas a Bcl-x<sub>L</sub> tales como HA14-1 (Simonin et al. (2009) *Mol Cancer Ther* 8, 3162-3170) o ABT-737 (Simonin et al. (2013) *Apoptosis* 18, 492-508).

Mcl-1 contiene tres dominios BH (BH1-BH3) pero carece de un dominio BH4 claramente definido en el término NH<sub>2</sub>. Mcl-1 está localizada en diversas membranas intracelulares, especialmente, en la membrana mitocondrial exterior a través de un dominio transmembranal en su término COOH. Al igual que Bcl2 y Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 puede interaccionar con Bax y/o Bak para inhibir la apoptosis mediada por las mitocondrias. A diferencia de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, la expresión de Mcl-1 es inducida rápidamente por exposición a citocinas o factores de crecimiento. La expresión incrementada de Mcl-1 promueve la viabilidad de las células en una amplia gama de tipos de células tumorales, que incluyen leucemias, carcinomas hepatocelulares, melanoma, y células de cáncer de próstata y mama. Además, Mcl-1 juega un papel en la inmortalización celular y la tumorigénesis en muchas clases de cánceres por amplificación del número de copias somáticas. Las células de cáncer que albergan amplificación de Mcl-1 son frecuentemente dependientes de Mcl-1 para su supervivencia (Beroukhim, R. et al. (2010) *Nature* 463, 899-905).

Mcl-1 está sobreexpresada en diversas células tumorales, que incluyen carcinoma ovárico, y su expresión se ha asociado también a quimiorresistencia (Shigemasa et al. (2002) *Jpn J Cancer Res* 93, 542-550). Es importante que el locus Mcl-1 es uno de los amplificados más frecuentemente en los cánceres humanos, lo que apunta también a su

centralidad en la carcinogénesis y aumenta su importancia como diana terapéutica de prioridad alta (Beroukhim et al. (2010) Nature 463, 899-905).

Por esta razón, se han utilizado diversas herramientas orientadas a la inhibición de Mcl-1 para sensibilizar ABT-737, tales como:

- 5 • direccionamiento de siRNA a Mcl-1 (Lin et al. (2007) Oncogene 26, 3972-3979),
- transferencia del gen Noxa (Wesarg et al. (2007) Int J Cancer 121, 2387-2394; Lucas et al. (2012) Clin Cancer Res 18, 783-795),
- inhibición de mecanismos de señalización (Russo et al. (2013) Biochem Pharmacol 85, 927-936), o
- 10 • quimioterapia convencional (Mason et al. (2009) Leukemia 23, 2034-2041; Simonin et al. (2013) Apoptosis 18, 492-508).

Estas estrategias conducen, o bien a la inhibición de la expresión de Mcl-1 propiamente dicha, o a la inhibición indirecta de su actividad anti-apoptótica por activación de sus inhibidores endógenos, es decir las proteínas BH<sub>3</sub>-sólo tales como Bim, Noxa o Puma. Como se ha demostrado con anterioridad, la quimioterapia basada en compuestos de platino es por tanto capaz de reducir el nivel de la proteína Mcl-1 así como de inducir las proteínas BH<sub>3</sub>-sólo en el carcinoma ovárico, conduciendo a sensibilización para ABT-737 (Simonin et al. (2009) Molecular Cancer Therapeutics, 8(11), 3162-70 y Simonin et al. (2013) Apoptosis 18, 492-508). Sin embargo, la difícil aplicación de tales estrategias en la práctica clínica, debido en parte a toxicidades acumulativas (quimioterapias convencionales) o a ineficiencia *in vivo* (siRNA, terapia génica), incita a los investigadores a identificar inhibidores específicos y potentes de Mcl-1.

Voisin-Chéret et al. (Tetrahedron 2009, 65(3), 607-612), Burzicki et al. (Syntesis 2010, 16, 2804-2810), Voisin-Chéret et al. (Tetrahedron 2010, 66(40), 8000-8005), y Voisin-Chéret et al. (Tetrahedron 2012, 68(23), 4381-4389) presentan la síntesis química de oligopiridinas. Sin embargo, estos compuestos son diferentes de los compuestos de la presente invención.

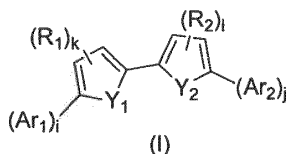
Perato et al. (Tetrahedron 2011, 68(7), 1910-1917) Sopkova-de Oliveira Santos et al. (Journal of Chemical Information and Modeling 2009, 52(2), 429-439) presentan caracterizaciones estructurales de foldámeros de oligopiridilo. Sin embargo, estos compuestos son diferentes de los compuestos de la presente invención.

WO2012/088438 describe compuestos oligo(het)arilo como inhibidores de Mcl-1, pero no describe específicamente los compuestos de la presente invención.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos alternativos útiles para modular, particularmente inhibir, la actividad de Mcl-1.

30 El objeto de la presente invención se define en esta memoria por las reivindicaciones 1 a 15.

La presente descripción está dirigida, por tanto, en un aspecto, a diversos compuestos que tienen la estructura:



o formas de sal farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde los miembros constituyentes se definen más adelante.

35 Otro objeto de la presente invención es describir composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la presente descripción, en donde las composiciones comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Otro objeto de la presente descripción es describir una combinación de compuestos de fórmula (I) con inhibidores de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub>.

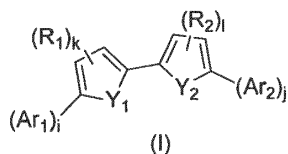
Otro objeto de la presente descripción es describir compuestos de fórmula (I) para uso en el tratamiento del cáncer.

Otro objeto de la presente descripción es exponer un método de preparación de compuestos de fórmula (I) y compuestos específicos de fórmula (IIa) o (IIb) útiles para la preparación de los compuestos de fórmula (I).

45 Estos y otros objetos, características y ventajas de los compuestos de fórmula (I) se expondrán en la descripción detallada que sigue de la exposición de la patente

**Compuestos de fórmula (I)**

En un primer objeto, la presente descripción proporciona compuestos de fórmula (I):



en donde:

- 5  $Y_1, Y_2$  se seleccionan, cada uno independientemente, de -S-, -C=C-, -N=C-, con la condición de que cuando uno de  $Y_1, Y_2$  es -S- entonces el otro es -N=C-;

$Ar_1, Ar_2$  se seleccionan, cada uno independientemente, de un arilo  $C_6-C_{10}$  o un heteroarilo de 5 a 7 miembros, estando dichos grupos arilo y heteroarilo sustituidos opcionalmente con uno a tres grupos  $R_3$ , con la condición de que:

- 10 •  $Ar_1, Ar_2$  no pueden representar ambos un mismo grupo seleccionado de un 4-piridilo, un 2- ó 3-tiofenilo insustituido, un 3,4-dimetoxifenilo o un 3,4,5-trimetoxifenilo,

$i$  y  $j$  son independientemente 0 ó 1, con la condición de que:

- $i + j \geq 1$ ; y
- cuando ninguno de  $Y_1, Y_2$  es -S-, entonces  $i + j = 2$ ;

- 15  $R_1, R_2$ , se seleccionan, en cada caso, independientemente de alquilo  $C_1-C_6$ , arilo  $C_6-C_{10}$ , aril( $C_6-C_{10}$ )alquilo( $C_1-C_6$ ), aril( $C_6-C_{10}$ )alquenoilo( $C_2-C_6$ ), arilcarbonilo( $C_6-C_{10}$ ), aril( $C_6-C_{10}$ )alquilcarbonilo( $C_1-C_6$ ), C(=O)H, COOH, OH, estando dichos grupos alquilo sustituidos opcionalmente con OH;

$k$  and 1 son independientemente 0, 1;

- 20  $R_3$  se selecciona, en cada caso independientemente, de alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , OH, C(=O)H,  $(CH_2)_nCO_2H$ ,  $(CH_2)_pCN$ ,  $(CH_2)_qC(=N(OH))NH_2$ , I, Cl, Br, F, arilo  $C_6-C_{10}$ , y un heteroarilo de 5 a 7 miembros, aril( $C_6-C_{10}$ ) alquilo( $C_1-C_6$ ), aril( $C_6-C_{10}$ )alquenoilo( $C_2-C_6$ ), estando dichos grupos alquilo sustituidos opcionalmente con OH;

$n$  es 0, 1, 2, 3;

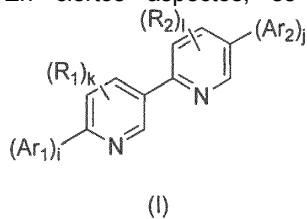
$p$  es 0, 1, 2, 3;

$q$  es 0, 1, 2, 3;

con la exclusión de los compuestos siguientes:

- 25 2-(piridin-3-il)-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridina  
 3-(5-metil-6-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)piridin-3-il)piridina  
 3-(6-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)piridin-3-il)piridina  
 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En ciertos aspectos, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Y_1$  e  $Y_2$  son ambos -N=C-.



- 30 En un aspecto particular, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_1, Ar_2$  son como se define anteriormente, con la condición de que al menos uno de  $Ar_1, Ar_2$  es un heteroarilo de 5 a 7 miembros.

En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I), en donde cuando  $Y_1$  y  $Y_2$  son ambos -N=C-, entonces al menos uno de  $Ar_1, Ar_2$  es fenilo.

En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I), en donde  $Ar_1$  y/o  $Ar_2$  se seleccionan de fenilo, piridilo, pirimidilo, imidazolilo, pirazolilo, tiofenilo, triazolilo, en particular de fenilo, 3-piridilo, 5-pirimidilo, 2-imidazolilo, 3-pirazolilo, 2-tiofenilo, 4-triazolilo.

- 5 En otro aspecto adicional, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde al menos uno de  $Ar_1$ ,  $Ar_2$  es un heteroarilo de 5 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno, preferiblemente piridilo, particularmente 3-piridilo.

En otro aspecto adicional, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_1$  es 3-piridilo o fenilo.

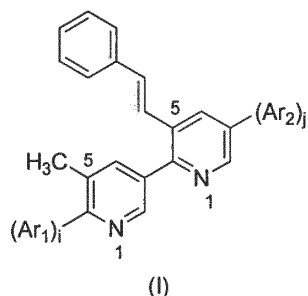
En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_2$  es 3-piridilo o fenilo.

En cierto aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $R_1$ ,  $R_2$  se seleccionan independientemente de alquilo  $C_1-C_6$ , aril( $C_6-C_{10}$ )alquenilo( $C_2-C_6$ ), preferiblemente de metilo y estirilo.

- 10 En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $R_1$  es 5-metilo.

En otro aspecto adicional, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $R_2$  es 5-estirilo.

En un aspecto preferido, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $R_1$  es 5-metilo y  $R_2$  es 5-estirilo.



En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Y_1$  es -S e  $Y_2$  es -N=C.

- 15 En todavía cierto aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_1$  es un heteroarilo de 5 a 7 miembros, en particular piridilo, y más particularmente 3-piridilo.

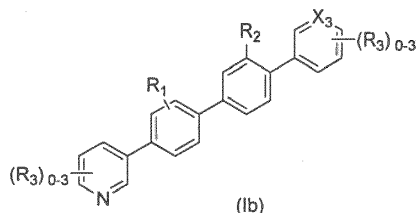
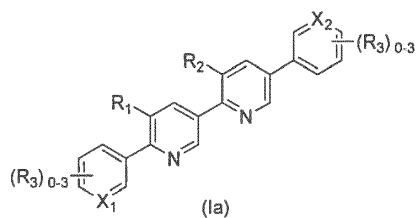
En cierto aspecto adicional, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_1$  está sustituido con un heteroarilo de 5 a 7 miembros, en particular tiofenilo, y más particularmente 3-tiofenilo.

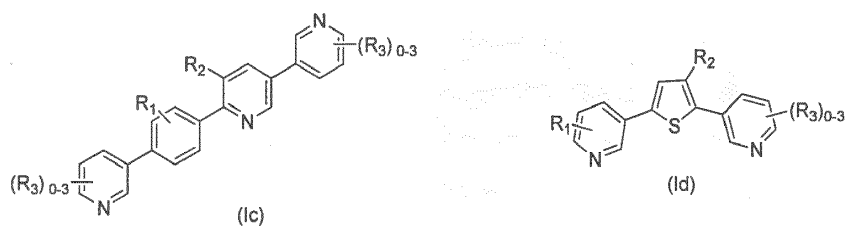
- 20 En otro aspecto adicional, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $Ar_2$  es un heteroarilo de 5 a 7 miembros, en particular piridilo o tiofenilo, más particularmente 3-piridilo, 2-tiofenilo o 3-tiofenilo.

En otros aspectos, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde  $R_1$  se selecciona de alquilo  $C_1-C_6$ , aril( $C_6-C_{10}$ )alquilo( $C_1-C_6$ ), particularmente de metilo, isopropilo, o naftil- $CH_2$ -.

En otros aspectos, se incluyen compuestos de fórmula (I) en donde las sales farmacéuticamente aceptables son sales hidrocioruro.

- 25 En otros aspectos, se incluyen compuestos de fórmula (I) seleccionados de los compuestos de fórmula (Ia), (Ib), (Ic) y (Id):





en donde:

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, se seleccionan en cada caso independientemente de C ó N;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> se seleccionan en cada caso independientemente como se define con anterioridad.

5 En otros aspectos adicionales, se incluyen compuestos de fórmula (I) que se seleccionan de:

- 5,6'-di(piridin-3-il)-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3-bipiridina (**MR29072**)
- 5,6'-di(piridin-3-il)-3,5"-bis-((E)-estiril)-[2,3';6',3"]terpiridina (**MR29075**)
- 3,5",5"-trimetil-5,6"-difeníl-[2,3';6',3"]terpiridina (**MR30802**)
- 5'-bromo-3',5-dimetil-6-(3-metil-4-piridin-3-ilfenil)-3,2'-bipiridina (**MR30804**)
- 10 • 5'-(2-metil-4-piridin-3-ilfenil)-3',5-dimetil-6-(2-metil-4-piridin-3-ilfenil)-3,2'-bipiridina (**MR30811**)
- 2-(piridin-3-il)-5-(3-metil-4-piridin-3-ilfenil)-(E)estirilbenceno (**MR 30820**)
- 3-(4-metil-5-(piridina-3-il)tiofen-2-il)piridina (**MR31327**)
- 3-(4-((naftalen-3-il)metil)-5-(piridina-3-il)tiofen-2-il)piridina (**MR31328**)
- 3-(4-isobutil-5-(piridina-3-il)tiofen-2-il)piridina (**MR31330**)
- 15 • 2-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)-5-fenil-3-estirilpiridina (**MR31348**)
- 2-(5-metil-6-fenilpiridin-3-il)-5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridina (**MR31349**)
- 5-(3-bencilpiridin-2-il)-2-(5-bencilpiridin-3-il)piridina (**MR31397**)

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En aspectos preferidos, el compuesto de fórmula (I) es:

- 20 • 5,6'-di(piridin-3-il)-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina (**MR29072**) y sus sales hidrocioruro.

#### **Método de preparación de los compuestos de fórmula (I)**

25 Los compuestos de la presente descripción se pueden preparar por cierto número de métodos bien conocidos para los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a los descritos más adelante, o por modificaciones de estos métodos aplicando métodos estándar conocidos para los expertos en la técnica de la síntesis orgánica. Los reactivos y los materiales de partida están disponibles comercialmente, o son sintetizados fácilmente por métodos bien conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Todos los sustituyentes, a no ser que se indique otra cosa, son como se ha definido con anterioridad. Todos los procesos descritos en asociación con la presente descripción se considera que pueden realizarse en cualquier escala, con inclusión de miligramos, gramos, multigramos, o en la escala comercial de la industria.

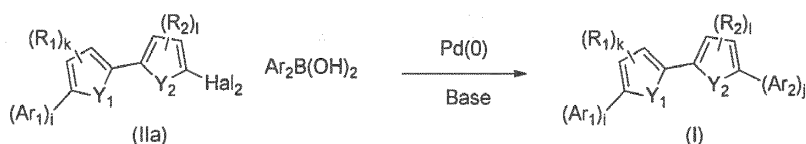
30 Como se comprenderá fácilmente, los grupos funcionales presentes en los compuestos de Fórmula I pueden contener grupos protectores. Los grupos protectores son conocidos per se como grupos funcionales químicos que pueden unirse selectivamente como apéndice a y eliminarse de funcionalidades, tales como grupos hidroxilo y grupos carboxilo. Estos grupos están presentes en un compuesto químico para hacer dicha funcionalidad inerte en las condiciones químicas de la reacción a la que se expone el compuesto. Cualquiera de una diversidad de grupos protectores puede emplearse con la presente descripción. Otros grupos protectores preferidos conforme a la descripción pueden encontrarse en Greene, T. W. y Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis" 2ª Ed., Wiley & Sons, 1991, o en P. J. Kocienski, "Protecting Groups", 3ª Ed., Thieme, Stuttgart, NY, 2004.

El compuesto así preparado puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden separarse por destilación de la mezcla disolvente después de la extracción o, si es necesario, después de separación por destilación de la mezcla disolvente, vertido del residuo en agua seguido por extracción con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y separación por destilación de la mezcla disolvente. Además, el producto puede, en caso deseado, purificarse ulteriormente por diversas técnicas bien conocidas, tales como recristalización, precipitación o las diversas técnicas de cromatografía, particularmente cromatografía en columna o cromatografía preparativa en capa fina, en particular Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

5

En otro objeto, la presente descripción se refiere a un método para preparación de un compuesto de fórmula (I) como se define en esta memoria, que comprende los pasos de:

- 10 i) hacer reaccionar un compuesto (IIa) con  $Ar_2B(OH)_2$  en presencia de un catalizador de paladio ( $Pd^0$ ) y una base conforme a un acoplamiento de Suzuki-Miyaura;



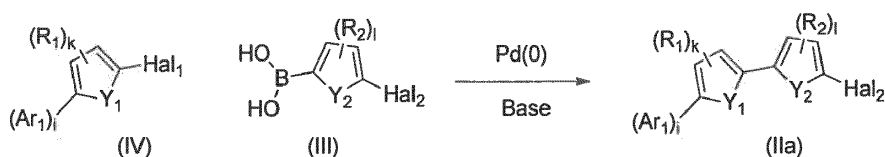
en donde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $l$  son como se define anteriormente, y  $Hal_2$  es I o Br; y opcionalmente

- ii) recuperar el compuesto de fórmula (I) obtenido.

15

En un aspecto adicional, el compuesto de fórmula (IIa) se prepara conforme a un proceso que comprende los pasos de:

- i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV) con ácido borónico (III) en presencia de un catalizador de paladio ( $Pd^0$ ) y una base conforme a un acoplamiento de Suzuki-Miyaura;



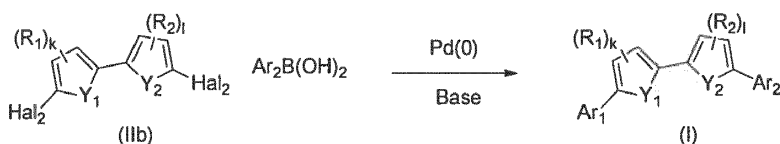
20

en donde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $l$  son como se ha indicado anteriormente, y  $Hal_1$  es I o Br, y  $Hal_2$  es Cl; y opcionalmente

- ii) recuperar el compuesto de fórmula (IIa) obtenido.

- 25 En otro objeto, la presente descripción se refiere a un método para preparación de un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente, que comprende los pasos de:

- i) hacer reaccionar un compuesto (IIb) con  $Ar_2B(OH)_2$  en presencia de un catalizador de paladio ( $Pd^0$ ) y una base conforme a un acoplamiento de Suzuki-Miyaura:



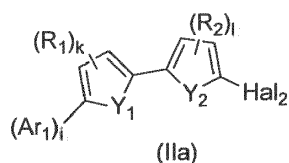
30

en donde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $k$ ,  $l$  son como se define anteriormente, siendo  $Ar_1$  y  $Ar_2$  iguales, y  $Hal_2$  es I o Br; y opcionalmente

- ii) recuperar el compuesto de fórmula (I) obtenido.

**Compuestos sintéticos intermedios útiles para preparar los compuestos de fórmula (I)**

En un objeto adicional, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (IIa):



en donde

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $l$  son como se define anteriormente, y

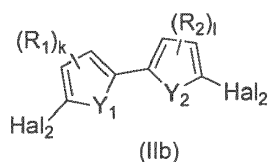
$Hal_2$  es I, Br o Cl.

5 Como ejemplo, los compuestos de fórmula (IIa), se pueden seleccionar de:

- 2-(6-bromo-5-metilpiridin-3-il)-5-(5-cloro-1-metil-1H-imidazol-2-il)-3-estirilpiridina (**MR31352**)
- 2-bromo-3-metil-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridina (**MR31360**)
- 5-(6-(6-bromo-5-metilpiridin-3-il)-5-estirilpiridin-3-il)pirimidina (**MR31362**)
- 3-(6-(6-bromo-5-metilpiridin-3-il)-5-estirilpiridin-3-il)fenol (**MR,31377**)

10 • 2-(3-(6-(6-bromo-5-metilpiridin-3-il)-5-estirilpiridin-3-il)fenil)acetonitrilo (**MR31380**)

En todavía un objeto adicional, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (IIb):



$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $i$ ,  $j$ ,  $k$ ,  $l$  son como se define anteriormente, y

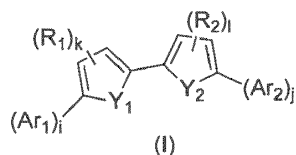
$Hal_2$  es I o Br.

15 Como ejemplo, los compuestos de fórmula (IIb) se pueden seleccionar de:

- 5-bromo-2-(6-bromo-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR29061)
- 5-bromo-2-(6-iodo-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR29069)

### **Composiciones farmacéuticas**

20 En otro objeto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde

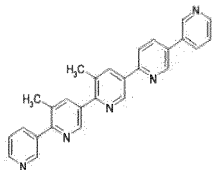
$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Ar_1$ ,  $Ar_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $i$ ,  $j$ ,  $k$  y  $l$  son como se define anteriormente, y sus sales farmacéuticamente aceptables, con exclusión de los compuestos:

- 25
- 2-(piridin-3-il)-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridina
  - 3-(5-metil-6-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)piridin-3-il)piridina
  - 3-(6-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)piridin-3-il)piridina en mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

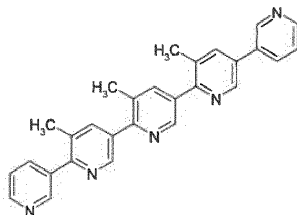
30 En un aspecto particular, se incluyen composiciones farmacéuticas como se han definido anteriormente en donde están excluidos los compuestos siguientes de fórmula (I):



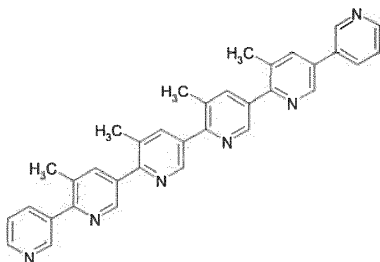
- 3,3'-dimetil- 2,5"-dipiridin-3-il-[2,5';2',5"]terpiridina



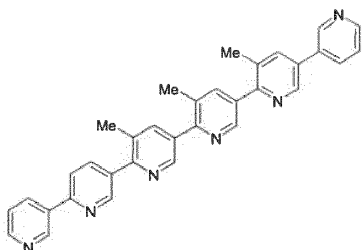
- 3,3',3"-trimetil- 2,5"-dipiridin-3-il-[2,5';2',5"]terpiridina



- 5 • 3,3',3'',3'''-tetrametil- 2,5"-dipiridin-3-il-[2,5';2',5'';2'',5''']quaterpiridina



- 3',3''',3''"-trimetil- 2,5"-dipiridin-3-il[2,5';2',5''; 2'',5''']quaterpiridina



10 En un aspecto particular, se incluyen composiciones farmacéuticas en donde los compuestos de fórmula (I) son como se han definido anteriormente con la condición de que:

cuando  $Y_1$  e  $Y_2$  son ambos  $N = C$ , o uno de  $Y_1$ ,  $Y_2$  es  $N = C$  y el otro es  $C = C$ , y  $Ar_1$ ,  $Ar_2$  son ambos piridinilo, entonces al menos uno de  $R_1$ ,  $R_2$  está presente y es diferente de  $H$  o  $CH_3$ .

En otros aspectos, se incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden adicionalmente un inhibidor de  $Bcl-x_L$ , particularmente un inhibidor  $BH_3$ -mimético, tal como HA 14-1, ABT-737 o ABT-263.

15 Como será evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica, las formulaciones específicas de dicha composición farmacéutica pueden seleccionarse basándose en el tipo de cáncer que se esté tratando.

Las composiciones de la descripción pueden formularse para administración a un paciente con materiales que mejoren su estabilidad y/o proporcionen una liberación controlada o sostenida *in vivo*.

20 Estas composiciones farmacéuticas se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y pueden administrarse por una diversidad de rutas, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar.

25 La administración puede ser tópica (incluyendo piel, membranas oftálmicas y mucosas que incluyen suministro intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (p. ej. por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), ocular, oral o parenteral. Los métodos para suministro ocular pueden incluir administración tópica (gotas oftálmicas), inyección subconjuntiva, periocular o

intravítrea o introducción por catéter balón o inserciones oftálmicas colocadas quirúrgicamente en el saco conjuntivo. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, p. ej. intratecal o intraventricular.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse a fin de proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden usualmente vehículos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, conservantes, solubilizadores, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. Las mismas pueden contener también todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas. Estos ingredientes se seleccionan sobre la base del modo y la ruta de administración. Ingredientes farmacéuticos adecuados, así como requerimientos farmacéuticos para uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin).

15 La dosificación terapéutica de los compuestos de la presente descripción puede variar conforme, por ejemplo, al uso particular para el cual se realiza el tratamiento, el modo de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el criterio del clínico encargado del tratamiento. La proporción o concentración de un compuesto de la descripción en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores que incluyen dosis, características químicas (p. ej. hidrofobicidad), y la ruta de administración.

### Combinaciones

20 En algunas realizaciones, los compuestos de la descripción pueden asociarse con al menos un segundo agente terapéutico.

25 Así, los compuestos pueden administrarse con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, o quimioterapéutico del cáncer. La administración concurrente de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administran al mismo tiempo, durante el mismo periodo de tiempo o por la misma ruta, con tal que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes estén ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla administración simultánea o secuencial, así como su administración en días o semanas diferentes.

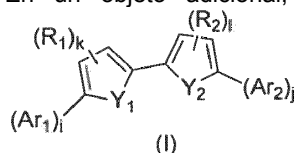
30 Otros agentes terapéuticos útiles que pueden administrarse en combinación con los presentes compuestos incluyen agentes que están direccionados a otros miembros de la familia Bcl-2. Un agente anti-Bcl-2 puede ser cualquier agente que module la actividad de Bcl-2 y puede incluir oligonucleótidos anti-Bcl-2, anticuerpos anti-Bcl-2 e inhibidores de molécula pequeña. Inhibidores de molécula pequeña ilustrativos incluyen gosipol y análogos de gosipol (p. ej., AT-101); el derivado de bencenosulfonilo, TW37; el derivado apogosipol, Sabutoclax; la serie ABT de compuestos que incluyen ABT-199, ABT-737 y el análogo disponible por vía oral, ABT-263; Obatoclax; y HA14-1.

35 La presente descripción se refiere preferiblemente a una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) en combinación con un inhibidor de Bcl-x<sub>L</sub>, particularmente un inhibidor BH<sub>3</sub>-mimético, tal como HA14-1, ABT-737 o ABT-263.

### Compuestos de fórmula (I) para uso en el tratamiento del cáncer

Los compuestos y composiciones descritos en esta memoria son general y diversamente útiles para tratamiento del cáncer.

En un objeto adicional, la presente descripción se refiere por tanto a un compuesto de fórmula (I),



40 en donde:

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Ar<sub>1</sub>, Ar<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, i, j, k y 1 son como se define anteriormente y sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento del cáncer; particularmente cánceres que son sensibles a la modulación de Mcl-1.

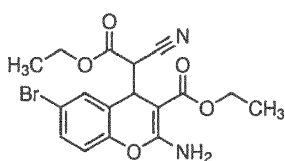
45 Cánceres susceptibles de tratamiento por los métodos terapéuticos de la descripción pueden ser cánceres que son sensibles a la modulación de Mcl-1; cualquier forma de cáncer que esté asociada con la regulación defectuosa de Mcl-1 (p. ej., sobreexpresión o fijación o actividad destruida) está por tanto dentro del alcance de la descripción.

Cánceres o trastornos neoplásicos incluyen, por ejemplo, sin limitación, cáncer de mama, cánceres hematológicos tales como mieloma, leucemia y linfoma (p. ej. linfoma de Burkitt, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Hodgkin, y leucemia aguda de las células T), tumores neurológicos tales como tumores cerebrales, p. ej. gliomas, con inclusión de astrocitomas o glioblastomas, melanomas, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, tumores

gastrointestinales tales como cáncer de estómago, colon o rectal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, tumores genitourinarios tales como cáncer ovárico, cáncer vaginal, cáncer vulvar, cáncer endometrial, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer de próstata, o cáncer de pene, tumores óseos, tumores vasculares, y cánceres de piel tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma.

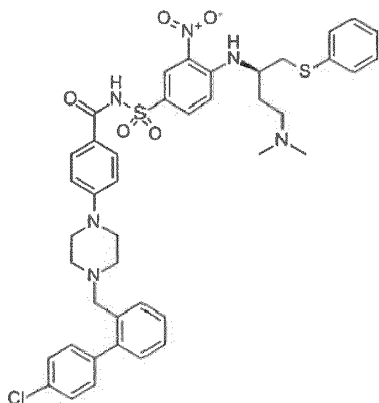
- 5 Preferiblemente, los compuestos de fórmula (I) son útiles para el tratamiento de enfermedades malignas hematológicas, por ejemplo, linfoma, leucemia, mieloma múltiple; y de tumores sólidos tales como cánceres ováricos, mesotelioma, melanoma, y cánceres de páncreas, pulmón, mama, riñón e hígado. Enfermedades malignas hematológicas han sido descritas como adictas a Mcl-1 (Dai et al., (2007) Cancer Res., 67(7), 2908-11; Yecies et al., (2010) Blood, 115(16), 3304-13) para la respuesta a estrategias de direccionamiento a Bcl-x<sub>L</sub>.
- 10 En un aspecto particular, los compuestos de fórmula (I) se administran junto con un inhibidor de Bcl-x<sub>L</sub>, particularmente un inhibidor BH<sub>3</sub>-mimético, tal como:

- Ácido 2-amino-6-bromo-a-ciano-3-(etoxicarbonil)-4H-1-benzopirán-4-acético, éster etílico (denominado también HA 14-1),



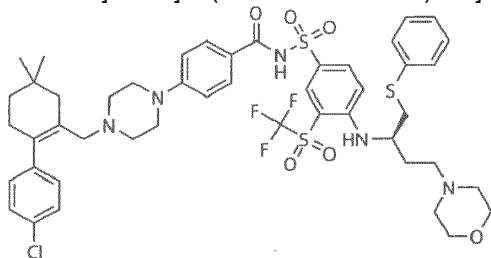
HA 14-1

- 15 • 4-[4-[[2-(4-clorofenil)fenil]metil]piperazin-1-il]-N-[4-[[2(R)-4-(dimetilamino)-1-fenilsulfanilbutan-2-il]amino]-3-nitrofenil] sulfonilbenzamida (denominado también ABT-737)



ABT-737

- 4-[4-[[2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohexen-1-il]metil]piperazin-1-il]-N-[4-[[2(R)-4-morfolin-4-il-1-fenil-sulfanilbutan-2-il]amino]-3-(trifluorometilsulfonil)fenil]sulfonilbenzamida (denominada también ABT-263).



ABT-263

- 20 En otro aspecto, se incluyen compuestos de fórmula (I), para uso con objeto de inducir la apoptosis mediada por la proteína Mcl-1.

Un paciente se trata eficazmente siempre que se sigue un resultado clínicamente beneficioso. Esto puede significar, por ejemplo, una resolución completa de los síntomas de una enfermedad, una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o una ralentización de la progresión de la enfermedad.

- 5 Una cantidad eficaz de cualquier composición proporcionada en esta memoria puede administrarse a un individuo que se encuentra en necesidad de tratamiento. El término "eficaz", como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier cantidad que induce una respuesta deseada en tanto que no induce una toxicidad significativa en el paciente. Dicha cantidad puede determinarse por evaluación de la respuesta de un paciente después de la administración de una cantidad conocida de una composición particular.

#### **Métodos para tratamiento de cánceres que son sensibles a la modulación de Mcl-1**

- 10 La presente descripción se refiere también a métodos de administración de las composiciones para tratar el cáncer, métodos de destrucción de las células del cáncer y métodos de modulación de los niveles de Mcl-1 en una célula. Los métodos terapéuticos descritos en esta memoria pueden llevarse a cabo en conexión con otras terapias citotóxicas (p. ej., quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia, y terapias basadas en anticuerpos).

- 15 En una realización preferida, el compuesto y la composición de la descripción son útiles para prevención o reducción de las metástasis o diseminación ulterior en un paciente que sufre un cáncer que expresa Mcl-1; más específicamente, aquéllos son útiles para aumentar la duración de supervivencia de dicho paciente, aumentar la supervivencia exenta de progresión de dicho paciente, aumentar la duración de respuesta, dando como resultado una mejora estadísticamente importante y clínicamente significativa del paciente tratado tal como se mide por la duración de supervivencia, supervivencia exenta de progresión, tasa de respuesta o duración de respuesta. En una realización preferida, el medicamento es útil para aumentar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

- 20 Los detalles de una o más realizaciones de la descripción se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas de la descripción resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, así como de las reivindicaciones.

#### **Definiciones**

- 25 Los términos y expresiones que siguen contenidos en esta memoria se definen como sigue: Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alquilo" se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal, o ramificado que tiene 1 a 8 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, neopentilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, hexilo, octilo, etc. El resto alquilo de los grupos que contienen alquilo, tales como alcoxi, y alcocarbonilo, tiene el mismo significado que alquilo definido anteriormente. Los grupos alquilo inferior, que se prefieren, son grupos alquilo como se han definido anteriormente que contienen 1 a 4 carbonos. Una designación tal como "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un radical alquilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

- 35 Como se utiliza en esta memoria, el término "alquenilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal, o ramificada de 2 a 6 átomos de carbono que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono. Una designación "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un radical alquenilo que contiene de 2 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, isopropenilo, 2,4-pentadienilo. Se prefieren particularmente "alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>".

Como se utiliza en esta memoria, el término "alcoxi" significa un grupo alquilo-O- en donde el grupo alquilo es como se describe en esta memoria. Grupos alcoxi ilustrativos incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, y n-butoxi.

- 40 Como se utiliza en esta memoria, el término "arilo" se refiere a un sistema hidrocarbonado de anillo aromático sustituido o insustituido, mono- o bicíclico que tiene 6 a 10 átomos de carbono en anillo. Ejemplos incluyen fenilo y naftilo.

Como se utiliza en esta memoria, el término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con un grupo arilo. Ejemplos de grupos arilalquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo, bromobencilo, fenetilo, benzhidrilo, difenilmetilo, trifenilmetilo, difeniletilo, naftilmetilo.

- 45 Como se utiliza en esta memoria, el término "arilalquenilo" se refiere a un grupo alquenilo que está sustituido con un grupo arilo. Ejemplos de arilalquenilo incluyen, pero no se limitan a, estirilo.

Como se utiliza en esta memoria, el término "arilcarbonilo" se refiere a un grupo aril-C(=O)- en donde el grupo arilo es como se describe en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, el término "arilalquilcarbonilo" se refiere a un grupo arilalquilo-C(=O)- en donde el grupo arilalquilo es como se describe en esta memoria.

- 50 Como se utiliza en esta memoria, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático que contiene 5 a 10 átomos de carbono en anillo, preferiblemente 5 a 7, en el cual uno o más átomos de carbono en anillo están reemplazados por al menos un heteroátomo tal como -O-, -N-, o -S-. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, oxatiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, oxatriazolilo,

furazanilo, tetrazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, purinilo, quinazolinilo, quinolilo, isoquinolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzotiofenilo, tianafenilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, cinnolinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, y quinoxalinilo. Incluidos dentro de la definición de "heteroarilo" se encuentran sistemas de anillos condensados, que incluyen, por ejemplo, sistemas de anillos en los cuales un anillo aromático está condensado con un anillo heterocicloalquilo. Ejemplos de tales sistemas de anillos condensados incluyen, por ejemplo, ftalamida, anhídrido ftálico, indolina, isoindolina, tetrahidroisoquinolina, cromano, isocromano, cromeno, e isocromeno.

Como se utiliza en esta memoria, el término "individuo" se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero, preferiblemente un humano, o un niño humano, que está afligido con, o tiene la posibilidad de verse afligido con una o más enfermedades y condiciones descritas en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente descripción eficaz para prevenir o tratar los síntomas de trastornos particulares. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, aquellos trastornos patológicos y neurológicos asociados con la actividad aberrante de los receptores descritos en esta memoria, en donde el tratamiento o la prevención comprende inhibición, inducción, o mejora de la actividad de los mismos por la puesta en contacto del receptor con un compuesto de la presente descripción.

Como se utiliza en esta memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un criterio médico sólido, adecuados para contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, o respuesta alérgica excesiva, u otras complicaciones problemáticas compatibles con una ratio beneficio/riesgo razonable.

Los significados de todos los términos restantes utilizados en la exposición de la presente descripción son bien conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente descripción está dirigida a sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos anteriormente. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos de la presente descripción derivadas de la combinación de tales compuestos con sales de adición de ácidos o bases no tóxicas.

Las sales de adición de ácido incluyen ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, nítrico, y fosfórico, así como ácidos orgánicos tales como los ácidos acético, cítrico, propiónico, tartárico, glutámico, salicílico, oxálico, metanosulfónico, para-toluenosulfónico, succínico, y benzoico, y ácidos inorgánicos y orgánicos afines.

Sales de adición de base incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, y análogos de amonio y metales alcalinos y alcalinotérreos, así como sales derivadas de aminas orgánicas básicas tales como aminas alifáticas y aromáticas, diaminas alifáticas, hidroxil-alcaminas, y análogas. Tales bases útiles en la preparación de las sales de esta descripción incluyen así hidróxido de amonio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, metilamina, dietilamina, etilendiamina, ciclohexilamina, etanolamina y análogas.

Además de sales farmacéuticamente aceptables, se incluyen en la descripción otras sales. Las mismas pueden servir como compuestos intermedios en la purificación de los compuestos, en la preparación de otras sales, o en la identificación y caracterización de los compuestos o compuestos intermedios.

#### Descripción de los dibujos

**La Figura 1** muestra el efecto de Pyridoclax y ABT-737 sobre las interacciones Mcl-1/Puma y Noxa/Mcl-1 en el ensayo BRET (Figuras 1A y 1B, respectivamente); Pyridoclax es capaz de destruir ambas interacciones Mcl-1/Puma y Noxa/Mcl-1, mientras que ABT-737 no es capaz de modificar estas interacciones.

**La Figura 2** muestra el efecto de Pyridoclax sobre las células de cáncer ovárico IGROV1-R10, solo o asociado a un siRNA direccionado a Bcl-x<sub>L</sub> (siXL1). Las células se transfectaron con siRNA 10nM durante 48 horas antes de una exposición de 24h (A, B, C, D) o 2, 4, 6h (E) a Pyridoclax 25µM. [A] Morfología celular, histogramas de contenido de DNA e histogramas bi-paramétricos Anexina V/yoduro de propidio. [B]: Ensayo de exclusión de azul Tripán. [C]: Expresión de Bcl-x<sub>L</sub> y escisión de PARP y caspasa 3 evaluadas de transferencia Western. [D]: Morfología nuclear estudiada después de tinción con DAPI (arriba) y morfología celular estudiada por microscopía electrónica. [E]: Efectos en tiempo breve de la asociación Pyridoclax/siXL1 (evaluados 2, 4 y 6h después del comienzo de la exposición a Pyridoclax). Morfología celular e histogramas de contenido de DNA (panel izquierdo) y escisión de PARP y caspasa 3 evaluadas de transferencia Western (panel derecho).

**La Figura 3** ilustra el efecto de Pyridoclax solo o asociado a un siRNA direccionado a Bcl-x<sub>L</sub> (siXL1) en líneas de células de cáncer ovárico, de pulmón y mesotelial. Las células se transfectaron con siRNA 10 nM durante 48 horas antes de una exposición de 24 horas a Pyridoclax 25µM. El desprendimiento de células y la proporción de fracción

sub-G1 en los histogramas de DNA se evaluaron por la observación de la morfología celular y por citometría de flujo, respectivamente, en células de carcinoma ovárico [A] y células de cáncer de pulmón o mesotelioma [B].

**La Figura 4** representa el efecto de la asociación de Pyridoclax con ABT-737 sobre células de cáncer ovárico quimioresistentes IGROV1-R10 (arriba) y SKOV3 (abajo). Las células se expusieron concomitantemente (A, E) o secuencialmente (B) a Pyridoclax 25µM y ABT-737 5µM, y los efectos celulares se evaluaron a lo largo del tiempo (A, B, E) o después de 24h (C, D, F). [A, B, E] actividad celular en tiempo real evaluada por impedancimetría (tecnología xCELLigence), después de exposición concomitante (A, E) o exposición secuencial (B; 24h Pyridoclax, luego ABT-737). [C]: morfología celular e histogramas de contenido de DNA después de una exposición concomitante de 24 h. [D and F]: Escisión de PARP y caspasa 3 después de una exposición concomitante de 24 h.

## 10 Ejemplos

### I. Síntesis de los compuestos de fórmula (I)

A continuación, se describen materiales y métodos

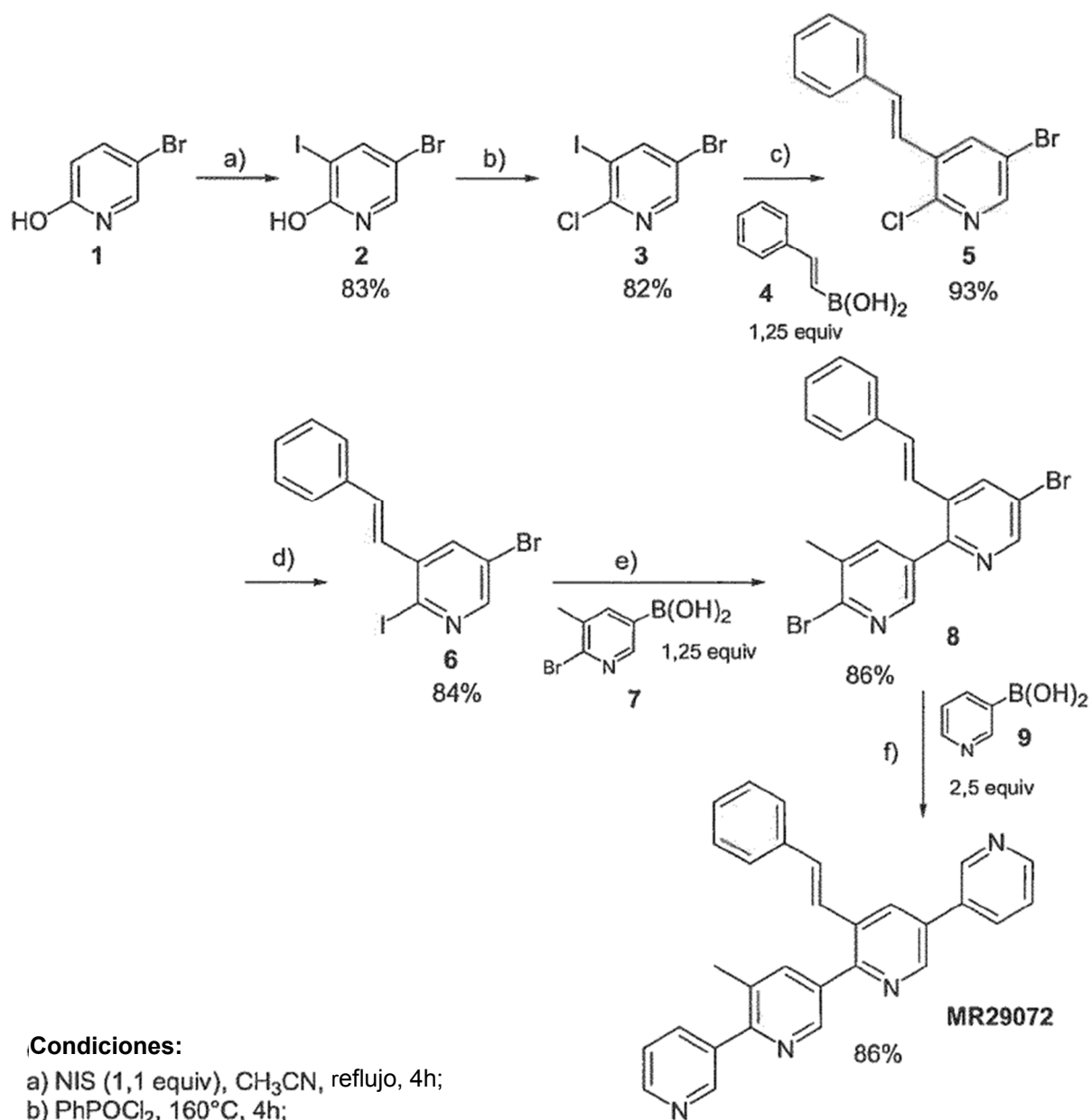
#### Materiales

Se utilizaron reactivos comerciales tal como se recibieron, sin purificación adicional. Los puntos de fusión se determinaron en un banco de calentamiento Kofler. Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR BX. Las posiciones de las bandas se dan en cm recíprocos (cm<sup>-1</sup>). Los espectros <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) y <sup>13</sup>C NMR (100 MHz) se registraron en un espectrómetro JEOL Lambda 400. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm en campo decreciente a partir de tetrametilsilano como estándar interno y las constantes de acoplamiento en hercios. Los desplazamientos químicos se consignan en partes por millón (ppm) con relación a la resonancia del disolvente. La cromatografía se llevó a cabo en una columna, utilizando gel de sílice flash 60 Merck (0,063-0,200 mm) como la fase estacionaria. El disolvente de elución indicado para cada purificación se determinó por cromatografía en capa fina (TLC) realizada sobre placas de 0,2 mm de gel de sílice 60F-264 (Merck) previamente recubiertas y las manchas se visualizaron utilizando una lámpara de luz ultravioleta. Se realizaron análisis elementales de los nuevos compuestos, y los datos para C, H, y N estaban dentro de ±0,4 de los valores teóricos para todos los compuestos finales.

#### Métodos

Los oligosistemas (het)aromáticos de la descripción se sintetizaron conforme al mismo procedimiento utilizado para obtener MR29072 a partir de 5-bromo-2-Hydroxy piridina 1, ácido trans-fenilvinilborónico 4 y ácido 6-bromo-5-metilpiridin-3-ilborónico 7, y que se expone en el esquema 1 y en el ejemplo 1 siguiente.

30

**Condiciones:**

- a) NIS (1,1 equiv), CH<sub>3</sub>CN, reflujo, 4h;  
 b) PhPOCl<sub>2</sub>, 160°C, 4h;  
 c) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,05 equiv), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,5 equiv), 1,4-dioxano, reflujo, 24h;  
 d) NaI (5 equiv), CH<sub>3</sub>COCl (1,5 equiv), CH<sub>3</sub>CN, 100°C, 1h, C=0,25M, microondas;  
 e) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,05 equiv), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2,5 equiv), DME, reflujo, 20h;  
 f) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 equiv), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 equiv), 1,4-dioxano, reflujo, 24h;

Esquema 1

**Ejemplo 1: 5,6'-di(piridin-3-il)-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina (MR 29072)**

Se añadió N-yodosuccinimida sólida (7,1 g, 32 mmol) en acetonitrilo (120 mL) a 5-bromo-2-hidroxipiridina **1** (5 g, 29 mmol). La solución se agitó a reflujo durante 4 horas y se siguió por TLC. La solución se enfrió a la temperatura ambiente, se filtró y se lavó con metanol. Se obtuvo 5-bromo-2-hidroxi-3-yodopiridina **2** como un sólido de color rosado (rendimiento: 83%).

Se disolvió **2** (9 g, 30 mmol) en dicloruro fenilfosfónico al 90% (100 µl, 0,3 mol). La mezcla se agitó y se calentó (160°C) durante 4 horas y se siguió por TLC. A la temperatura ambiente, se introdujo la misma gota a gota en un vial de 1 L, se llenó con agua y se enfrió a 0°C. La solución se neutralizó por adición de solución de NH<sub>4</sub>OH. La mezcla se extrajo en acetato de etilo. El producto se obtuvo como un sólido blanco, 5-bromo-2-cloro-3-yodopiridina **3** (rendimiento: 82%).

A una vasija de reacción (100 mL) en una atmósfera de nitrógeno que contenía **3** (5 g, 15,7 mmol) se añadieron ácido trans-fenilvinilborónico **4** (2,7 g, 18 mmol), tetraquis-trifenilfosfina (907 mg, 0,8 mmol), y carbonato de sodio (4,2 g, 39 mmol) en 1,4 dioxano (100 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas hasta consumo del material de partida seguido por TLC. El producto se enfrió a la temperatura ambiente; y se filtró sobre Celite. La solución se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía (c-hexano: acetato de etilo = 99:1, luego 98:2) para proporcionar 5-bromo-2-cloro-3-((E)-estiril)-piridina **5** (rendimiento: 93%).

Se añadieron a **5** (200 mg, 0,7 mmol) yoduro de sodio (1 g, 6,8 mmol), cloruro de acetilo (0,07 mL, 1 mmol), y acetonitrilo (10 mL). La solución se agitó bajo irradiación de microondas durante 1 hora a 100°C. A la temperatura ambiente, se neutralizó la mezcla con una solución de NaHCO<sub>3</sub>. Después de extracción y lavado con bisulfito de sodio sólido/agua, la capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El producto se purificó por cromatografía (c-hexano: acetato de etilo = 98:2, luego 95:5) para obtener 5-bromo-2-yodo-3-((E)-estiril)-piridina **6** (rendimiento: 84%).

A una vasija de reacción (100 mL) en atmósfera de nitrógeno que contenía **6** (1,4 gramos, 3,6 mmol) se añadieron ácido 6-bromo-5-metilpiridin-3-ilborónico **7** (978 mg, 4,5 mmol), tetraquis-trifenilfosfina (210 mg, 0,18 mmol), fosfato de potasio (2,1 g, 9 mmol) en 1,2-dimetoxietano (30 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 20 horas hasta consumo del material de partida seguido por TLC. A la temperatura ambiente, se extrajo la solución con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía (c-hexano: acetato de etilo = 95:5, luego 9:1 y 8:2), obteniéndose 5,6'-dibromo-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina **8** (rendimiento: 86%).

A una vasija de reacción (100 mL) en atmósfera de nitrógeno que contenía **8** (320 mg, 0,7 mmol) se añadieron ácido piridin-3-ilborónico **9** (156 mg, 1,7 mmol), tetraquis-trifenilfosfina (78 mg, 0,07 mmol), carbonato de sodio (355 mg, 3,35 mmol) en 1,4-dioxano (20 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas hasta consumo del material de partida seguido por TLC. A la temperatura ambiente, se filtró la suspensión sobre Celita y se extrajo la solución con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El producto se purificó por cromatografía (c-hexano: acetato de etilo = 8:2, luego 7:3 y 50:50) para obtener 5,6'-di(piridin-3-il)-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina **MR29072** (rendimiento: 86%) como un sólido blanco (Pf 158°C) IR (KBr): 2957, 1727, 1575, 1274, 1125, 1014, 967, 801, 770, 688 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,98 (d, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 1H), 8,91 (d, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 1H), 8,87 (m, 2H), 8,72 (dd, <sup>3</sup>J=4,9 Hz, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 2H), 8,68 (dd, <sup>3</sup>J=4,9 Hz, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 1H), 8,24 (d, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 1H), 8,00 (m, 3H), 7,48 (d, <sup>3</sup>J=7,8 Hz, 3H), 7,44 (dd, <sup>3</sup>J=7,8 Hz, <sup>4</sup>J=1,9 Hz, 1H), 7,36 (d, <sup>3</sup>J=7,8 Hz, 1H), 7,31 (d, <sup>3</sup>J=7,8 Hz, 1H), 7,28 (d, <sup>3</sup>J=16,6 Hz, 1H), 7,23 (d, <sup>3</sup>J=16,6 Hz, 1H), 2,51 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155,3, 153,4, 149,9, 149,6, 149,2, 148,2, 148,0, 146,9, 139,8, 136,5, 136,3, 135,8, 134,4, 134,1, 133,1, 133,0, 132,9, 132,6, 132,0, 131,1, 128,8 (2C), 128,5, 126,8 (2C), 124,6, 123,8, 123,2, 20,0. LCMS (EI): m/z (%)=[M+H]<sup>+</sup> teórico: 427,53, experimental: 427,32. Análisis Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>: C, 81,67; H, 5,20; N, 13,14. Encontrado: C, 81,65; H, 5,25; N, 13,23.

Este primer procedimiento se aplica a los compuestos 3-metil-5-(3-(E)-estiril-5-(tiofen-3-il)piridin-2-il)-2-(tiofen-3-il)piridina (MR31322), 3-metil-2-(3-metiltiofen-2-il)-5-(5-(3-metiltiofen-2-il)-3-(E)-estirilpiridin-2-il)piridina (MR31336), 3-metil-5-(3-(E)-estiril-5-(tiofen-2-il)piridin-2-il)-2-(tiofen-2-il)piridina (MR31321), 2-(5-metil-6-(1H-pirazol-5-il)piridin-3-il)-5-(1H-pirazol-5-il)-3-estirilpiridina (MR31363), 5-(2-cloro-1-metil-1H-imidazol-5-il)-2-(6-(2-cloro-1-metil-1H-imidazol-5-il)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR31351), 3-metil-2-(4-cianofenil)-5-(5-(4-cianofenil)-3-estirilpiridin-2-il)piridina (MR30854), 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(6-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30847), 2-(3,4-dimetoxifenil)-5-(5-(3,4-dimetoxifenil)-3-estirilpiridin-2-il)-3-metilpiridina (MR30846), 4-(3-metil-5-(5-(piridin-4-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)piridina (MR31350), 3-metil-2-fenil-5-(5-fenil-3-estirilpiridin-2-il)piridina (MR30814), 5-(3-metil)-5-(5-(pirimidin-5-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)pirimidina (MR31361)

A partir de 5,6'-dibromo-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina **8** introducida en una vasija de reacción (100 mL) en atmósfera de nitrógeno con ácido tiofeno-3-borónico, ácido 3-metil-tiofeno-2-borónico, ácido tiofeno-2-borónico, 1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol, 2-cloro-1-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-imidazol, ácido 4-ciano-fenilborónico, ácido 3,4,5-trimetoxifenilborónico, ácido 3,4-dimetoxifenilborónico, 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina, ácido bencenoborónico, ácido pirimidin-5-il-borónico, tetraquis-trifenilfosfina, y carbonato de sodio en 1,4-dioxano (20mL), se obtuvieron respectivamente MR31322, MR31336, MR31321, MR31363, MR31351, MR30854, MR30847, MR30846, MR31350, MR30814, MR31361.

**Ejemplo 2: 3-metil-5-(3-(E)-estiril-5-(tiofen-2-il)piridin-2-il)-2-(tiofen-2-il) piridina (MR31321)**



<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,90 (d, 1H, H6', J= 1,96 Hz), 8,73 (d, 1H, H6', J= 1,96 Hz), 8,18 (d, 1H, H4', J= 1,96 Hz), 7,95 (d, 1H, H4', J= 1,96 Hz), 7,58 (d, 1H, H3''', J= 3,87 Hz), 7,49-7,46 (m, 4H, 2H orto Ph, H5'' y H5'''), 7,43 (d, 1H, H3'', J= 3,87 Hz), 7,38-7,34 (dd, 2H meta Ph, J= 7 Hz), 7,30 (m, 1H para Ph, J= 7 Hz), 7,20 (s, 2H, CH=CH), 7,19-7,17 (m, 2H, H4'' y H4'''), 2,68 (3H, CH<sub>3</sub>).

5 MS(EI): 437[M+]\*.

**Ejemplo 3: 3-metil-5-(3-(E)-estiril-5-(tiofen-3-il)piridin-2-il)-2-(tiofen-3-il)piridina (MR31322)**

10 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,89 (d, 1H, H6', J= 1,92 Hz), 8,77 (d, 1H, H6', J= 1,92 Hz), 8,21 (d, 1H, H4', J= 1,92 Hz), 7,96 (1H, H4', J= 1,92 Hz), 7,68-7,66 (dd, 2H, H5'' y H5''', J= 2,92 Hz, J= 7,4 Hz), 7,57 (d, 1H, H para Ph, J= 7 Hz), 7,51 (d, 2H, H2'' y H5''', J= 2,92 Hz), 7,47 (d, 2H orto Ph, J= 7 Hz), 7,43- 7,41 (dd, 2H, H4'' y H4''', J= 2,92 Hz), 7,38-7,34 (dd, 2H meta Ph, J= 7 Hz), 7,26-7,21 (m, 2H, CH=CH), 2,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 437 [M+]\*.

**Ejemplo 4: 3-metil-2-(3-metil-2-(tiofen-2-il)-5-(5-(3-metil-2-(tiofen-2-il)-3-(E)-estiril-2-il)piridin-2-il)piridina (MR31336)**

15 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 8,68 (d, 1H, H6', J=1,92 Hz), 8,59 (d, 1H, H6', J=1,92 Hz), 8,07 (d, 1H, H4', J= 1,92 Hz), 7,95 (d, 1H, H4', J= 1,92 Hz), 7,52-7,28 (m, 7H), 7,25-7,6,95 (m, 4H), 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  
MS(EI): 466 [M++H, 100].

**Ejemplo 5 : 2-(5-metil-6-(1H-pirazol-5-il)piridin-3-il)-5-(1H-pirazol-5-il)-3-estirilpiridina (MR31363)**

20 <sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): δ 9,08 (d, 1H, J= 1,7 Hz), 8,65 (d, 1H, J= 1,7 Hz), 8,58 (d, 1H, J= 1,7 Hz), 7,98 (d, 1H, J= 1,6 Hz), 7,86 (d, 1H, J=1,5 Hz), 7,76 (bs, 1H), 7,55 (d, 2H, J=7,8 Hz), 7,45 (d, 1H, CH=CH, J=16,4 Hz), 7,40-7,36 (m, 2H), 7,31-7,27 (m, 1H), 7,22 (d, 1H, CH=CH, J =16,4 Hz), 7,02 (d, 1H, J =2,16), 6,86 (m, 1H), 6,53 (bs, 1H), 2,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  
MS(EI): 405,60 [M+]\*.

**Ejemplo 6: 5-(2-cloro-1-metil-1H-imidazol-5-il)-2-(6-(2-cloro-1-metil-1H-imidazol-5-il)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR31351)**

25 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,82 (d, 1H , J=2,2 Hz), 8,66 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,04 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,99 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,39 (d, 2H, J=7,3 Hz), 7,32-7,25 (m, 3H), 7,18 (s, 1H), 7,14 (d, 1H, J=16 Hz), 7,12 (s, 1H), 7,10 (d, 1H, J=16 Hz), 3,69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 501,13 [M+]\*, 503,12 [M++2]\*, 505,32 [M++4]\*.

**Ejemplo 7: 3-metil-2-(4-cianofenil)-5-(5-(4-cianofenil)-3-estirilpiridin-2-il)piridina (MR30854)**

30 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,88 (d, J=2,2, 1H, H2'), 8,85 (d, J=2,2, 1H, H6), 8,24 (d, J=2,2, 1H, H4), 8,04 (d, J=2,2, 1H, H4'), 7,79 (dd, J=8,3, 1,9, 4H), 7,74 (dd, J=8,5, 2,0, 4H), 7,45 (d, J=8,0, 2H, Hestir), 7,35 (d, J=8,1, 2H, Hestir), 7,31 (d, J=7,3, 1H, Hestir), 7,17 (d, J=16,3, 2H, CH=CH), 2,49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 8: 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(6-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30847)**

35 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,83 (s, 1H, H6), 8,80 (s, 1H, H2'), 8,16 (s, 1H, H4), 7,99 (s, 1H, H4'), 7,49 (d, J=7,1, 2H, Hestir), 7,35 (dd, J=7,6, 6,8, 2H, Hestir), 7,31 (d, J=7,3, 1H, Hestir), 7,28 (d, J=15,6, 1H, CH=CH), 7,21 (d, J=15,6, 1H, CH=CH), 6,86 (s, 2H), 6,84 (s, 2H), 3,99 (s, 6H, CH<sub>3</sub>O-meta), 3,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-para), 3,91 (s, 6H, CH<sub>3</sub>O-meta), 3,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-para), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 9: 2-(3,4-dimetoxifenil)-5-(5-(3,4-dimetoxifenil)-3-estirilpiridin-2-il)-3-metilpiridina (MR30846)**

40 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,84 (s, 1H, H6), 8,80 (s, 1H, H2'), 8,17 (s, 1H, H4), 7,98 (s, 1H, H4'), 7,48 (d, J=6,8, 2H, Hestir), 7,36 (dd, J=7,8, 7,1, 2H, Hestir), 7,30 (d, J=8,3, 1H, Hestir), 7,28 (d, J=16,4, 1H, CH=CH), 7,27-7,21 (m, 4H), 7,18 (d, J=15,9, 1H, CH=CH), 7,04 (d, J=8,3, 1H), 6,98 (d, J=8,3, 1H), 4,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-meta), 3,97 (s, 9H), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 10: 4-(3-metil-5-(5-(piridin-4-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)piridina (MR31350)**

45 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,85 (d, 1H , J=2,2 Hz), 8,80 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,73-8,71 (dd, 2H, J=1,7 Hz, J =4,5 Hz), 8,70-8,68 (dd, 2H, J=1,7 Hz, J=4,5 Hz), 8,21 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,97 (d, 1H, J=1,9 Hz), 7,58-7,57 (dd, 2H, J=1,7 Hz, J =4,5 Hz), 7,48-7,47 (dd, 2H, J=1,7 Hz, J =4,5 Hz), 7,41 (d, 2H, J=6,8 Hz), 7,32-7,29 (m, 2H), 7,26-7,25 (m, 1H), 7,23- 7,16 (m, 2H, CH=CH), 2,43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS (EI): 427,37 [M+]\*

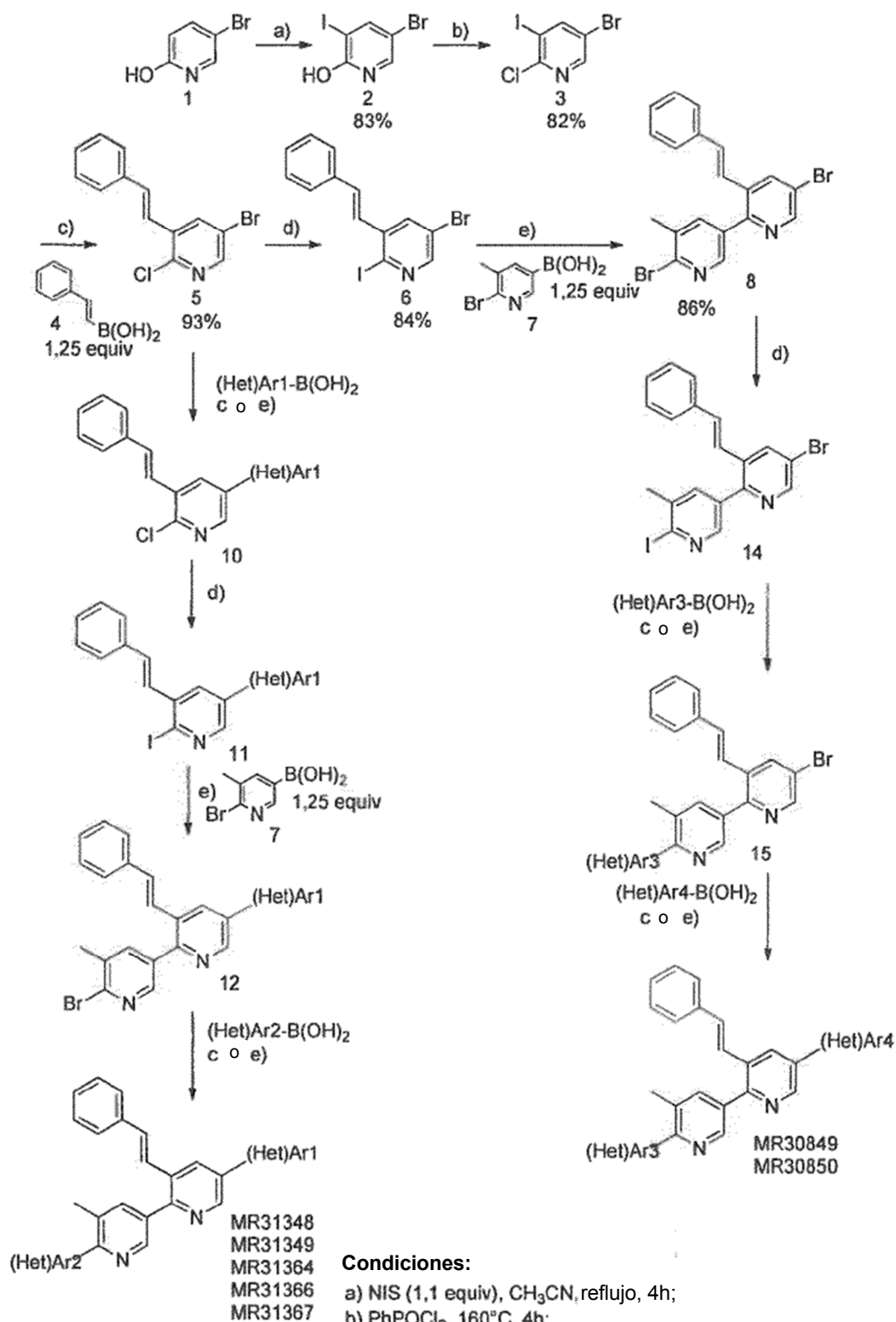
**Ejemplo 11: 3-metil-2-fenil-5-(5-fenil-3-estirilpiridin-2-il)piridina (MR30814)**

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158,4, 153,1, 146,9, 146,2, 140,3, 139,7, 137,5, 136,8, 135,9, 133,3, 132,5 (2C), 131,7, 130,6, 129,3 (2C), 129,2 (2C), 128,8 (2C), 128,3 (2C), 128,2 (2C), 128,1, 127,2 (2C), 126,8 (2C), 125,4, 20,1, LCMS (ESI) (m/z) : 424,55; [M+H<sup>+</sup>] 425,27.

**Ejemplo 12: 5-(3-metil)-5-(5-(pirimidin-5-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)pirimidina (MR31361)**

- 5 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 9,33 (s, 1H), 9,30 (s, 1H), 9,10 (s, 2H), 9,07 (s, 2H), 8,90 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,88 (d, 1H J=2,2 Hz), 8,25 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,07 (d, 1H, J=1,9 Hz), 7,48 (d, 2H, J= 7 Hz), 7,40- 7,32 (m, 3H), 7,27 (d, 1H, J=16 Hz, CH=CH), 7,22 (d, 1H, J=16 Hz, CH=CH), 2,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). MS(EI): 429,58 [M<sup>+</sup>].

10 Se aplicaron un segundo y un tercer procedimiento (Esquema 2) a los compuestos 3-metil-5-(5-fenil-3-estirilpiridin-2-il)-2-(piridin-3-il)piridina (MR31348), 3-(6-(5-metil-6-fenilpiridin-3-il)-5-estirilpiridin-3-il)piridina (MR31349), 3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)fenol (MR31364), 3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)fenol (MR31366), (1Z)-N'-hidroxi-2-(3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridin-2-il)fenil)acetamidina (MR31367), 5-(3,4-dimetoxifenil)-2-(6-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30849), 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(6-(3,4-dimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30850).



Esquema 2

**Ejemplo 13: 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(6-(3,4-dimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30850)**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,83 (d, J=2,2, 1H, H<sub>6</sub>), 8,80 (d, J=2,2, 1H, H<sub>2</sub>'), 8,16 (d, J=2,4, 1H, H<sub>4</sub>), 7,98 (d, J=1,7, 1H, H<sub>4</sub>'), 7,49 (d, J= 7,1, 2H, H<sub>a</sub>), 7,36 (dd, J=7,6, 7,1, 2H, H<sub>b</sub>), 7,30 (d, J=6,8, 1H, H<sub>c</sub>), 7,21 (d, J=17,8, 1H, CH=CH), 7,20 (d, J=17,8, 1H, CH=CH), 7,20 (d, J=8,3, 1H), 7,19 (d, J=8,0, 1H), 6,98 (d, J=8,3, 1H), 6,86 (s, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 14: 5-(3,4-dimetoxifenil)-2-(6-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-metilpiridin-3-il)-3-estirilpiridina (MR30849)**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,84 (d, J=2,2, 1H, H<sub>6</sub>), 8,79 (d, J=2,2, 1H, H<sub>2</sub>'), 8,17 (d, J=2,2, 1H, H<sub>4</sub>), 7,99 (d, J=2,0, 1H, H<sub>4</sub>'), 7,48 (d, J=7,3, 2H, H<sub>estir</sub>), 7,35 (dd, J=7,8, 6,8, 2H, H<sub>estir</sub>), 7,30 (d, J=7,1, 1H, H<sub>estir</sub>), 7,27 (d, J=2,2, 1H), 7,27 (d, J=16, 1H, CH=CH), 7,23 (d, J=16,2, 1H, CH=CH), 7,19 (d, J=2,2, 1H), 6,84 (s, 3H), 4,01 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,93 (s, 6H), 3,91 (s, 3H), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 15: (1Z)-N'-hidroxi-2-(3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il-3-estirilpiridin-2-ilpiridin-2-il)fenil-acetamidina (MR31367)**

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,98 (d, 1H, J= 1,96 Hz), 8,87 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,82 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,72 (d, 1H, J=1,96 Hz), 8,24 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,02-8,00 (m, 2H), 7,55-7,43 (m, 7H), 7,36-7,20 (m, 4H), 4,58 (bs, 1H, NH<sub>2</sub>), 3,56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 498,55 [M]<sup>+</sup>

**Ejemplo 16: 3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il-3-estirilpiridin-2-ilpiridin-2-il)fenol (MR31366)**

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 10,5 (bs, 1H, COOH), 9,02 (d, 1H, J= 1,96 Hz), 8,90 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,68 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,66-8,64 (dd, 1H, J=1,2 Hz, J= 4,6 Hz), 8,56 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,33-8,31 (dd, 1H, J=1,3 Hz, J= 4,6 Hz), 8,07 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,63-7,62 (m, 1H), 7,53-7,48 (m, 5H), 7,37-7,33 (m, 2H), 7,29-7,21 (m, 2H), 3,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 484,54 [M]<sup>+</sup>

**Ejemplo 17: 3-(3-metil-5-(5-(piridin-3-il-3-estirilpiridin-2-ilpiridin-2-il)fenol (MR31364)**

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,98 (d, 1H, J= 1,96 Hz), 8,86 (d, 1H, J= 1,96 Hz), 8,78 (d, 1H, J= 1,96 Hz), 8,72-8,71 (m, 1H), 8,26 (d, 1H, J= 2,2 Hz), 8,03-7,99 (m, 3H), 7,51-7,46 (m, 3H), 7,35-7,32 (m, 2H), 7,31-7,20 (m, 4H), 7,07 (d, 1H, J= 7,56 Hz), 6,93 (s, 1H), 6-84-6,81 (dd, 1H, J= 1,6 Hz, J= 7,56 Hz), 2,45 (s, CH<sub>3</sub>), 1,77 (bs, 1H, OH).

MS(EI): 442,41 [M]<sup>+</sup>

**Ejemplo 18: 3-(6-(5-metil-6-fenilpiridin-3-il-5-estirilpiridin-3-il)piridina (MR31349)**

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,79 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,75 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,64-8,62 (dd, 1H, J=1,2 Hz, J=4,7 Hz), 8,15 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,94-7,91 (m, 2H), 7,55 (d, 2H, J=7 Hz), 7,44-7,33 (m, 6H), 7,29-7,26 (m, 2H), 7,23-7,19 (m, 2H), 7,14 (d, 1H, J=16 Hz, CH=CH), 2,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 426,42 [M]<sup>+</sup>

**Ejemplo 19: 3-metil-5-(5-fenil-3-estirilpiridin-2-il-2-(piridin-3-il)piridina (MR31348)**

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,88 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,86 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,68-8,67 (dd, 1H, J=1,7 Hz, J=4,8 Hz), 8,24 (d, 1H, J=1,9 Hz), 8,03 (d, 1H, J=1,7 Hz), 7,98-7,97 (m, 1H), 7,72 (d, 2H, J=8,3 Hz), 7,57-7,53 (m, 2H), 7,49-7,46 (m, 4H), 7,38-7,34 (m, 2H), 7,31-7,29 (m, 1H), 7,27 (d, 1H, J=16,6 Hz), 7,22 (d, 1H, J= 16,6 Hz), 2,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

MS(EI): 426,58 [M]<sup>+</sup>

**II. Actividad biológica de los compuestos de fórmula (I)****II. A. Materiales y Métodos***Compuestos ensayados*

Se sintetizan los oligosistemas (het)aromáticos como se describe en el Ejemplo I y se purifican por cromatografía (columna que utiliza gel de sílice flash 60 Merck [0,063-0,200 mm] como fase estacionaria).

ABT-737 se obtuvo de Selleckchem (Houston, TX, USA) y dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia).

Estos compuestos se guardaron comúnmente con soluciones stock en DMSO a -20°C.

*Cultivo de células*

La línea de células de carcinoma ovárico humano OAW42 se estableció a partir de un adenocarcinoma humano y se obtuvo de ECACC (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia). Se cultivó en medio DMEM suplementado con 4500 mg/l glucosa, 2 mM Glutamax, 1 mM piruvato de sodio, 10% suero de ternero fetal, 33mM bicarbonato de sodio (Gibco BRL, Lyon, Francia) y 20 UI/l insulina humana recombinante (Lilly, Suresnes, Francia).

La línea de células de carcinoma ovárico humano SKOV3 se estableció a partir de un adenocarcinoma ovárico humano y se obtuvo de American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), así como la línea de células de mesotelioma maligno humano NCI-H28 y la línea de células de carcinoma de pulmón humano A549.

La línea de células IGROV1 fue proporcionada amablemente por el Dr. J. Bénard (Institut G. Roussy, Villejuif, Francia). Estas líneas de células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM Glutamax<sup>TM</sup>, 25 mM HEPES, 10% suero de ternero fetal, y 33 mM bicarbonato de sodio (Fisher Scientific, Illkirch, Francia).

Se obtuvieron previamente el modelo quimiorresistente *in vitro* de las líneas de células IGROV1 (IGROV1-R10) y OVW42 (OAW42-R) por mimetización de un protocolo clínico de administración de cisplatino [Poulain et al. (1998) Int J Cancer 78, 454-463; Villedieu et al., (2007) Gynecol Oncol. 105(1), 31-44].

Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> humidificada y se dividieron dos veces por semana por tripsinización.

*Tratamientos*

Se transfectaron por siRNA células en crecimiento exponencial como se describe más adelante, y después de 48 horas se expusieron continuamente las células a oligosistemas (het)aromáticos (10, 25 ó 50 µM) disueltos en DMSO (<0,1 % del volumen total) durante 4 a 24 horas suplementarias.

*Silenciación de genes*

Los siRNAs fueron sintetizados y reasociados por Eurogentec (Lieja, Bélgica). Las secuencias eran como sigue:

Bcl-x<sub>L</sub> siRNA antisentido (siXL1): 5'-auuggugagucggaucgatt-3' (SEQ. ID. N°1);

Mcl-1 siRNA (siMCL1): 5'-gugccuuuguggcuaaacatt-3' (SEQ. ID. N°2);

siRNA de control (siCONT): 5'-gacguaaacggccacaagutt-3' (SEQ. ID. N°3).

El siRNA de control no guarda homología alguna con ningún gen humano relevante. Las células se sembraron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> el día antes para alcanzar 30-50% de confluencia en el momento de la transfección. Se añadió el reactivo de transfección INTERFERin<sup>TM</sup> (Polyplus Transfection, Estrasburgo, Francia) a siRNA diluido en medio de suero reducido Opti-MEM® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) y se dejó que tuviera lugar la formación de complejos durante 15 minutos a la temperatura ambiente antes de aplicarse a las células. La concentración final de siRNA en los matraces era 20 nM.

*Ensayo BRET*

Se sembraron células HeLa en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 200 ng/pocillo de plásmido pRLuc-Bax, pRLuc-Puma o pRLuc-Noxa que codificaban donantes BRET y 1µg/pocillo de peYFP-Bcl-x<sub>L</sub> o peYFP-Mcl-1 que codificaban aceptores BRET (o con pCMV-Bcl-x<sub>L</sub> o pCMV-Mcl-1 para control). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se tripsinizaron y se sembraron de nuevo en placas blancas de 96 pocillos con fondo plano, se incubaron durante un día más, y se trataron luego con los fármacos durante 16 horas a 10 µM. La emisión de luz a 485 nm y 530 nm se midió consecutivamente utilizando el detector de fluorescencia-luminiscencia Mithras LB 940 (Berthold) después de añadir el sustrato luciferasa, coelenterazina H (Uptima) a una concentración final de 5 µM. Los ratios BRET se calcularon como se ha descrito [Terrillon et al. (2003) Mol Endocrinol 17, 677-691, Vo et al. (2012) Eur J Med Chem, 286-93].

*Ensayo de actividad celular en tiempo real*

La citotoxicidad mediada por los compuestos se monitorizó utilizando el Instrumento Real-Time Cell Analyzer Multiplate (RTCA MP), xCELLigence System (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Este sistema monitoriza los eventos celulares en tiempo real midiendo la impedancia eléctrica a través de micro-electrodos interdigitados integrados en el fondo de placas de cultivo de tejidos E View (Roche). El aumento en el número y tamaño de las células fijadas a los sensores de los electrodos conduce a un aumento de impedancia, del cual se derivan los valores de Índice de Células (CI) visualizados en el gráfico. Así, este índice refleja los cambios en viabilidad celular como han sido descritos por Ke et al. (2011, Methods Mol Biol 740, 33-43). Resumidamente, se sembraron placas E de 96 pocillos con 3x10<sup>3</sup> células/pocillo y se pusieron sobre el RTCA MP localizado en una incubadora de cultivo de tejidos, donde se dejaron crecer las células durante 24h antes del tratamiento. La impedancia se midió continuamente hasta el final del tratamiento. Las desviaciones estándar de réplicas de los pocillos se analizaron con el Software RTCA.

*Ensayos de apoptosis**Caracterización morfológica de las células apoptóticas por tinción nuclear con DAPI*

Después del tratamiento, tanto las células desprendidas como las adherentes se agruparon después de tripsinización, se aplicaron a un portaobjetos de vidrio recubierto de polilisina por citocentrifugación y se fijaron con una solución de etanol/cloroformo/ácido acético (6:3:1). Las preparaciones se incubaron luego durante 15 minutos a la temperatura ambiente con 1 µg/ml de solución DAPI (Boehringer Mannheim-Roche, Mannheim, Alemania), se lavaron en agua destilada, se montaron bajo un cubreobjetos en Mowiol (Calbiochem) y se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia (BX51, Olympus, Rungis, Francia).

*Análisis del ciclo celular por citometría de flujo*

Las células adherentes y las flotantes se agruparon, se lavaron con IX PBS y se centrifugaron a 200g durante 5 minutos antes de tinción con Anexina V, yoduro de propidio o ambos, conforme a la recomendación del fabricante (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Resumidamente, se añadieron 100µl de Anexina V - FITC o yoduro de propidio, o ambos, sobre el pélet de células (10<sup>6</sup> células) y se incubaron 15 minutos a la temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron luego 500 µl de tampón de muestra a las suspensiones, que se analizaron después de ello utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Roissy, Francia), determinándose la distribución del ciclo celular utilizando el software de adquisición Kaluza (Beckman Coulter).

*Preparación de los extractos de células y análisis de transferencia Western*

Las células se lavaron con PBS enfriada en hielo, se suspendieron en un tampón de lisis [RIPA: NaCl 150 mM, Tris (pH 8) 50 mM, Triton X100 1%, PMSF 4 mM, EDTA 5 mM, NaF 10 mM, NaPPi 10 mM, Na3OV4 1 mM, aprotinina 0,5 µl/ml y 4,6 mL de agua ultra-pura] y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Los lisados se recogieron después de centrifugación (13200 g, 10 min, 4°C) y las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, USA). Se separaron 20 µg de proteínas por SDS-PAGE sobre un gel de poliacrilamida con un gradiente de 4-12% (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) y se transfirieron a membranas Hybond-PVDF (Amersham, Orsay, Francia). Después de bloqueo de los sitios de fijación inespecífica durante 1 hora a temperatura ambiente por leche seca desnatada al 5 % (p/v) en TBS con 0,1% (v/v) Tween 20 (T-TBS), las membranas se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de conejo siguiente: PARP, caspasa-3 y Bcl-x<sub>L</sub>, Bim (Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia), Mcl-1 (Santa Cruz, Le Perray-en-Yvelines, Francia), HSP-70, Noxa (Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, Francia), (Cell Signalling) y Actina (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia). Las membranas se lavaron luego con T-TBS y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios apropiados anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Amersham, Orsay, Francia). El revelado se realizó utilizando un Analizador de Imagen luminiscente (GE Healthcare, Orsay, Francia).

*Microscopía electrónica de transmisión*

Las células se fijaron con aldehído glutárico al 2,5% en tampón PBS, se incluyeron en agar, se enjuagaron en tampón de Sorensen, se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% en tampón de Sorensen, se deshidrataron en etanol y se embebieron en resina EPON. Se cortaron secciones ultradelgadas, y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011.

## II. B. RESULTADOS

## II. B. 1. Actividad de Pyridoclax (MR29072)

*Pyridoclax destruye la interacción Mcl-1/Puma*

Como se presenta en las Figuras 1A y 1B, Pyridoclax es capaz de destruir ambas interacciones Mcl-1/Puma y Mcl-1/Noxa en un ensayo celular (BRET) realizado células HeLa. Mientras que ABT-737 no es capaz de modificar esta interacción, Pyridoclax inducía una inhibición drástica de la interacción Mcl-1/Puma (aproximadamente 50%).

*Efecto de Pyridoclax como agente único o asociado a la inhibición de Bcl-x<sub>L</sub> mediada por siRNA*

Para demostrar el interés de Pyridoclax como inhibidor de Mcl-1, se ha utilizado un modelo de adicción selectiva tanto a Bcl-x<sub>L</sub> como a Mcl-1 en el cual la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> es silenciada por interferencia de RNA 48 horas antes de la exposición. Se elige la línea de células de carcinoma ovárico IGROV1-R10 para realizar estos ensayos, dado que se ha demostrado previamente que esta línea de células era muy sensible a la inhibición concomitante de Bcl-x<sub>L</sub> y Mcl-1 (Brotin et al. (2010) Int J Cancer 126, 885-895), pero seguía siendo viable cuando se inhibía una sola de estas dianas.

Como era de esperar, ni Pyridoclax ni el siRNA direccionado a Bcl-x<sub>L</sub> (siXL1) inducían muerte masiva de las células por sí solos. Se observa una proliferación ralentizada, pero no se observaron desprendimiento de células, ni pico sub-G1 fuerte, activación de la caspasa 3, y núcleos condensados o fragmentados (**Figuras 2A, B, C**) en estas condiciones.

En contraste, su asociación conducía a una muerte de células masiva, como se demostraba por un fuerte desprendimiento celular, por la aparición de un pico sub-G1 fuerte en el histograma de contenido de DNA (más de 50%) y de una fracción de 60% de células positivas a anexina V (**Figura 2A**). Además, la evaluación de viabilidad indicaba que esta asociación conducía a una disminución drástica del número de células viables y a un aumento concomitante de células muertas (**Figura 2B**) y la transferencia Western mostraba una escisión completa de PARP y caspasa 3. La tinción DAPI y la microscopía electrónica indicaban que esta asociación conducía a condensaciones y fragmentaciones nucleares (únicamente cuando se combinaban los dos agentes), lo que era fuertemente evocativo de muerte celular apoptótica (**Figura 2D**).

Estos efectos son óptimos después de exposición a una concentración 25  $\mu\text{M}$  de Pyridoclax, pero se observan también en una proporción menor en respuesta a 10  $\mu\text{M}$  (datos no presentados).

El estudio cinético del efecto de esta combinación mostró que se observaba apoptosis tan pronto como 2 a 4 horas después del comienzo de la exposición (37% de los eventos en la fracción sub-G1 después de 4 horas), siendo esta observación compatible con una inhibición farmacológica de Mcl-1 por actividad mimética de  $\text{BH}_3$  (**Figura 2E**).

En conjunto, estos elementos indican que Pyridoclax sensibiliza fuertemente las células IGROV1-R10 quimiorresistentes del cáncer ovárico para siRNA direccionado a Bcl-x<sub>L</sub>, conduciendo su combinación a apoptosis masiva.

*Pyridoclax sensibiliza diversos tipos de células de cáncer para siRNA direccionado a Bcl-x<sub>L</sub>*

El efecto de la combinación de Pyridoclax con siXL1 en otras líneas de células de carcinoma ovárico (Figura 3 A) así como en otros tipos de células de cáncer (Figura 3 B) ha sido estudiado después.

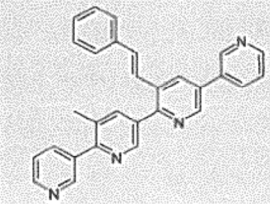
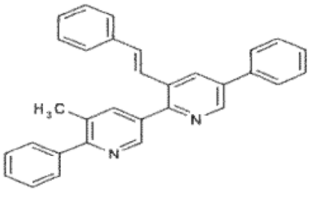
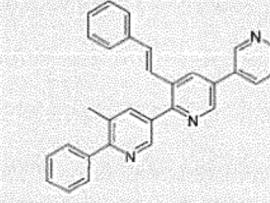
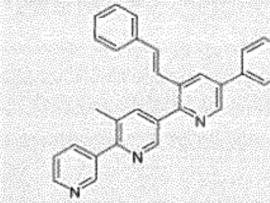
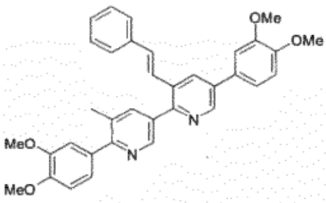
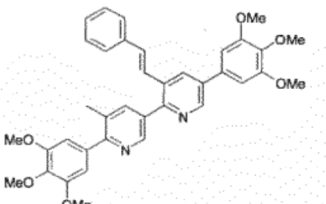
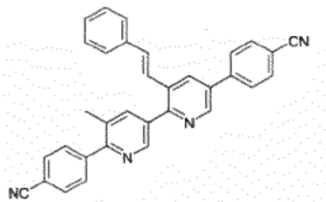
Una respuesta similar a esta asociación se observa en todas las líneas de células de carcinoma ovárico, así como en líneas de células de carcinoma de pulmón (A 549) y mesotelioma (NCI-H28 y MSTO-211H).

*Pyridoclax sensibiliza las células quimiorresistentes de cáncer ovárico para ABT-737*

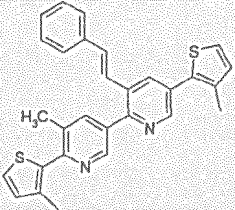
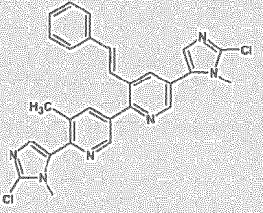
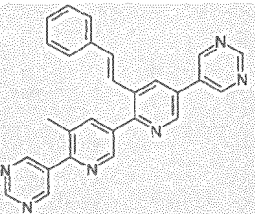
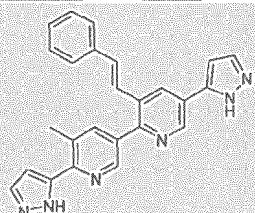
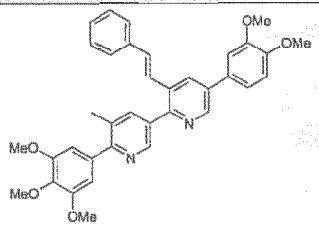
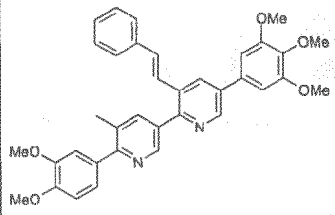
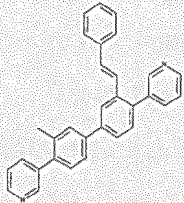
Al ser todavía ABT-737 una de las moléculas  $\text{BH}_3$ -miméticas inhibitoras de Bcl-x<sub>L</sub> más potentes, y estando condicionada la respuesta a las células de cáncer ovárico por la inhibición de Mcl-1, se ha evaluado el efecto de la combinación de ABT-737 con Pyridoclax (**Figura 4**). Como se ha descrito anteriormente con siXL1, se observa que ni ABT-737 ni Pyridoclax inducían la muerte celular como agentes únicos, mientras que su combinación conducía a muerte celular apoptótica masiva en ambas líneas de células quimiorresistentes de cáncer ovárico IGROV1-R10 y SKOV3. De hecho, cuando se combinaban las dos moléculas, la actividad celular disminuía drásticamente en ambas líneas de células como se evaluó por impedancimetría (tecnología xCELLigence) (**Figuras 4A y 4D**); adicionalmente, se observó un desprendimiento fuerte de células y una fracción sub-G1 importante (**Figura 4 B**) así como escisiones completas de PARP y caspasa 3 (**Figura 4 C y 4 D, panel derecho**). Debería observarse que estos efectos eran similares en experimentos de exposición concomitantes y en exposición secuencial (Pyridoclax 24 horas, luego ABT-737). Además, la apoptosis observada era cuasi-inmediata tan pronto como las células se exponen a Pyridoclax y ABT-737, lo cual es un argumento en favor de una actividad mimética de  $\text{BH}_3$ .

II. B. 2. Actividad de otros compuestos de la descripción

Compuestos seleccionados en cuanto a su capacidad para destruir la interacción Mcl-1/Puma en el ensayo BRET han sido ensayados posteriormente para evaluar su actividad sobre la morfología celular, sobre el ciclo celular, sobre la escisión de PARP y sobre la morfología nuclear; los resultados se presentan a continuación en la Tabla I.

Identificación de la molécula		Molécula + siRNA direccionado a Bcl-xL			
		Desprendimiento celular	Sub-G1 (%)	Escisión del PARP	Características de apoptosis nuclear
29072 or Pyridoclox		+++	53.6	+++	+++
30814		-	37.2	+	+
31349		++	59.2	+++	+++
31348		+++	58.8	+++	+++
30846		-	33.1	nd	+
30847		±	22	nd	+
30854		±	24.3	nd	+



31336		++	48.8	nd	++
31351		+++	56.7	nd	+++
31361		++	35.2	nd	++
31363		+++	63.7	nd	+++
30849		-	19.9	nd	+
30850		-	20.2	nd	+
30820		++	57.8	+	++

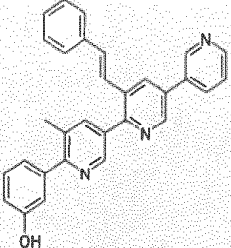
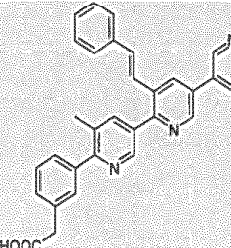
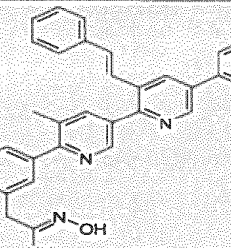
31364		++	39.6	nd	++
31366		+++	51	nd	++
31367		+++	52.7	nd	+++

Tabla I

Evaluación de los diferentes criterios:

Desprendimiento celular:

- 5    "-" significa que no hay diferencia alguna entre las células sin tratar y las tratadas con el compuesto de ensayo;  
 "±" significa que se desprendían del soporte muy pocas células (menos de 10%);  
 "+" significa que se desprendían del soporte aproximadamente el 20% de las células;  
 "++" significa que se desprendían del soporte aproximadamente la mitad de las células;  
 "+++" significa que se desprendían del soporte la mayoría de las células.

10    Escisión de PARP:

"+" significa que puede observarse en la transferencia Western una pequeña banda que corresponde a la forma de 85 kDa escindida de PARP. Esta banda está usualmente ausente o es débil cuando las células no se han tratado, siendo por tanto la única banda observable la banda de 110 kDa.

15    "++" significa que es claramente observable en la transferencia Western una banda que corresponde a la forma de 85 kDa escindida de PARP. Usualmente coexiste una banda no escindida (110kDa) con la banda escindida;

"+++" significa que PARP en escindido prácticamente por completo. La banda de 100 kDa ha desaparecido en muchos casos en beneficio de la forma de 85 kDa.

Características de apoptosis nuclear:

20    "+" significa que puede observarse un pequeño número de núcleos condensados o fragmentados después de la tinción con DAPI;

"++" significa que pueden observarse numerosos núcleos condensados o fragmentados después de la tinción con DAPI (20-50%);

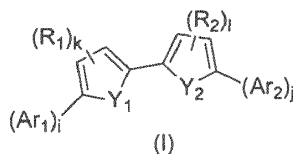
"+++" significa que la mayoría de los núcleos están condensados o fragmentados.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Centre Regional de Lutte contre le Cancer français Baclesse université de Caen Basse-Normandie institut de  
 5      cancérologie de L'Ouest Rene Gauducheau
- <120> Compuestos moduladores de MCL-1
- <130> SD/Isf-F1484 6 PCT
- 10     <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15     <211> 21
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 20     auuggugagu cggaucgcat t           21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- 25     <213> Homo sapiens
- <400> 2
- gugccuuugu ggcuaaacat t           21
- <210> 3
- 30     <211> 21
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 3
- 35     gacguaaacg gccacaagut t           21

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde:

5 Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> son -N=C-;

Ar<sub>1</sub>, Ar<sub>2</sub> se seleccionan cada uno independientemente de arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> o un heteroarilo de 5 a 7 miembros, estando dichos grupos arilo y heteroarilo sustituidos opcionalmente con uno a tres grupos R<sub>3</sub>, con la condición de que:

- Ar<sub>1</sub>, Ar<sub>2</sub> no pueden representar ambos idénticamente un 4-piridilo, un 2 ó 3-tiofenilo insustituido, o un 3,4-dimetoxifenilo o un 3,4,5-trimetoxifenilo,

10 i y j son 1;

y

R<sub>1</sub> se selecciona de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), arilcarbonilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alquilcarbonilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), C(=O)H, COOH, OH, estando dichos grupos alquilo sustituidos opcionalmente con OH;

15 R<sub>2</sub> se selecciona de aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>);

k es 0, 1;

l es 1;

20 R<sub>3</sub> se selecciona independientemente en cada caso de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, OH, C(=O)H, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H, (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CN, (CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>C(=N(OH))NH<sub>2</sub>, I, Cl, Br, F, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, y un heteroarilo de 5 a 7 miembros, aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), estando dichos grupos alquilo sustituidos opcionalmente con OH;

n es 0, 1, 2, 3;

p es 0, 1, 2, 3;

q es 0, 1, 2, 3;

con la exclusión del compuesto siguiente:

25 2-(piridin-3-il)-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridina

y sus sales farmacéuticamente aceptables, en mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde Ar<sub>1</sub> y/o Ar<sub>2</sub> se seleccionan de fenilo, piridilo, pirimidilo, imidazolilo, pirazolilo, tiofenilo, triazolilo.

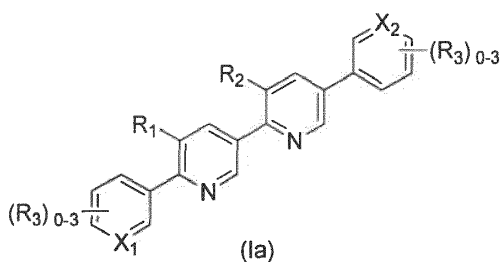
30 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde al menos uno de Ar<sub>1</sub>, Ar<sub>2</sub> es un heteroarilo de 5 a 7 miembros que contiene un átomo de nitrógeno.

4. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 2 ó 3 en donde Ar<sub>1</sub> es 3-piridilo o fenilo.

5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde Ar<sub>2</sub> es 3-piridilo o fenilo.

35 6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, aril(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)alqueno(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>).

7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se selecciona de los compuestos de fórmula (Ia):



en donde:

$X_1, X_2$ , se seleccionan independientemente en cada caso de C o N;

5  $R_1, R_2, R_3$  se seleccionan independientemente, en cada caso, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

**8.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de:

- 5,6'-di(piridin-3-il)-5'-metil-3-((E)-estiril)-2,3'-bipiridina
- 5,6"-di(piridin-3-il)-3,5"-bis-((E)-estiril)-[2,3';6',3"]terpiridina
- 10 - 2-(5-metil-6-(piridin-3-il)piridin-3-il)-5-fenil-3-estirilpiridina
- 2-(5-metil-6-fenilpiridin-3-il)-5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridina.

**9.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1 a 8, que comprende adicionalmente un inhibidor de Bcl-XL.

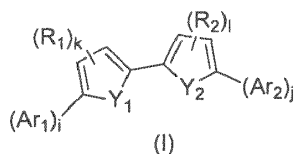
**10.** Una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en combinación con un inhibidor de Bcl-XL.

15 **11.** Un compuesto de fórmula (I) conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento del cáncer.

**12.** El compuesto de fórmula (I) para uso de la reivindicación 11, en donde el compuesto de fórmula (I) se administra junto con un inhibidor de Bcl-XL.

20 **13.** Un compuesto de fórmula (I) para uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en donde el uso es para inducir la apoptosis mediada por la proteína Mcl-1.

**14.** Un compuesto de fórmula (I):



en donde:

$Y_1, Y_2, Ar_1, Ar_2, R_1, R_2, i, j, k, l$  son como se define en la reivindicación 1,

25 con la exclusión del compuesto siguiente:

- 2-(piridin-3-il)-5-(5-(piridin-3-il)-3-estirilpiridin-2-il)piridina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

**15.** El compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 14, en donde  $R_1$  se selecciona de metilo y estirilo, y  $R_2$  es estirilo.

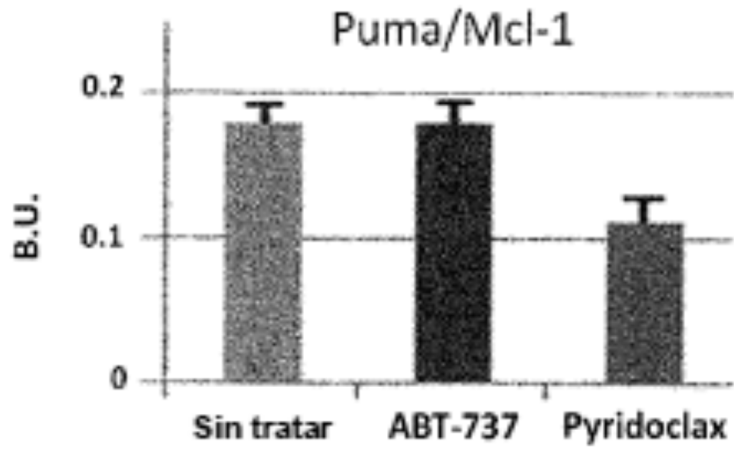


Figura 1A

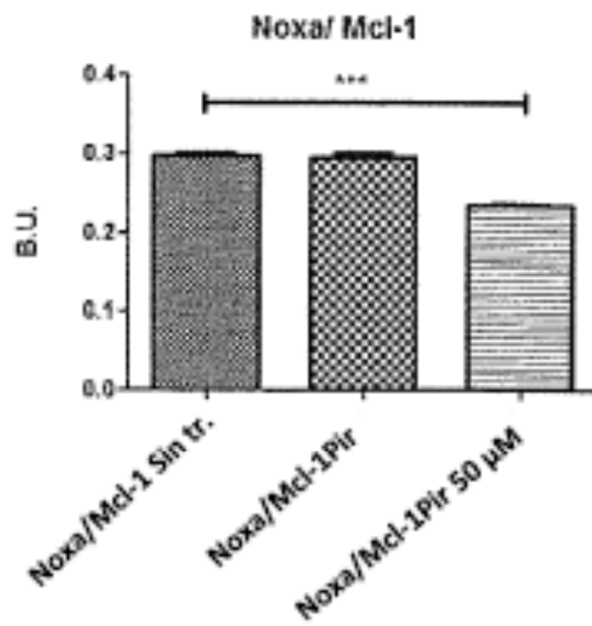


Figura 1B

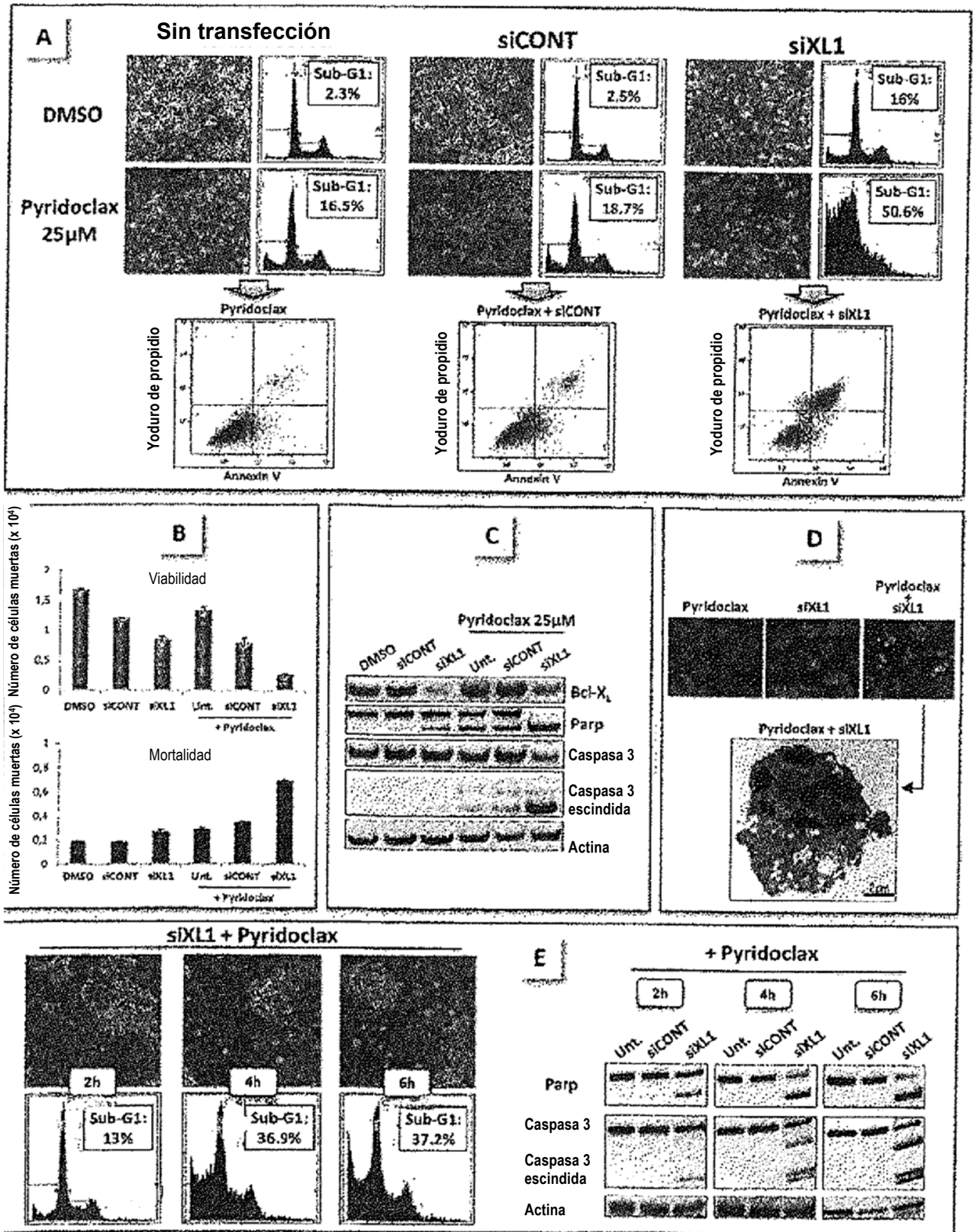


Figura 2

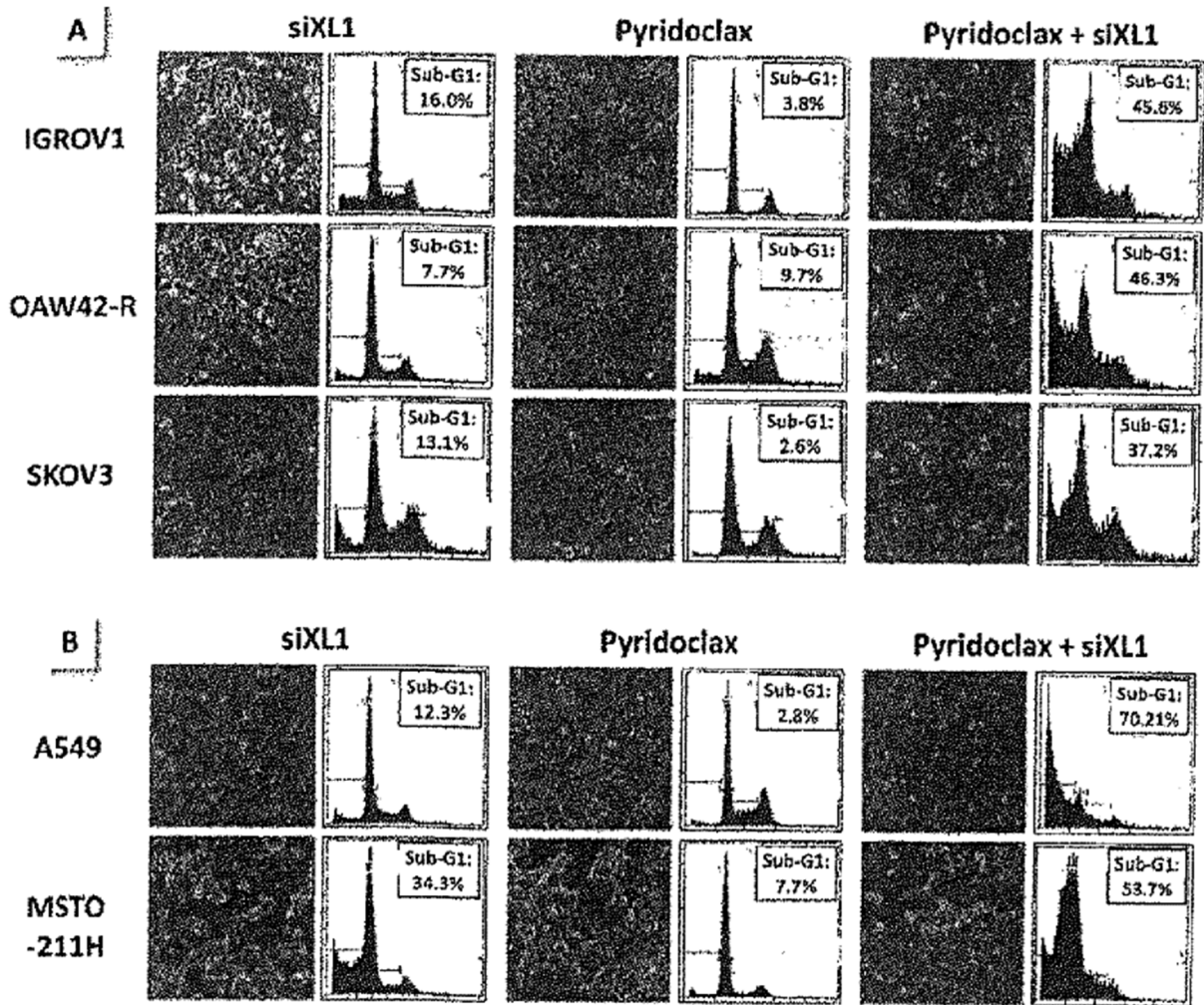


Figura 3



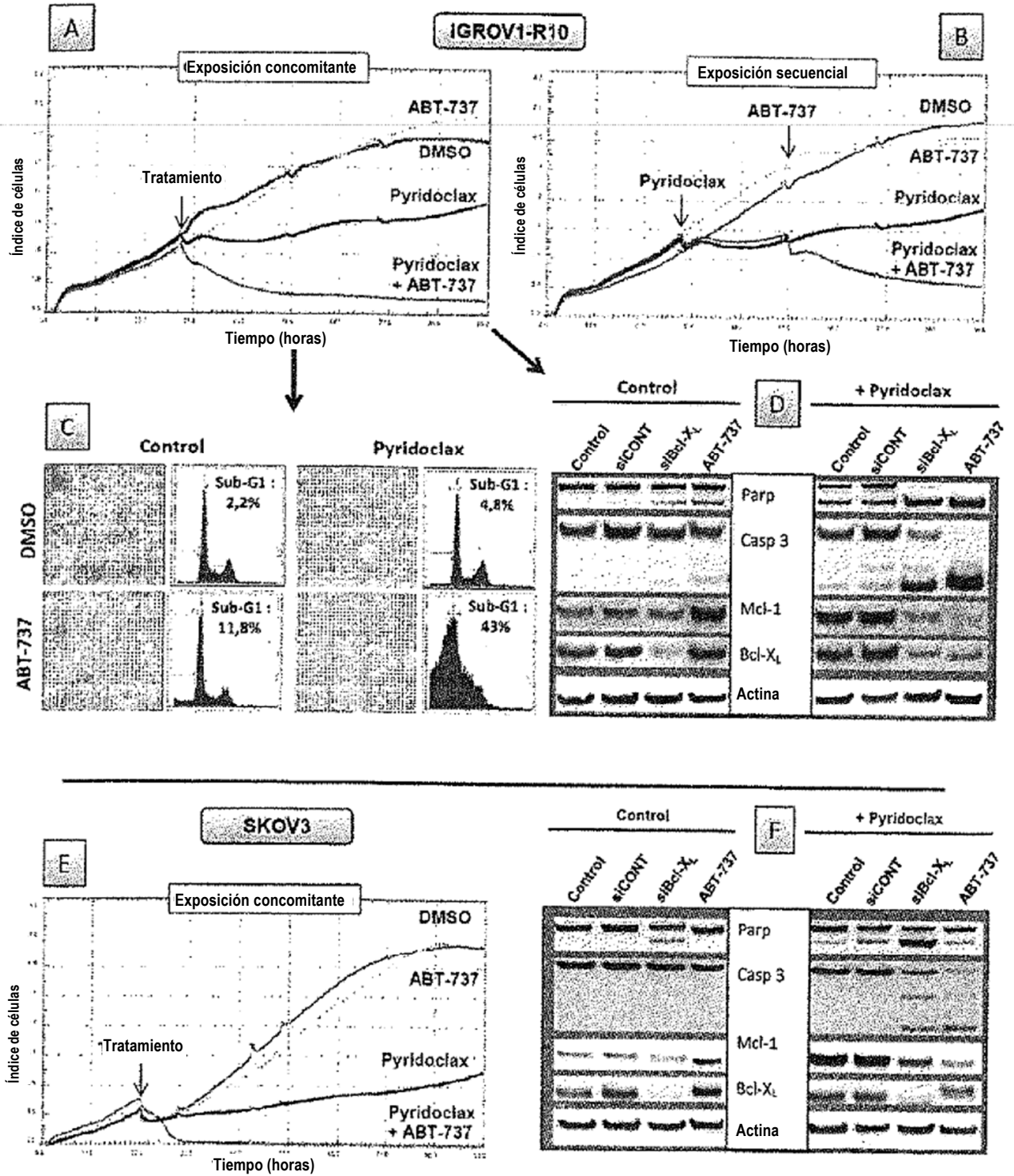


Figura 4