



No. 13-026618- -00008-0000

Fecha: 2014-05-22 16:40:03

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 523 RESPUESTA

Folios: 27 78

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

nder Agudelo
arlos A. Parra
ian F. Acosta
ndrés Rincón
nica Guevara
lrés Alvarado
C. Calderón
auricio Ávila
J. Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid
Alejandro Moure
Miguel F. Porras
Catalina Amaya
Laura M. Escobar
Lorena Andrade
Sergio Arboleda
Carolina Celis
Catalina Jiménez

Medellín
María C. Múnera
Eddie Manotas
Adrián Santamaría

Barranquilla
Gina De Echeona

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente N°. 13-026.618

Solicitud de Patente de Invención titulada: "PROMOTORES DE APOPTOSIS N-ACILSULFONAMIDAS."

Solicitante: ASTRAZENECA AB

Nuestra Ref: P2013/000020

RESPUESTA AL OFICIO No. 245, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 003

DE FECHA 21 DE ENERO DE 2014

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

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

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio radicado el 17 de abril de 2013.

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

- se eliminaron las antiguas Reivindicaciones 8-12;
- se agregó la nueva Reivindicación 5, que encuentra soporte como Ejemplo 3 en el Capítulo Descriptivo;
- se limitó el alcance de la Reivindicación 1 en cuanto a la definición del sustituyente R¹ es -OR^{1a};

2

- la Reivindicación 3 hace referencia al compuesto de las Reivindicaciones 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos;
- las Reivindicaciones 4-8 ahora hacen referencia a el compuesto de Fórmula (I) y no a un compuesto de Fórmula (I);

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

2. a- El Examinador argumenta que el Capítulo Reivindicatorio no es claro ni conciso por los siguientes motivos:

- las Reivindicaciones 1 y 2 mencionan alquilo C₁₋₄ y heterociclos de 5 o 6 miembros, el Examinador sugiere mencionar cuáles son específicamente estos grupos;
- los sustituyentes en la estructura de la Fórmula I de las Reivindicaciones 1 y 2 (R^{1a}, R⁴⁰, R^{40*}, R^{40a}, R^{5a}, R^a, R^m) los cuales están definidos de manera amplia mediante grupos funcionales tales como “OR^{1a}, NR^{1a}, OR^{40a}, N(R^{40a})₂, CH₂OR^{5a}, CH₂N(R^{5a})₂, OR^m, NR^m”, entre otros, a partir de los cuales se obtiene una cantidad amplia de posibles compuestos. El Examinador sugiere limitar de acuerdo a la siguiente tabla:

Sustituyente	Soportado en la descripción
R ¹	H, OH, CN,
R ²	NO ₂ , SO ₂ CF ₃
R ³ y R ⁴	CH ₃ , CH ₂ CH ₃ , CH ₂ CH ₂ OH, CH ₂ CH ₂ OPO(OH) ₂ ,
R ³ + R ⁴	Piperazin, 3 – fluoro – 2 – hidroxipropil piperazin, morfolin, 3 – (dietilamino)metil morfolin.

- la Reivindicación 3 no señala explícitamente la estereoquímica de cada uno de los carbonos quirales, ni características técnicas de los sustituyentes;
- las Reivindicaciones 9 a 12 no mencionan las condiciones de reacción para cada una de las reacciones.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención del Examinador sobre las drásticas limitaciones realizadas al Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal como se explican en el punto 1 del presente memorial. En particular, el alcance de la Reivindicación 1 fue limitado, de tal forma que R¹ es exclusivamente -OR^{1a}.

De otra parte, en cuanto al alcance de las definiciones de los demás sustituyentes mencionados por el Examinador, me permito respetuosamente llamar la atención sobre las disposiciones de la Guía para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad, en donde se establece que si una reivindicación comprende un número muy grande de alternativas, se

presentará un requerimiento al solicitante que sugiera restringir la solicitud a una razonable generalización de la materia que ha sido desarrollada o probada, **pero no se trata de requerir para que se restrinja sólo a los ejemplos**".¹

Asimismo, no puede olvidarse que un inventor está en su derecho de reclamar protección para la **totalidad de un concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste**, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad. Es decir, una reivindicación puede ser tan amplia como se requiera para así poder enmarcar la totalidad del concepto inventivo desarrollado y no solamente las modalidades preferidas o específicamente ejemplificadas en la solicitud. Asimismo, la posibilidad de obtener la invención en diversas modalidades es una práctica aceptada a nivel mundial en el ámbito de las patentes, ya que como el Examinador debe saberlo, una patente de invención **no se limita a una única modalidad**, si no que cubre un concepto inventivo global que abarca diferentes modalidades (diversas materializaciones de la invención) ligadas por un efecto técnico común que finalmente delimita el alcance de la invención.

En atención a lo anterior, y como ya lo mencioné, no existe requerimiento legal alguno que determine que la única materia susceptible de protección es la única que se encuentra ejemplificada, ya que lo fundamental es que el Capítulo Descriptivo proporcione la información necesaria para que la persona medianamente versada en la materia pueda reproducir la invención sin tener que acudir a experimentación adicional excesiva. Vale la pena recordarle a la Examinadora que la función de los ejemplos en el Capítulo Descriptivo es **estrictamente ilustrativa** y de ninguna manera puede considerarse como el único alcance reivindicable posible.

ii) En cuanto a la sugerencia del Examinador respecto a la definición y señalización de los centros estereogénicos y su estereoquímica en la molécula de la Reivindicación 3, para el carbono quiral de cuyos sustituyentes son 4-clorobifenilo, piperidina y R¹, me permito remitirlo a las definiciones de las Reivindicaciones 1 y 2 donde se muestra de forma clara e inequívoca que dicho grupo puede ser alcohol, éster o éter. En este orden de ideas, es perfectamente claro para la persona medianamente versada en la materia que este carbono corresponde a la configuración R. Por su parte, el carbono quiral cuyas sustituciones son una amina, etilamina y metil-feniltio, dicho carbono ya presenta todas sus sustituciones que permiten la definición de la configuración de éste, que en este caso es R. Por lo anterior, considero superada la objeción de claridad por parte del Examinador respecto a la Reivindicación 3.

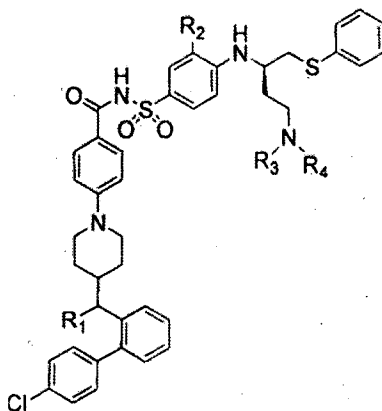
¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 3.3.4.1 (disponible en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

iii) Con respecto a la antigua Reivindicaciones 9 a 12, considero superada la objeción levantada, puesto que dichas reivindicaciones fueron eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

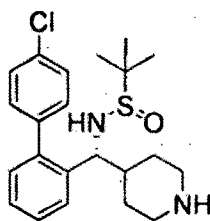
iv) Teniendo en cuenta lo anterior, considero superadas las anteriores objeciones, en tanto que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad establecidos en la Decisión 486, y a la luz del Manual Andino de Patentes (MAP) y el Instructivo de la SIC, de tal forma que le permite a cualquier persona medianamente versada en la materia determinar inequívocamente el alcance de la materia reclamada.

3. a- El Examinador señala que la presente invención no cumple con el requisito de Unidad de Invención en tanto identifica 3 Grupos inventivos diferentes, que no hacen parte de un concepto inventivo común, a saber:

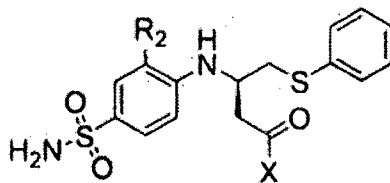
Grupo Inventivo 1: Compuestos de la fórmula I y su proceso de obtención, de acuerdo con las Reivindicaciones 1 a 10.



Grupo Inventivo 2: Proceso de obtención de los compuestos de fórmula (5-f), de acuerdo con la Reivindicación 11.



Grupo Inventivo 3: Proceso de obtención de los compuestos de fórmula M, de acuerdo con la Reivindicación 12.



El Examinador solicita que se presenten Solicitudes Divisionales para cada uno de los grupos o la limitación a un solo grupo inventivo.

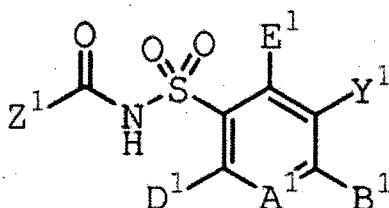
b- Considero superada la objeción de Unidad de Invención de la presente invención en tanto se eliminaron las Reivindicaciones 11 y 12, correspondientes a los Grupos Inventivos 2 y 3, de tal forma que la presente invención reclama única y exclusivamente Compuestos de la Fórmula I. Lo anterior está en concordancia con lo estipulado por el MAP, que establece que en solicitud de patente se puede reivindicar una sola invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí por un único concepto inventivo, en donde dicho concepto inventivo único que relaciona las invenciones debe ser técnico y cumplir por sí mismo los requisitos de novedad y nivel inventivo². Así las cosas, el presente Capítulo Reivindicatorio Modificado cumple con el requisito de Unidad de Invención en cuanto éste hace referencia exclusivamente a un compuesto de Fórmula (I).

4. a- El Examinador señala que los documentos WO2010/065865 (D1), WO2008/061208 (D2) y WO0224636 (D3) afectan el nivel inventivo de la Reivindicación 12.

b- En respuesta a lo anterior, me permito llamar la atención del Examinador sobre el hecho que los documentos D1-D3 fueron citados únicamente como arte previo que afectan el nivel inventivo del Grupo Inventivo 3 (Reivindicación 12). En vista que dicha Reivindicación fue completamente eliminada, considero superada cualquier objeción en relación con dichos documentos, de tal forma que ya no afectan la patentabilidad de la presente invención.

5. a- El Examinador argumenta que WO2005/049594 (D4) y WO2009/036035 (D5) afectan el nivel inventivo de las Reivindicaciones 1 a 10.

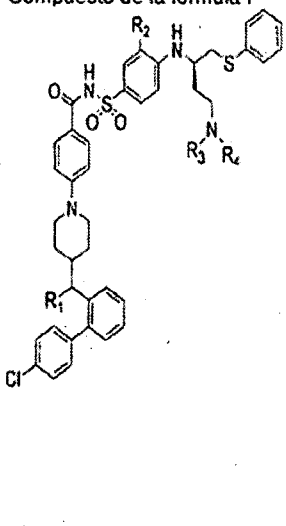
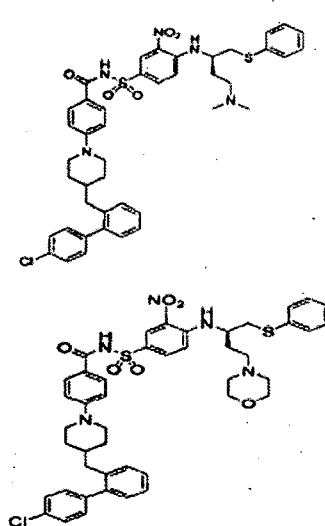
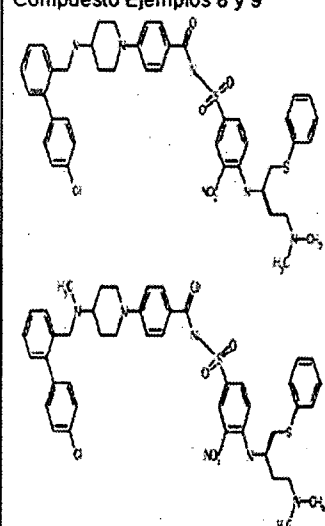
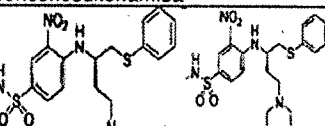
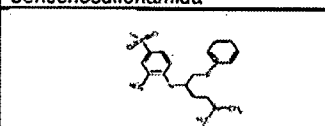
i) El Examinador señala que el documento D4 divulga compuestos derivados de *N*-acilsulfonamida, como inhibidores de Bcl-X_L, como inductores de apoptosis, para el tratamiento del cáncer.



Por su parte, el documento D5 divulga compuestos derivados de piperazinbenzamida, como inhibidores de Bcl-2, como inductores de apoptosis, para el tratamiento del cáncer.

² Manual Andino de patentes. WIPO, EPO, Secretaría de la Comunidad Andina, Sección 8.1. 2004.

El Examinador presenta una tabla comparativa entre las características esenciales de la presente invención y lo divulgado en D4 y D5, de la siguiente manera:

Solicitud	D4	D5
Compuesto de la fórmula I 		Compuesto Ejemplos 8 y 9 
R ¹ es CN, OR ^{1a} , N(R ^{1a}) ₂ (R ^{1a} es H o alquilo C ₁₋₄)	Grupo metilo no sustituido entre el 4'-cloro bifenil y el grupo piperidin - 4 - il	Grupo metilamino entre el 4'-cloro bifenil y el grupo piperidin - 4 - il
R ₂ es NO ₂	Grupo NO ₂ en posición 3 del bencenosulfonamida	Grupo NO ₂ en posición 3 del bencenosulfonamida
R ₃ y R ₄ son alquilo C ₁₋₄ o R ₃ y R ₄ conjuntamente forman un heterociclo de 6 miembros		

El Examinador argumenta que D4 es el Estado de la técnica más cercano a los compuestos de la presente invención en cuanto se divulgan compuestos derivados de 4-[1-(fenilsulfanil)metil-4-amino-3-butan]-4-aminobencenosulfonamida, como promotores de la apoptosis, para el tratamiento del cáncer (D4: Página 116, líneas 13-20). El Examinador señala que la diferencia entre los compuestos divulgados en D4 y los aquí reclamados es la presencia de un sustituyente R¹, en donde éste es -CN, -OH, -O-alquilo, -NH₂, -N-alquilo, mientras que en D4 no se menciona dicha sustitución en este carbono.

El Examinador argumenta que esta diferencia no concede ningún efecto técnico ventajoso sobre los compuestos, ya que los rangos de actividad sobre los receptores Bcl-X_L, determinados por su IC₅₀ son similares (compuestos de D4 y la presente invención se encuentran entre 1nM y 20nM). Así, el Examinador concluye que el sustituyente R¹ de la presente invención no es influyente ni provee características inesperadas sobre el arte previo, señalando la Tabla 1 y las páginas 49 y 50 de la presente invención, junto con las páginas 185-190 de D4.

Así, el Examinador plantea que el problema técnico es: ¿Cómo modificar los compuestos divulgados en D4 para obtener compuestos alternativos derivados de 4-[1-(fenilsulfanil)metil-

8
7

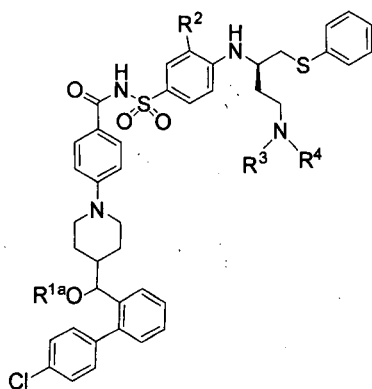
4-amino-3-butan]-4-aminobencenosulfonamida, como promotores de la apoptosis, para el tratamiento del cáncer?

Adicionalmente, el Examinador argumenta que D5 divulga en la Página 61, la Reivindicación 1, en la Página 65 y en los compuestos 8 y 9, la presencia del sustituyente R^{26} (R^1 de la presente invención) que puede ser alquilamino o alquilcarbonilo. En este orden de ideas, el Examinador concluye que la persona medianamente versada en la materia modificaría los compuestos divulgados en D4 y realizando sustituciones como sugerido en D5, pero con grupos alcoxilo, amino, entre otros, llegando a los compuestos reclamados en la presente invención, por lo que se considera obvia.

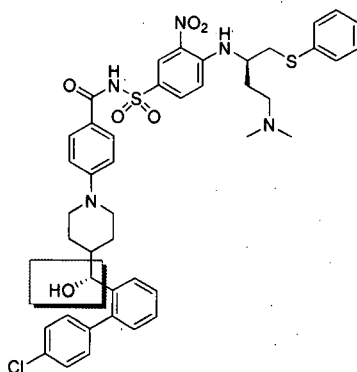
b- i) En primer lugar, me permito llamar la atención del Examinador sobre el hecho que el Examinador Internacional considera que las Reivindicaciones son novedosas, tal como se evidencia en el Informe Internacional Preliminar sobre Patentabilidad (Anexo 1). En este orden de ideas, me permito llamar la atención del Examinador sobre la drástica limitación realizada sobre el alcance del grupo R^1 , de tal forma ahora representa únicamente $-OR^{1a}$.

ii) Ahora bien, como fundamento para alegar falta de nivel inventivo, el Examinador sostiene que la diferencia entre los compuestos reivindicados y los de D4, es que los compuestos de la invención contienen un grupo R^1 (ahora $-OR^{1a}$) en el grupo metileno que se une al 4'-clorobifenilo y al grupo piperidin-4-il, mientras que en D4, este mismo grupo metileno no está sustituido. El Examinador entonces sostiene que esta diferencia no otorga ningún efecto técnico ventajoso o inesperado frente a los compuestos de la presente invención con respecto a D4. Un argumento similar se hace para D5. Así las cosas, a continuación me permito presentar información pertinente y relevante, la cual demuestra que los compuestos de la invención revisten nivel inventivo frente a D4 y D5.

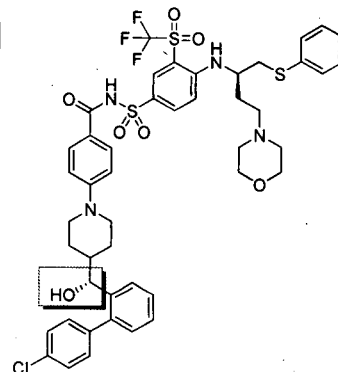
En particular, de acuerdo con el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, los compuestos reclamados son:



Reivindicación 1

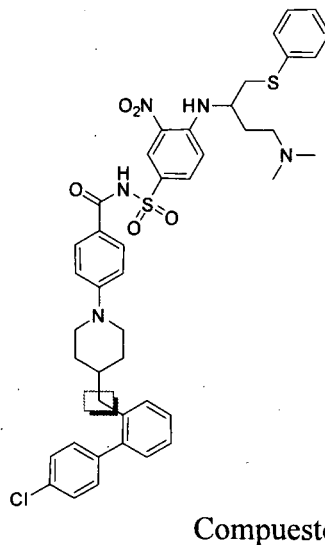
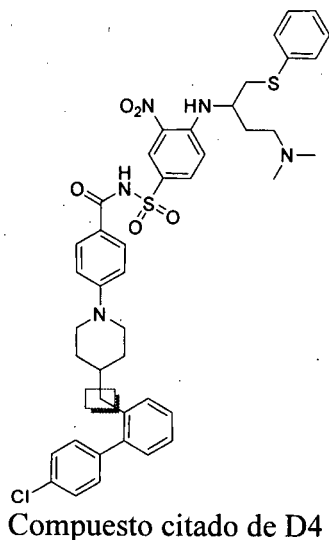


Ejemplo 2



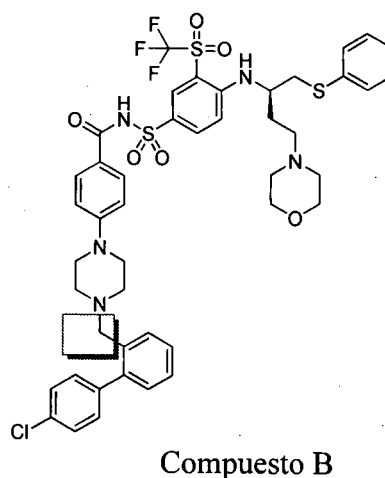
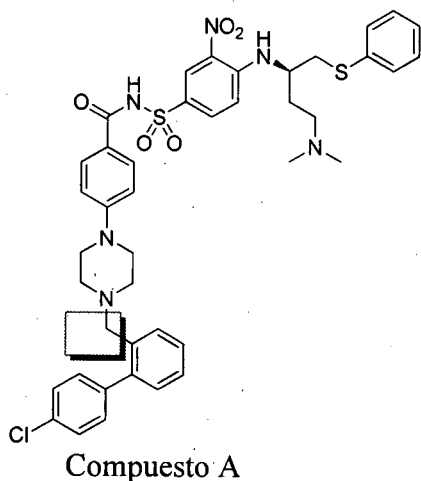
Ejemplo 15.

Por su parte, los compuestos citados por el Examinador corresponden a los siguientes:



Como se puede ver de los compuestos anteriores y sobre todo en el cuadro rojo, los compuestos de la Reivindicación 1 contienen un carbono con un sustituyente $-OR^{1a}$ que conecta el fragmento piperidinilo con el fragmento clorobifenilo de la molécula, mientras que D4 sencillamente las conecta mediante un simple grupo metileno. Asimismo, los compuestos de la Reivindicación 1 difieren de los compuestos citados de D5 en cuanto éstos no contienen un grupo $-OR^{1a}$.

A pesar de no contar con datos comparativos directamente con los compuestos mencionados por el Examinador, sí se cuenta con datos comparativos entre los compuestos aquí reclamados con otros dos compuestos (Compuesto A y Compuesto B), los cuales, como el arte previo menciona, ambos contienen un puente metileno sencillo sin una sustitución $-OR^{1a}$, como se muestra a continuación:



Sin embargo, existe una diferencia adicional y es que los compuestos divulgados en D4 y D5 presentan un anillo de piperidina mientras que los compuestos comparativos A y B presentan la estructura de una piperidina. A pesar de esto, es evidente que el Examinador Internacional entiende que esto se considera como un “reemplazo isostérico de N por CH” en su discusión de

9

la referencia D2 del Informe Internacional Preliminar sobre Patentabilidad (Anexo 1). De hecho, vale la pena resaltar que el Compuesto A (utilizado para propósitos comparativos de mostrar la superioridad de los compuestos de la invención) se encuentra plenamente divulgado en el documento WO2007/040650 o Abbott 2007, citado como D2 en el Informe Internacional Preliminar de Patentabilidad en la página 8, líneas 19-21, lo cual demuestra que este compuesto es completamente comparable con los compuestos de la invención.

A continuación se presenta una tabla comparativa³ entre dos parejas de compuestos: Compuesto A vs el Ejemplo 2 de la presente invención, y el Compuesto B vs el Ejemplo 15 de la presente invención, que demuestra cómo la variación del sustituyente -OR^{1a} tiene un efecto significativo sobre la molécula y una mejora en las propiedades obtenidas por la inclusión de este sustituyente en dicha posición de R¹, lo cual corresponde con efectos benéficos sorprendentes e inesperados que no pudieron ser derivados del arte previo.

Los siguientes resultados de "Potencia Celular" se generaron utilizando los materiales y métodos que figuran en el Anexo 2, adjunto al presente memorial.

Compuesto	Afinidad de Unión ^a				Potencia Celular							
	Bcl-2 IC ₅₀ (nM)		Bcl-X _L IC ₅₀ (nM)		Bcl-X _L EC ₅₀ ^b (nM)		Bcl-X _L GI ₅₀ ^c (nM)	Bcl-2 EC ₅₀ ^d (nM)		Bcl-2 IG ₅₀ ^e (nM)		
A (metileno)	4	Comparable	3	Comparable	>1000	5- veces ↑	800	5- veces ↑	112	1.4- veces ↑	266	4- veces ↑
Ejemplo 2 (OH)	2		4		215		156		82		70	
B (metileno)	11	Comparable	16	Comparable	296	- - -	117	4- veces ↑	256	- - -	102	3- veces ↑
Ejemplo 15 (OH)	7		15		No se probó		27		No se probó		34	

3

^a Datos de afinidad de unión medidos utilizando el ensayo de polarización de fluorescencia, como se describe en el principio del párrafo [00275] de la presente invención.

^b Bcl-XL potencia celular medido utilizando células SUDHL8 en ensayo de activación de la caspasa como se describe en el Apéndice I

^c Bcl-XL potencia celular medido utilizando SUDHL8 células en ensayo de proliferación, como se describe en el Apéndice I.

^d Bcl-2 potencia celular medido utilizando SUDHL4 células de ensayo de activación de la caspasa como se describe en el Apéndice I.

^e Bcl-2 potencia celular medido utilizando SUDHL4 células en ensayo de proliferación, como se describe en el Apéndice I.

102

La información presentada anteriormente demuestra que a pesar que los compuestos cuyo puente es un grupo metileno tienen valores comparables de afinidad de unión frente a los que tienen sustituyentes -OR^{1a}, los compuestos con esta sustitución adicional demostraron un efecto inesperado en cuanto éstos presentaron un mejoramiento de hasta **5 veces** en la potencia celular. Así, la persona medianamente versada en la materia entendería que la afinidad de unión es una medida de qué tan fuerte se une un compuesto se une a una proteína de interés, como Bcl-2 o Bcl-XL, esta medida por sí sola no es determinante sobre la potencia global del fármaco (es decir, su efectividad). Para que un compuesto sea determinado como útil para el tratamiento del cáncer en humanos, in vivo, el fármaco debe unirse a la proteína dentro de una célula. La mejora que se observa en la potencia celular demostrada por los compuestos reclamados en la presente solicitud frente a los compuestos A y B no pudo haber sido predicha por las enseñanzas del arte previo citado. Estas mejoras sorprendentes e inesperadas son una característica de los compuestos reclamados aquí, en cuanto son significativamente más potentes, in vivo, que los compuestos A y B, que como ya se sustentó, resultan más cercanos a los compuestos de la invención.

Consecuentemente, y como se desprende de los resultados anteriormente citados, es evidente que los compuestos de la presente invención resultan inesperadamente potentes, lo cual sumado al hecho de que las estructuras de los compuestos reclamados en la presente solicitud resultan ser novedosas y no derivables de manera obvia a partir de las divulgaciones del arte previo, demuestra que los compuestos aquí reclamados, en su obtención involucran una actividad inventiva que los convierte en una alternativa terapéutica eficiente, ya que no hay enseñanza alguna en el arte previo que sugiera o motive a un experto en la materia a la obtención y desarrollo de dichos compuestos.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este punto vale la pena señalar que MAP establece que para que pueda negarse la existencia de nivel inventivo, es necesario no solamente que la combinación de las enseñanzas pueda hacerse, sino también que exista una sugerencia o razón tal, que lleve al técnico con conocimientos medios a combinar las enseñanzas de los documentos.⁴ Además, el MAP también establece que las invenciones en el campo de la química tienen nivel inventivo cuando la materia reclamada tiene características **estructurales inesperadas** (no derivable por la persona medianamente versada en la materia) o cuando presentan un **efecto técnico inesperado o mejorado impredecible del arte previo**⁵. En el presente caso, **nada** en el arte previo sugiere ni enseña la materia de la presente invención, ni mucho menos permite prever con expectativa de éxito razonable los efectos inesperados que se

⁴ Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 10.2.1 Ejemplo 1 (<http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

⁵ Ibidem. Sección 10.8.1.

evidencian en los ejemplos, por lo que la presente invención reviste nivel inventivo sobre el arte previo citado.

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

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

P. 74.295

Anexos: Capítulo Reivindicatorio Modificado.

Anexo 1: Copia del Reporte Preliminar de Patentabilidad Internacional

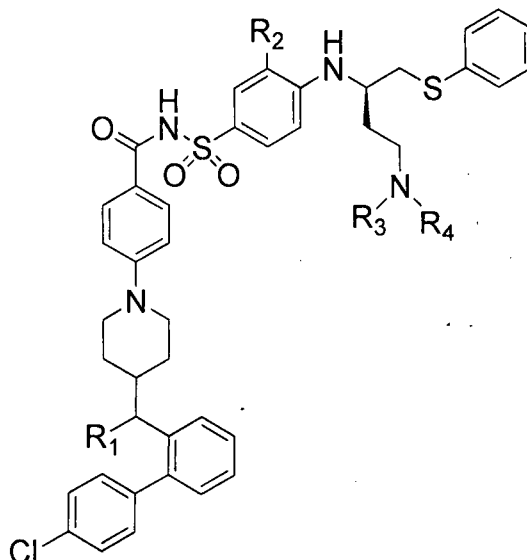
Anexo 2: Metodología del ensayo realizado

AT
12

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula (I);

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

R_1 es $-OR^{1a}$;

R^{1a} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_{1-4} , $-C(O)CH_2NH_2$, $-C(O)CH_2NHCH_3$, $-P(=O)(OH)(OCH_3)$, $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-CH_2OP(=O)(OH)[OC(CH_3)_3]$ y $-CH_2OP(=O)[OC(CH_3)_3]_2$;

R_2 se selecciona entre $-N(O)_2$ y $-S(O)_2CF_3$;

R_3 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} , donde dicho alquilo C_{1-4} está opcionalmente sustituido con uno o más R^{40} ;

R_4 se selecciona entre H y alquilo C_{1-4} , donde dicho alquilo C_{1-4} está opcionalmente sustituido con uno o más R^{40} ; o

R_3 y R_4 junto con el nitrógeno al cual están enlazados forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros, donde

i) dicho anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros está opcionalmente sustituido en carbono con uno o más R^{40} ; y

ii) si dicho anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros contiene un nitrógeno, ese nitrógeno está opcionalmente sustituido con R^{40*} para formar una amina terciaria;

R^{40*} se selecciona entre alquilo C_{1-4} y $-(CH_2)_2OP(=O)(OH)_2$, donde dicho alquilo C_{1-4} está opcionalmente sustituido con uno o más R^a ;

R^{40} en cada caso se selecciona entre $-OR^{40a}$, $-N(R^{40a})_2$, $-CH_2OR^{5a}$, $-CH_2N(R^{5a})_2$, $-OP(=O)(OH)_2$ y $-OP(=O)[OC(CH_3)_3]_2$;

R^{5a} en cada caso se selecciona entre H y alquilo C_{1-3} ;

12
13

R^{40a} en cada caso se selecciona independientemente entre H y alquilo C_{1-4} ; y

R^a se selecciona entre halo, $-OR^m$ y $-N(R^m)_2$; y

R^m en cada caso se selecciona independientemente entre H y alquilo C_{1-4} .

2. El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la Reivindicación 1, en donde:

R^1 es $-OH$;

R^2 es $-S(O)_2CF_3$;

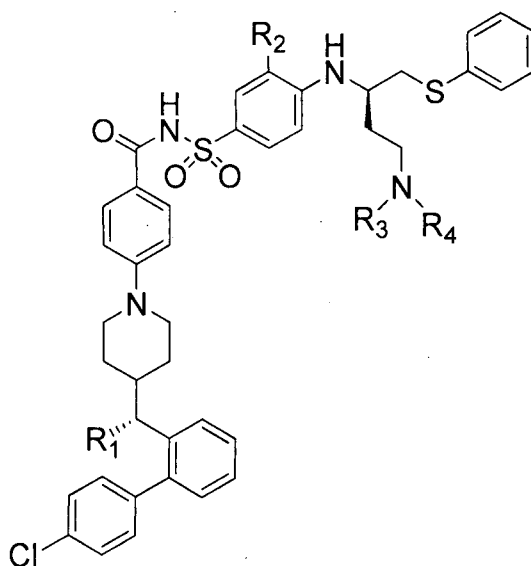
R^3 es alquilo C_{1-2} , donde dicho alquilo C_{1-2} está opcionalmente sustituido con uno o más R^{40} ;

R^4 es alquilo C_{1-2} , donde dicho alquilo C_{1-2} está opcionalmente sustituido con uno o más R^{40} ;

R^{40} en cada caso se selecciona entre $-OR^{40a}$ y $-OP(=O)(OH)_2$; y

R^{40a} es H.

3. El compuesto de la Reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde el compuesto tiene la siguiente estereoquímica:



4. El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la Reivindicación 3, donde el compuesto es 4-(4-((R)-4-(4'-clorobifenil-2-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-N-(4-((R)-4-((2-hidroxi)etil)(metil)amino)-1-(feniltio)butan-2-ilamino)-3-(trifluorometilsulfonyl)fenilsulfonyl)benzamida.

5. El compuesto de Fórmula (I) como se reivindica en la Reivindicación 3, donde el compuesto es 4-(4-((R)-4-(4'-clorobifenil-2-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-N-(4-((R)-4-((2-hidroxi)etil)(metil)amino)-1-(feniltio)butan-2-ilamino)-3-(trifluorometilsulfonyl)fenilsulfonyl)benzamida.

13
14

6. El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la Reivindicación 3, donde el compuesto es dihidrogenofosfato de 2-(((*R*)-3-(4-(*N*-(4-(4-((*R*)-(4'-clorobifenil-2-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)benzoil)sulfamoil)-2-(trifluorometilsulfonil)fenilamino)-4-(feniltio)butil)(metil)amino)etilo.

7. El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la Reivindicación 3, donde el compuesto es 4-(4-((*R*)-(4'-clorobifenil-2-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-*N*-(4-((*R*)-4-(etil(2-hidroxietil)amino)-1-(feniltio)butan-2-ilamino)-3-(trifluorometilsulfonil)fenilsulfonil)benzamida.

8. El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se reivindica en la Reivindicación 3, donde el compuesto es dihidrogenofosfato de 2-(((*R*)-3-(4-(*N*-(4-(4-((*R*)-(4'-clorobifenil-2-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)benzoil)sulfamoil)-2-(trifluorometilsulfonil)fenilamino)-4-(feniltio)butil)(etil)amino)etilo.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference 104020-1P WO	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below		
International application No. PCT/GB2011/051484	International filing date (day/month/year) 05 August 2011 (05.08.2011)	Priority date (day/month/year) 06 August 2010 (06.08.2010)			
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237					
Applicant ASTRAZENECA AB					

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 13 sheets, including this cover sheet.

In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

3. This report contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|---|
| ☒ | Box No. I | Basis of the report |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☒ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☒ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☒ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).

Date of issuance of this report 12 February 2013 (12.02.2013)	
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Athina Nickitas-Etienne e-mail: pt04.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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

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

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2011/051484

International filing date (day/month/year)
05.08.2011

Priority date (day/month/year)
06.08.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D211/22 A61K31/445 A61P35/00 A61P35/02

Applicant
ASTRAZENECA AB

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

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

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
Gitschiner Str. 103
D-10958 Berlin
Tel. +49 30 25901 - 0
Fax: +49 30 25901 - 840

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Frelon, Didier

Telephone No. +49 30 25901-312



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2011/051484

26
17

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2011/051484

17
18

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

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 18

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

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

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

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 18

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

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

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

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

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2011/051484

18
19

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-17, 19

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	<u>19</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17, 19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17, 19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2011/051484

1/20

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

2/5
u

Re item IV.

1. The present set of claims comprises four independent claims: claims 1, 17, 18 and 19. Claims 2 to 15 are stressed dependent on claim 1. Claim 16 is a process for the direct preparation of compounds of formula (I) of claim 1 from compounds (1-f) and (1-g). Claims 1 to 16 can be therefore grouped together as related to the same invention since the subject-matter of each of these claims is linked to a same concept seen in the common structural parts of the final products.

Claim 17 is related to the preparation of intermediates (2-g) and (2-h) by enantiomeric reduction. It is apparent that compounds (2-g) and (2-h) represent particular cases of the intermediates (1-f) of the claim 16 process which are directly used in the preparation of the compounds of the invention. Claim 17 shares consequently the concept of claim 1 (at least by an essential structural part) and can be considered to be unitary with the group of claims 1 to 16.

Claim 18 is directed to the preparation of the compound (5-f). This compound is not directly involved in the preparation of the final compounds. As shown in scheme 5, page 21, the path to arrive to the compounds of the invention starting from compounds (5-f) needs further steps. Such a link is not directly apparent from the wording of the claims and the common structure between compound (5-f) and the final compound (*i.e.*, the 4'-chloro-biphenyl-2-yl-piperidine portion) does not represent a novel characteristic. In other words, a (shared) *special technical feature* as required for the unity of invention according to the PCT (Art. 3(4)(iii); Rule 13.2) is therefore absent and claim 18 should be considered as another invention. The unity could be restored by indicating clearly the synthetic link (*e.g.*, the connecting synthetic steps) which leads to the final compounds.

Claim 19 is directed to the preparation of compounds of formula M. The same remarks as for claim 18 apply to this claim.

It results that at least three inventions can be identified as following:

- **invention A** according to claims 1 to 17 characterized by compounds of formula (I),
- **invention B** according to claims 18 characterized by compound of formula (5-f),
- **invention C** according to claims 19 characterized by compounds of formula M.

21
22

2. The first novel invention A was the object of a first version of the WOISA. After receipt of the invitation to pay additional fees, the applicant paid and asked a further opinion on invention C as designated above.

Re item V.

Invention A

A1. Cited documents

- | | |
|----|---|
| D1 | WO 2005/049594 |
| D2 | WO 2007/040650 |
| D3 | WO 2009/036035 |
| D4 | BRUNCKO, MILAN ET AL: JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 50, no. 4, 2007, pages 641-662 |

A2. Novelty

The present invention differs essentially from D1 by the substituent R^1 which can represent CN, OR^{1a} or $N(R^{1a})_2$. The structurally closest compounds of D1 appear to be the two compounds listed on page 116, lines 13-20, wherein a hydrogen is in place of the corresponding rest R^1 in the presently claimed compounds.

Similarly the present invention differs essentially from D2 by the substituent R^1 which is CN, OR^{1a} or $N(R^{1a})_2$. There is no substituent in D2 corresponding to R^1 . A second minor difference is the isosteric replacement of N by C forming the present piperidine in place of the prior art piperazine.

The essential difference with the prior art D3 lies in the link $>W-W_1-CH<$. As W_1 can be absent, the group corresponding to the present R^1 can be seen in R_{28} which represents hydrogen, oxo, aryl or heteroaryl (both evt. substituted) whereas R_{27} can be a substituted aryl which, in the structurally close examples 8 to 10, is illustrated by a 4-chloro-biphenyl group like in the presently claimed compounds.

27
B

D4 discloses particularly the compound ABT-737 known for the same activities as the presently claimed compounds. The same essential differences are observed as with D2 whereas, in the compounds of D2, the rest corresponding to R^2 of the invention is a trifluoromethyl sulfonyl, it is a nitro group in D4.

The compounds of the present application are consequently considered to be novel.

A3. Inventive step - non unity a posteriori

A3.1 The problem underlying the present invention A is to provide N-acyl sulfonamide derivatives of formula (I) which are useful as anti-proliferative agents and/or apoptosis promoters in the treatment of cancer.

A3.2 All the compounds of the above cited prior art have the same therapeutical purposes. The closest prior art appears to be seen in the compounds of D1 which, at the corresponding position of the present rest R^1 which can be CN, OR^{1a} or N(R^{1a})₂, carry a hydrogen or the rest R^{31} which can represent F, Cl, Br or an alkyl group.

The prior art teaches to the skilled person the possibility of a relatively large variability of the substitution pattern on the position of R^1/R^{31} . It does not seem that a particular common concept covers the meanings regrouped in the R^1 definition such that it would appear clearly distinct from another concept covering the meanings regrouped in the R^{31} definition. Consequently the skilled person expects to maintain the activity in the presently claimed compounds. Furthermore, when considering additionally the IC₅₀ values in the Bcl-X_L assays provided in both documents, no significant difference is straightforwardly in favor of the presently claimed compounds.

In order to support the presence of an inventive step under the PCT, an unexpected effect originated from the differentiating group R^1 is still to be evidenced. Where each meaning comprised by R^1 is not obviously equivalent, it should be shown that they are responsible of the same surprising effect, otherwise the requirement of unity is broken because structurally different elements would thus lead to different effects.

A3.3 The Applicant's attention is drawn to the fact that the protection which is sought should comply with a reasonable breadth for the claimed scope covering only compounds, their variants and equivalents which solve the problem underlying the invention, what is a prerequisite for the pertinence of the acknowledgement of an inventive step over the whole claimed scope (Art. 33(3) PCT).

28
24

Definitions covering a plurality of very different meanings and derivatives thereof may extend unrealistically the scope of the claims, *i.e.*, *far beyond* what has actually been investigated by the inventor(s) and/or verified in the worked examples on file and *far beyond* what the skilled person, also taking into account physico-chemical and biological considerations, can regard as the legitimate object of the invention. The *effect* (that is, *the contribution over the prior art*) of unspecific and not illustrated meanings may *not be foreseen* having regard to the problem underlying the present application.

As a rule, protection conferred by a patent should be commensurate with the range of compounds for which the effect has been properly demonstrated, including obvious variants thereof. The extent of a "reasonable generalisation" depends therefore on the extent of the illustration which should render credible that substantially all alternatives claimed are solutions to the problem. In principle, the application should not be regarded as satisfying the requirements for patentability unless the description gives a number of examples or describes alternative embodiments or variations extending over the whole area protected by the claims.

The given examples represent a **relatively narrow** illustration of the claimed scope. It should be credible that all potentially comprised embodiments, specially far remote ones embraced by the claimed scope, exhibit the same pharmacological effect(s) and as such solve the problem underlying the present application. In view of the regularly occurring structural elements and other limited variations of this illustration, a skilled person can consider that such constant features combine to form a characteristic which is necessary and **essential** to the invention and, consequently, should be included in the main claim.

A reasonable generalisation of tested examples appear to be acceptable if it is not in contradiction to the basic principles of pharmacology and drug design (cf. SAR studies) that a biological activity can *prima facie* be expected to be retained in compounds with a same chemical core when making small structural modifications or replacing groups by known equivalent or (bio)isosteric groups. Reasonable predictions based on the relations between chemical structures and biological activities are in principle possible, but **there is a limit** beyond which no such prediction can be validly done. It is therefore necessary to fix limits to the claimed scope.

It should be clear that a generalization is considered to be reasonable when it remains in a frame for which the benefit of the doubt is technically admissible. A proper balance must be found between, on the one hand, the *actual technical contribution* to the state of the art by the invention disclosed in the application, if any, and, on the other hand, the *manner of claiming* so that, if patent protection is granted, its scope is fair and adequate. The Applicant is entitled to claim all **obvious** modifications,

24
15

equivalents and/or (bio)isosteric values of what was concretely described and for which it can be reasonably predicted that all the variations covered have the properties or uses ascribed to them in the description, *i.e.*, all such forms would be suitable for solving the problem underlying the application and therefore likely to represent the very invention.

Invention C

C1. Cited documents

Reference is made to the following documents:

- D5 WO 2010/065865
- D6 WO 2008/061208
- D7 WENDT, MICHAEL D. ET AL: JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 49, no. 3, 2006, pages 1165-1181
- D8 US 2002/086887
- D9 WO 02/24636

C2. Novelty

It is noticed that the omission of the definition of the rest R^2 . This is necessary as part of in this independent claim. For the consistency of the procedure, the meanings of R^2 has been taken from claim 1.

D5 discloses a close process in examples 81A to 81D: the difference lies essentially in the protection group on the α -amino group. It is a Fmoc-rest in D5 whereas it is a Boc in the present application. The present invention further adds a first step starting from Asp.

D6 discloses a close process in examples 2 and 3, steps a to b and f to j, example 5, step 1+b to c and principally example 13, steps A to F. The essential difference is in the nitrogen protection by Fmoc. Additionally the present invention adds a first step starting from Asp. The present invention further adds a first step starting from Asp.

25/26

D7 describes the same process as above in scheme 6. The possibility of the N protection by Boc in the formation of the phenyl-sulfanyl substitution for the hydroxy group is indicated in scheme 7.

D8 and D9 disclose a close process in examples 122A to 122E similar to the precedent ones of D6 and D7. The first step starting from Asp is not explicitly described.

The novelty can therefore be formally acknowledged.

C3. Inventive step

C3.1 The problem underlying this sub-invention is to provide a process starting from Asp to produce the sulfonamide for formula (M).

C3.2 It is noted that R^2 is undefined and the various steps from J to M are also designated by their global concepts without further specification as to their *modus operandi*: conversion, reduction, substitution, deprotection and aromatic substitution. This means that any convenient analogous method can apply.

The teaching of the cited prior art reproduces the same step sequencing (except the first step J to K). Concerning this additional first step, it appears to merely consist of the protection of the α -amino group of Asp and the protection by alkyl-esterification of the β -carboxyl group. These protection steps are routine processes for skilled people in synthesis involving α -amino-acids as starting products.

The prior art teaching leads consequently unambiguously the skilled person to the present process for the preparation of compounds (M).

Re Item VIII.

1. Since examples are, by definition, illustrative of the invention, they normally should not serve any limiting purpose. It is the claims, when appropriately drafted, which define the scope, not the examples. If the invention is clearly defined and appropriately illustrated, it is superfluous to express precautionary measures on the limits of the scope as it finally prevents a proper definition of the invention and opens the way to speculations about the very inventive subject-matter.

20
27

Expressions and/or sentences which refer to an extent of protection beyond the actual invention like "the compounds of the invention (...) are further illustrated by all classes, subclasses and species of each of the compounds disclosed herein" appear to be essentially speculative. The insertion of such broadening expressions and/or sentences is therefore also objectionable because it would suggest that the subject-matter is not properly covered by the claimed scope for which a protection is sought. Any expression which can be interpreted as an unjustified extension of the claimed scope should be objected. The specification should be clear and sufficient by itself and the claims should find a clear support in the description. Unspecific expressions cannot serve as a support for the invention and are misleading since they cannot participate of a proper definition of the very invention and, particularly, do not help a skilled person looking for reproducing it.

Consequently any element against clarity has to be deleted.

2. References to methods of treatment or prevention (or diagnostic methods) as further objects of the invention must be avoided since they are considered by the ISA to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT.
3. Some designations may appear confusing where compounds (1-g), page 12, seem to be the same as compounds (1-i), page 17 or where compounds (4-e), page 17, seem to be the same as compounds M, page 19.

2A
10

Anexo 2 – Metodología de Ensayos Realizados

Materiales y Métodos

Las líneas de células SuDHL4 y SuDHL8 se utilizaron en los ensayos como se describe a continuación. La actividad observada en las células SUDHL8 indica la actividad inhibidora de la Bcl-XL, y la actividad observada en las células SuDHL4 indica la actividad inhibidora de Bcl-2.

Ensayo de proliferación

El kit de ensayo de proliferación celular de azul de Alamar se usó siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las células se sembraron a 10^4 (SuDHL4) o 2×10^4 (SuDHL8) en placas de 96 cavidades de ensayo y se dosificaron con el compuesto o control de vehículo (0,3% de DMSO) durante 72h. La proliferación celular se cuantificó mediante la medición de la fluorescencia después de 4h de incubación con el reactivo comercial Alamar Blue. La fluorescencia se detectó a 545ex/600em con un lector de microplacas (M1000, Tecan).

Ensayo caspasa

El kit de la caspasa Glo 3/7 se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). 10^4 SuDHL4 o células SuDHL8 2×10^4 fueron sembradas en placas de ensayo de 96 cavidades y se dosificaron con el compuesto o control de vehículo (DMSO al 0,3%) durante 6 horas. La actividad de caspasa se cuantificó mediante la medición de la luminiscencia después de 45 min de incubación con el sustrato de la caspasa disponibles comercialmente. La luminiscencia se detectó con un lector de microplacas (M1000, Tecan).