

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 14-155949- -5	FECHA: 2016-06-15 08:28:38
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 10
ACT: 519 TRASLADOINFORME	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
JUAN DAVID CASTRO GARCIA

Asunto: Radicación: 14-155949- -5
Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 519
Oficio: 7203
Folios: 10

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/FR2013/050136				
Fecha de Presentación Internacional	23/01/2013				

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado N°14-155949-00000-0000	Julio 18 de 2014
Reivindicaciones	Radicado N°14-155949-00000-0000	Julio 18 de 2014

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

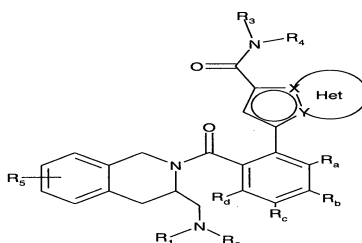
De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1 a 24 contenidas en el radicado N°14-155949-00000-0000 son aceptadas para ser estudiadas, porque se realizó el pago por las reivindicaciones 11 a 24, de acuerdo con el recibo presente en la página 250 del radicado N°14-155949-00000-0000.

Título de la solicitud: “Nuevos derivados de indolizina, su procedimiento de preparación y las composiciones farmacéuticas que los contienen”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de obtener compuestos alternativos para el tratamiento del cáncer.

Para resolver este problema técnico, la solicitud en estudio plantea la obtención de compuestos derivados de indolizina como promotor de la apoptosis, para el tratamiento del cáncer.



El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K31/407; A61K31/4353; A61K31/436; A61P35/00; A61P37/00; C07D471/00; C07D471/04; C07D487/04; C07D491/052.

4. Reivindicaciones relativas al uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 12 – 19 y 22 a 24 no es patentable, de acuerdo con el artículo 14.

5. De la Solicitud de la Patente

Título

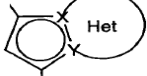
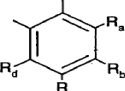
El título de la solicitud se considera muy general, porque al mencionar “Derivados de indolizina”, se incluyen muchos compuestos posibles que contienen esta característica, pero que no están incluidos dentro del objeto de la solicitud. El objeto de la solicitud se refiere a compuestos derivados de 3 – [(2 – (2 – aminometil isoquinolin – 3 – il) carbonilfenil] indolizina – 1 – carboxamida. Se solicita modificar el título de la solicitud, de tal forma que mencione de manera detallada los compuestos obtenidos en la misma.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 1 no es concisa, porque los sustituyentes de la fórmula al ser referidos de manera general bajo denominaciones tales como “un heterociclo de 5 a 7 eslabones, alquilo C₁₋₆, COO–alquilo C₁₋₆, heterocicloalquilo de 4 a 7 eslabones, alquilsulfonilo C₁₋₆, cicloalquilo de 4 a 10 carbonos, clicloalquil (C₄₋₁₀) alquilo, arilo, heteroarilo monociclo o biciclo de 5 a 10 eslabones, entre otros”, a partir de los mismos se obtiene una cantidad muy amplia de posibles compuestos, incrementando el grado de complejidad de la solicitud, por lo que no es posible establecer el verdadero alcance de la solicitud.

Por lo tanto, se requiere que se realice una restricción razonable de los sustituyentes planteados, de tal forma que a partir de los mismos se obtengan los compuestos probados y sustentados en la descripción. Se sugiere realizar dicha

restricción teniendo en cuenta los ejemplos ilustrados en la descripción, de acuerdo a los sustituyentes descritos en la siguiente tabla:

Sustituyente	Sustentado en la descripción
	Indolizina, pirrolo [1,2-a] pirazina, pirrolizina, pirrolo [2,1-c] oxazina, pirrolo [1,2-a] azepina (X es C o N, Y es N)
	Fenil (Ra, Rb, Rc, Rd son H), indol, benzodioxol, benzodioxin, benzodioxepin (Rb y Rc se unen para formar un heterociclo); Rd es H, CF3, O CF3,
	Morfolin, piperazin, 1, 4 – oxazepan (R1 y R2 se unen para formar heterociclo)
	R3 y R4 son H, 4 – hidroxifenil, 4 – metilfenil, 4 – clorofenil, 3 – fluoro – 4 – metilfenil, 4 – dietilamino fenil, indol – 5 – il, benzoxazin – 7 – il, indazol – 5 – il, espiro ciclopropano, 1, 3' – indol, tienil,
R5	H, Cl, deuterio,

Las reivindicaciones 20 y 21 no son claras porque el término “asociación” no es precisa ni describe un producto específico. Además, cuando se mencionan otros agentes tales como “un agente genotóxico, venenos mitóticos, antimetabolito inhibidores de proteasoma, inhibidores de quinasa, anticuerpos”, se incluyen muchas sustancias posibles con dichas actividades farmacoterapéuticas, pero que no están incluidas dentro del objeto de la solicitud.

De acuerdo a lo anterior, se solicita definir si las asociaciones reclamadas corresponden a composiciones farmacéuticas o kits de partes, según el sustento en la descripción. Así mismo, se requiere mencionar los agentes anticancerígenos específicos que integran las composiciones o kits reclamados en la solicitud, según sea el caso.

Descripción (Art 28 D 486)

La descripción de la solicitud no divulga la invención de manera suficientemente completa para que el la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, porque no menciona la inclusión de composiciones o kits que comprenden un compuesto de la Fórmula I y otro agente anticancerígeno. Se solicita realizar las respectivas aclaraciones.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación internacional de la solicitud: El 23 de enero de 2013 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> . 2009. 19 (1); 230 – 233	“Tetrahydroisoquinoline amide substituted phenyl pyrazoles as selective Bcl-2 inhibitors”	01/Enero/2009
D2	US2003/0153759	“1 – glyoxilamide indolizines for treating cancer”	14/Agosto/2003

El documento D1¹ divulga compuestos derivados de isoquinolina como inhibidores de Bcl – 2, para el tratamiento del cáncer (Pág. 230, abstract).

El documento D2² divulga compuestos derivados de indolizina para el tratamiento

1 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X08013310>

2 [http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2003153759A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20030814&DB=worldwide.espacenet.com&locale=es_LP)

[CC=US&NR=2003153759A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20030814&DB=worldwide.espacenet.com&locale=es_LP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2003153759A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20030814&DB=worldwide.espacenet.com&locale=es_LP)

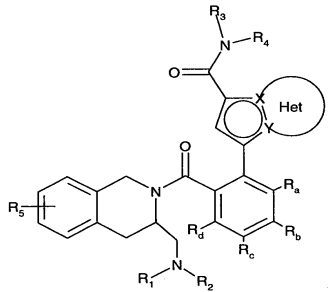
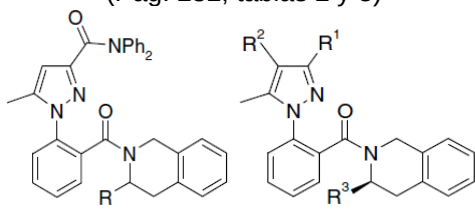
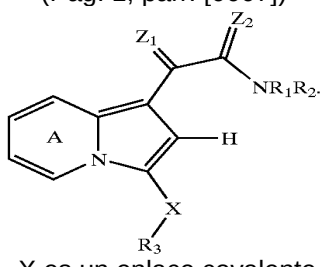
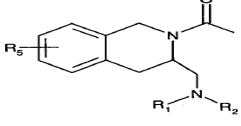
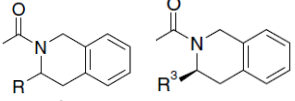
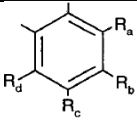
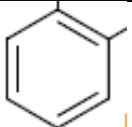
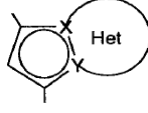
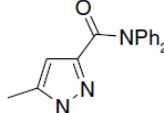
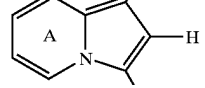
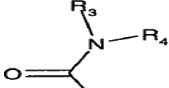
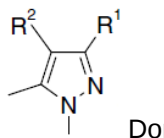
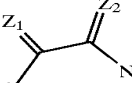
del cáncer (Pág. 1, párr. [0006], [0007]).

7. Examen de Patentabilidad.

Nivel Inventivo (Art 18 D 486)

La reivindicación 1 divulga “Un compuesto de fórmula (I), en la que...” (Pág. 69 – 71 del radicado N° 14–155949–00000–0000).

Comparación de las características técnicas esenciales con el Estado de la Técnica

Solicitud	D1	D2
Compuesto de la fórmula (I) 	Compuestos de fórmula (Pág. 232, tablas 2 y 3) 	Compuesto de la fórmula (I) (Pág. 1, párr. [0007]) 
 Donde R ₁ y R ₂ son H o alquilo C ₁₋₆ R ₅ es H	 Donde R es CH ₂ NH ₂ , CH ₂ NHCH ₃ , CH ₂ N(CH ₃) ₂ (Tabla 2); R ³ es CH ₂ NH ₂ (Tabla 3)	R ₃ es un grupo arilo sustituido (Pág. 1, párr. [0011])
 Donde R _a R _b R _c y R _d son H		
 Donde X e Y son N o C, donde ambos no son al tiempo ni C ni N; Het es un ciclo de 4, 5 ó 6 eslabones	 Donde dos grupos fenil se unen al N del grupo carboxamida (Tabla 2)	Anillo de indolizina (Pág. 1, párr. [0008]) 
 Donde R ₃ y R ₄ son alquilo C ₁₋₆ o arilo	 Donde R ¹ es CONPh ₂ , CON(CH ₂ CH ₃) ₂ , CON(CH ₂ CF ₃) ₂ , CON(CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂ (Tabla 3)	 Donde R ₁ y R ₂ son alquilo C ₁₋₆ o arilo (Pág. 1, párr. [0010])

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a los compuestos de la reivindicación 1, porque se mencionan compuestos derivados de 3 – aminometil – 2 – fenilcarbonil isoquinolina, como inhibidores de Bcl – 2, para el tratamiento del cáncer mediante la inducción de la apoptosis celular (Pág. 230, col. izq., ln. 17 – 21; pág. 232, tablas 2 y 3).

La diferencia entre los compuestos de la solicitud con respecto a los compuestos divulgados en el documento D1, radica en que en los compuestos de la solicitud comprenden un grupo heterociclo bicíclico como conector entre el grupo carbonilfenil y el grupo carboxamida, mientras que los compuestos divulgados en el documento D1 comprenden un heterociclo monocíclico (pirazol) como conector entre el grupo carbonilfenil y el grupo carboxamida.

Esta diferencia confiere el efecto técnico a los compuestos de la solicitud de incrementar los valores de IC₅₀ sobre el receptor Bcl – 2.

El problema técnico objetivo que se pretende resolver es el siguiente: Como modificar los compuestos divulgados en el documento D1, para obtener compuestos alternativos para el tratamiento del cáncer.

El documento D2 divulga compuestos con actividad anticancerígena que comprenden un anillo bicíclico de indolizina como conector de un grupo arilo R₃ y un grupo carbonilo sustituido (Pág. 1, párr. [0007] – [0011]).

Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia y conocedora de los conceptos divulgados en los documentos D1 y D2, sin ningún esfuerzo, modificaría los compuestos divulgados en el documento D1, modificando el grupo pirazol e incluyendo un anillo bicíclico de indolizina como conector entre un grupo arilo y un carbonilo sustituido, como lo sugiere el documento D2, para obtener los compuestos propuestos en la solicitud de manera obvia o evidente.

En consecuencia, la reivindicación 1, de acuerdo a lo divulgado en los documentos D1 y D2, carece de Nivel Inventivo.

Las reivindicaciones 2 a 8, 11, 20 y 21 dependientes de la reivindicación 1, no mencionan características inventivas adicionales a las comprendidas dentro del objeto de la reivindicación 1, porque el documento D2 sugiere la combinación de dos compuestos anticancerígenos (Pág. 6, párr. [0055]). Por lo tanto, estas reivindicaciones también carecen de Nivel Inventivo.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> . 2009. 19 (1); 230 – 233	1 a 8, 11, 20 y 21	Nivel Inventivo
D2	US2003/0153759	1 a 8, 11, 20 y 21	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Si como respuesta a este requerimiento el solicitante llegara a modificar: i) el capítulo reivindicatorio, ii) la descripción de la invención a proteger, iii) o presente un nuevo capítulo reivindicatorio, y desee que se realice un nuevo examen de patentabilidad a esta modificación, no deberá pagar la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente a la tasa de examen de patentabilidad. En todo caso, el número de requerimientos por no patentabilidad estará supeditado a que el término del estudio de patentabilidad no sea superior a 18 meses, contados desde la publicación de la solicitud de patente de invención. Adicionalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones deberá pagar la tasa por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2016-06-21

Elaboró: Dayron Alexander Ramirez Reyes

Revisó: Lenin Roberto Guerrero



Tetrahydroisoquinoline amide substituted phenyl pyrazoles as selective Bcl-2 inhibitors

John Porter *, Andrew Payne, Ben de Candole, Daniel Ford, Brian Hutchinson, Graham Trevitt, James Turner, Chloe Edwards, Clare Watkins, Ian Whitcombe, Jeremy Davis, Colin Stubberfield

UCB Celltech, 216 Bath Road, Slough SL1 3WE, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2008

Revised 22 October 2008

Accepted 25 October 2008

Available online 31 October 2008

Keywords:

Bcl-2

Bcl-xL

Apoptosis

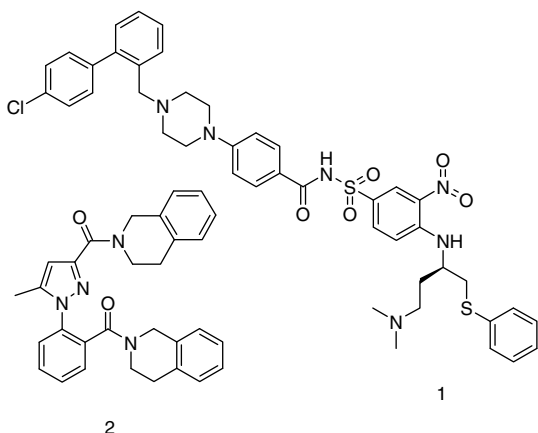
Protein–protein interaction

ABSTRACT

Anti-apoptotic Bcl-2 protects cells from apoptosis by binding to pro-apoptotic members of the Bcl-2 family thereby playing a role in tumour survival in response to chemo- or radiation therapy. We describe a series of phenyl pyrazoles that have high affinity for Bcl-2 and rationalise the observed SAR by means of an X-ray crystal structure.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In normal cells Bcl-2, an anti-apoptotic 26 kDa protein, regulates the activity of pro-apoptotic proteins by direct binding and sequestration.¹ Bcl-2 is overexpressed in a wide range of human haematopoietic and solid cancers and serves to prevent apoptosis induced by protective cell-death mechanisms. This is manifested clinically as drug resistance when treating with traditional cytotoxics and can also delay apoptosis in response to radiation therapy.² The highly homologous family member, Bcl-xL, also shows significant overexpression in some types of lung and ovarian cancers. The precise mechanism of Bcl-2 mediated apoptosis is the subject of considerable debate.³



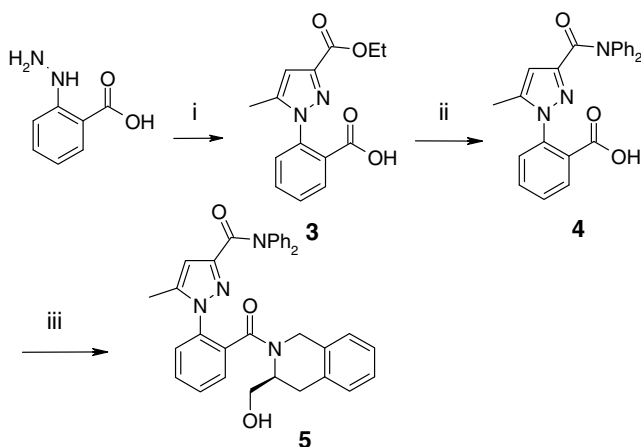
* Corresponding author. Tel.: +44 1753 534655.

E-mail address: john.porter@ucb-group.com (J. Porter).

The Bcl-2 family of proteins can be divided into three groups based on the presence of Bcl-2 homology domains (BH1–BH4). Anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-xL have a binding groove that accommodates the BH3 domain of pro-apoptotic family members,⁴ preventing their oligomerization and the initiation of the apoptosis cascade.⁵ Chimaeric Bcl-2/xL NMR and X-ray crystal structures have demonstrated that the binding groove is amenable to small-molecule intervention⁶ and further studies have shown that such molecules are able to sensitise tumour cells to apoptosis. It is envisaged that a small-molecule inhibitor of Bcl-2 function would prevent binding and sequestration of pro-apoptotic Bcl-2 partner proteins. Such a molecule would abrogate the anti-apoptotic effects of Bcl-2 expression and chemosensitize a significant proportion of tumours to cell-death by existing cytotoxics and new targeted therapies. This has been most successfully demonstrated with ABT-737, **1**, a small molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor,⁷ an analogue of which has now entered the clinic.⁸

The phenylpyrazole **2** was identified by a HTS campaign as a moderately potent and selective Bcl-2 inhibitor (IC₅₀ Bcl-2 1.5 μM; Bcl-xL 16.6 μM). ¹⁵N–¹H HSQC NMR experiments showed that phenylpyrazole **2** binds to a similar region of Bcl-2 as ABT-737.⁶ We now describe some of our attempts to develop **2** and rationalise the SAR observed with reference to an X-ray crystal structure.

The target molecules were prepared by two methods. Initially the pyrazole ring was constructed from the 2-hydrazinebenzoic acid⁹ and ethylacetoxypruvate, Scheme 1, to give a 4:1 mixture of regioisomers. Amide formation with lithiated amine gave **4**, followed by coupling with the second amine gave the desired product **5**. This method was limiting for the more highly functionalised tar-



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) ethyl acetopyruvate, gAcOH, reflux 2 h, 59%; (ii) *n*BuLi 2 equiv, Ph_2NH , THF, -78 to 25°C , 98%; (iii) (*S*)-1-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl)-methanol, DIEA, EDC, HOBT, DCM, 25°C , 16 h, 30%.

get molecules so an alternative method using the base mediated coupling of a pyrazole **6** to an activated phenyl, was employed, Scheme 2.

Confirmation that the desired regioisomer **7** had been prepared was obtained by nOe NMR. Hydrolysis of the ester, amide formation and reduction gave the desired product **8**.

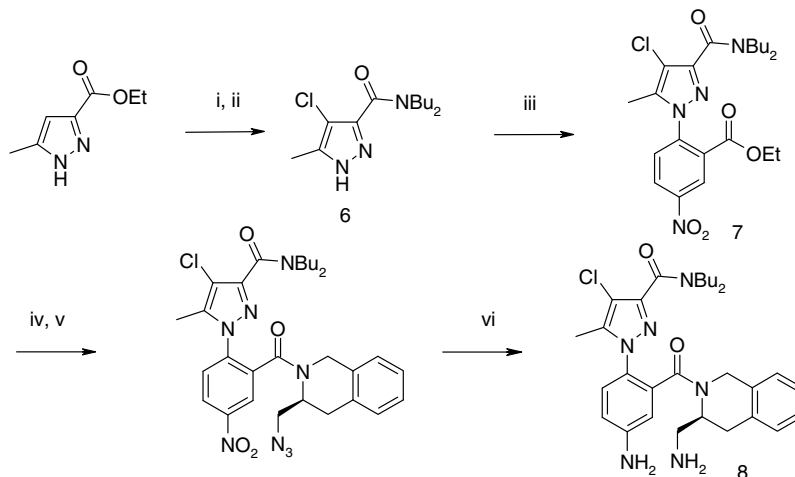
3-Substituted tetrahydroisoquinolines (THIQ) were prepared from the commercially available chiral material by standard functional group interconversions.¹⁰ For example, preparation of the aminomethyl analogue was achieved through the azidation of the alcohol using DPPA. The azide THIQ was then coupled to the benzoic acid and subsequently reduced to give the amine. The 3-methyl analogue was prepared as the racemate by reduction of 3-methyl isoquinoline using NaBH_4 and NiBr_2 .¹¹

Screening for binding affinity against Bcl-2 was done by means of a LANCE based assay using a 16-residue Bak peptide.¹² As binding affinity improved the peptide substrate was switched to the higher affinity 26-residue analogue, which typically gave an approximate 10-fold drop-off in activity compared to the 16-mer peptide. A similar system was used to screen against Bcl-xL.

Phenylpyrazole **2** was a moderately potent inhibitor with an IC_{50} of $1.5\ \mu\text{M}$ against Bcl-2 (16-mer) and $16.6\ \mu\text{M}$ against Bcl-xL

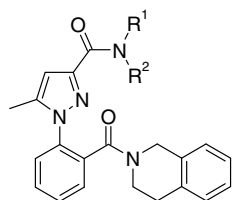
(16-mer). DMPK studies showed that both THIQ groups were extensively metabolised so initial efforts focused on modifying these groups. Initial SAR studies indicated that while the phenyl THIQ amide appeared essential for activity; the requirement for the pyrazole THIQ amide was less critical. Consequently, we embarked on the systematic replacement of the pyrazole THIQ amide, with the results for some representative examples shown in Table 1. A preference for tertiary over secondary amides (compare **10** with **9**) presumably reflects a conformational preference for the pyrazole amide substituent. The benzyl analogue, **11**, was inactive and para-substituents on the aromatic ring were disfavoured (compare **12** with **13** or **14**). Larger amide N-substituents were tolerated, culminating in the diphenyl analogue **18** being amongst the most potent. Interestingly, this compound showed good levels of selectivity for Bcl-2 over Bcl-xL. Reversal of the amide by switching the nitrogen and carbonyl positions; replacement with sulfonamide, carbamate, ester or carbonyl functionality; or directly attaching a phenyl group to the pyrazole completely abolished activity.

Attempts to replace the phenyl THIQ substituent with a wide range of isosteres were unsuccessful. However, the addition of a methanol group at the 3-position, Table 2, gave a marked improvement in potency. Although the direct attachment of carboxylate functionality, for example **23**, at this position was detrimental, (presumably an unfavourable interaction with the amide carbonyl) a range of homologated substituents were active. In fact, it became clear that size, hydrogen bonding potential or charge of these groups were not critical, and that the observed activity must come from a conformational lock exerted by the 3-substituent. This was confirmed by NMR studies showing the 3-substituted THIQ in an theoretically energetically unfavoured pseudo-axial conformation. This is a manifestation of a special case of the A-1,3 strain which is commonly observed in substituted acylated cyclic amines.¹³ All of these compounds were prepared from homochiral starting materials, with the exception of the 3-methyl analogue, HPLC separation of the two enantiomers was accomplished to give the eutomer **27** and the distomer **28**. There is a clear preference for the *S*-enantiomer at this position, again suggesting a specific conformational requirement for this part of the molecule. Interestingly, the NMR spectra of these 3-substituted THIQ compounds typically show a mixture of rotamers (as determined by integration of the pyrazole proton), with one rotamer conformation predominating. Although these rotamers can make analysis difficult, their presence sug-



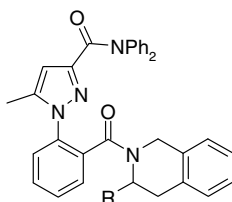
Scheme 2. Reagents and conditions: (i) N-Chlorosuccinimide, CCl_4 , benzoyl peroxide, reflux, 88%; (ii) *n*BuLi, $n\text{Bu}_2\text{NH}$, THF, -78 to 25°C , 88%; (iii) ethyl 2-fluoro-5-nitrobenzoate, K_2CO_3 , DMF, 100°C , 91%; (iv) NaOH, EtOH, water, 25°C , 98%; (v) (*S*)-3-azidomethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline HCl, DIEA, EDC, HOBT, DCM, 25°C , 20%; (vi) H_2 , 10% Pd/C, EtOH, 25°C .

Table 1
Modifications to pyrazole amide substituent.



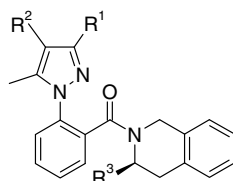
Compound	R ¹	R ²	Bcl-2 (16mer) IC ₅₀ (μM)	Bcl-xL (16mer) IC ₅₀ (μM)
9	H	Ph	50	
10	Me	Ph	2.5	
11	Me	CH ₂ Ph	Inactive	
12	Me	4-F-Ph	10.7	
13	Me	3-F-Ph	2.3	
14	Me	2-F-Ph	3.0	
15	Et	Ph	1.9	
16	<i>i</i> -Pr	Ph	7.7	
17	<i>c</i> -Hex	Ph	1.4	4.11
18	Ph	Ph	0.8	12.4

Table 2
Modifications to the THIQ-3-substituent.



Compound	R	Bcl-2 (16mer) IC ₅₀ (μM)	Bcl-xL (16mer) IC ₅₀ (μM)
5	(S)-CH ₂ OH	0.19	
19	(S)-CH ₂ NH ₂	0.11	11.36
20	(S)-CH ₂ OMe	0.16	5.57
21	(S)-CH ₂ NHAc	0.73	9.69
22	(S)-CH ₂ NHSO ₂ Me	1.05	40% @ 33 μM
23	(S)-CO ₂ Et	5.61	18.0
24	(S)-CH ₂ CO ₂ Me	0.28	5.17
25	(S)-CH ₂ NMe ₂	0.15	6.79
26	(S)-CH ₂ NHMe	0.14	12.63
27	(R)-Me	0.11	5.24
28	(S)-Me	27% @ 30 μM	4% @ 30 μM

Table 3
Pyrazole modifications.



Compound	R ¹	R ²	R ³	Bcl-2 16mer IC ₅₀ (μM)	Bcl-2 26mer IC ₅₀ (μM)	Bcl-xL 16mer IC ₅₀ (μM)	Bcl-xL 26mer IC ₅₀ (μM)
29	CONPh ₂	Br	CH ₂ OH	0.04	0.21	2.41	9% @ 30 μM
30	CONPh ₂	Cl	CH ₂ OH	0.05	0.48	2.28	29% @ 30 μM
31	CONPh ₂	Cl	CH ₂ NH ₂	0.03	0.10	1.61	28% @ 30 μM
32	CONEt ₂	Br	CH ₂ OH	3.67	17.3		14% @ 10 μM
33	CON(CH ₂ CF ₃) ₂	Cl	CH ₂ OH		6% @ 10 μM	13% @ 30 μM	4% @ 30 μM
34	CON(<i>n</i> Bu) ₂	H	H	0.23	2.01		25.20
35	CON(<i>n</i> Bu) ₂	Cl	CH ₂ OH	0.10	0.78		6.94
36	CON(<i>n</i> Bu) ₂	Cl	CH ₂ NH ₂	0.02	0.16	0.25	5.05

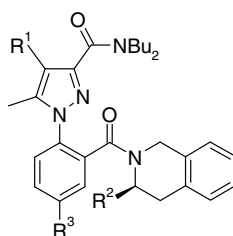
gested a way of determining the bioactive conformation. Our attempts to achieve this will be described elsewhere.

A significant advance came from the observation that bromination at the pyrazole 4-position led to a considerable improvement in potency, Table 3, **29**. Chloro-substitution was equipotent, for example **30**, but other functionality such as phenyl and nitro were, at best, only equipotent with the non-substituted pyrazole. With these modifications in hand we returned to the pyrazole amide substituent. Replacement of the diphenylamide with dialkylamides was relatively successful, Table 3, with the di-*n*-butyl group appearing to be optimum, for example **36**. The dialkylamides also appear to have greater Bcl-xL activity than the phenylamides, compare for example **36** with **31**.

The X-ray crystal structure of **31** complexed to a chimaeric Bcl-2/Bcl-xL protein was solved, Figure 1.¹⁴ Comparison with the published structures shows that **31** binds to part of the same cleft as that occupied by the Bak, Bad, and Bim peptides and small molecules^{4,15} and is consistent with the observed SAR. Peptide binding to Bcl-2/Bcl-xL is mediated via hydrophobic interactions of the side-chains (*i*, *i* + 4, *i* + 7, and *i* + 11) in discrete sub-pockets in the cleft. **31** occupies some of these sites (*i*, *i* + 4), but also makes a unique interaction through the THIQ group to a site that is not seen by the peptides or, the Abbott ligand.¹⁵ **31** exhibits the predicted conformation determined from the ¹H NMR derived molecular models of the isolated rotamers of conformationally locked analogues. The key hydrophobic pyrazole amide substituent prefers to be *cis* to the pyrazole which may have implications in the design of suitable amide replacements. There is clearly a hydrophobic 'second-site' binding pocket that is occupied by the peptides and the Abbott compounds. Accessing this pocket would be expected to improve potency by maximising ligand interaction with Bcl-2. The crystal structure suggests that this may be achieved by substituting in the 4-position of the central phenyl ring. Initial studies were performed on the non-substituted THIQ scaffold, Table 4. The most potent examples contained carbonyl functionality and a hydrophobic group also appeared to be preferred. Although these molecules had poor solubility, results were sufficiently encouraging to prepare the 3-aminomethyl THIQ analogues, the most potent being the ether, **42**. Interestingly, the thioether, **45** has much improved Bcl-xL activity compared to the ether analogue **46**, suggesting a key binding interaction with the protein in this binding pocket.

In conclusion we have identified a series of phenylpyrazoles with high binding affinity to Bcl-2 and Bcl-xL. These small molecules have a novel mode of binding and with the appropriate functionality display selectivity for Bcl-2 over Bcl-xL. Access to a small molecule that specifically blocks Bcl-2 function would be of value

Table 4
Phenyl substituents.



Compound	R ¹	R ²	R ³	Bcl-2 16mer IC ₅₀ (μM)	Bcl-2 26mer IC ₅₀ (μM)	Bcl-xL 26mer IC ₅₀ (μM)
37	Cl	H	–NH ₂	0.09	0.70	7.99
38	Cl	H	–NHCOPh	0.81	5.66	7% @ 30 μM
39	Cl	H	–NHCOCH ₂ Ph	0.04	0.27	2.37
40	Cl	H	–NHCOCH ₂ OPh	0.04	0.13	2.38
41	Cl	H	–NHSO ₂ CH ₂ Ph	0.250	3.15	19% @ 10 μM
43	H	H	–OCH ₂ COPh	0.02	0.33	3.24
44	H	H	–OCH ₂ CO ₂ H	0.01	0.13	5.64
45	H	H	NHCOCH ₂ SPh		0.60	0.40
46	H	H	NHCOCH ₂ OPh		0.51	3.05
8	Cl	CH ₂ NH ₂	–NH ₂		0.38	6.16
42	Cl	CH ₂ NH ₂	–NHCOCH ₂ OPh		0.03	0.808
47	Cl	CH ₂ NH ₂	NHCH ₂ (4-pyridyl)		0.65	17% @ 30 μM

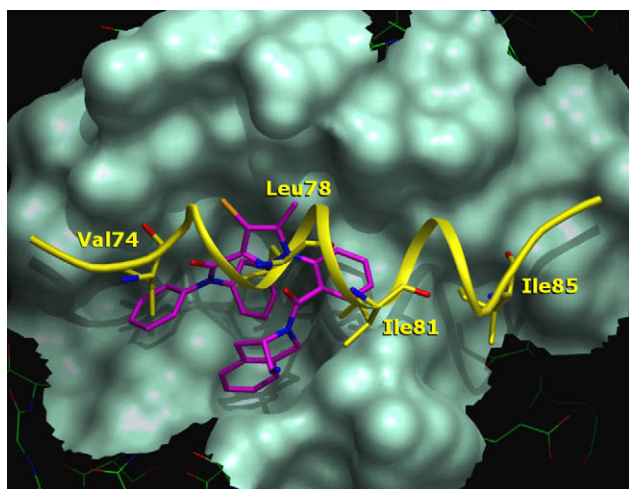


Figure 1. X-ray crystal structure of **31** (magenta) in Bcl-2/Bcl-xL. The BH3 binding cleft of the protein is represented as a cyan Connolly surface, with the ‘second-site’ (Ile85) binding pocket on the right. The 16-mer Bak peptide (PDB ID: 1BXL) shown as a yellow helix is aligned to the structure. Bak residues involved in binding to the hydrophobic cleft (I to R: I, I + 4, I + 7, and I + 11) are also shown in yellow.

in revealing the individual roles of this family of anti-apoptotic proteins, particularly as blockade of Bcl-xL has been associated with an apoptosis-like response in platelets that is distinct from platelet activation and results in enhanced clearance of platelets in vivo by the reticuloendothelial system.¹⁶ Solution of the X-ray crystal structure of chimaeric Bcl-2/Bcl-xL with a phenylpyrazole ligand has identified key areas for further optimisation. Inhibitor profiling in cell assays either by themselves or in combination with cytotoxics will be reported elsewhere.¹⁷

References and notes

- (a) Youle, R. J.; Strasser, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 47; (b) Cory, S.; Adams, J. M. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 647.
- Berghella, A. M.; Pellegrini, P.; Contasta, I.; Del Beato, T.; Adomo, D. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1998**, *13*, 225.
- Chipuk, J. E.; Green, D. R. *Trends Cell Biol.* **2008**, *18*, 157.
- (a) Petros, A. M.; Medek, A.; Nettesheim, D. G.; Kim, D. H.; Yoon, H. S.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Oltsdorf, T.; Fesik, S. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 3012; (b) Muchmore, S. W.; Sattler, M.; Liang, H.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Yoon, H. S.; Nettesheim, D.; Chang, B. S.; Thompson, C. B.; Wong, S.-L.; Ng, S.-C.; Fesik, S. W. *Nature* **1996**, *381*, 335; (c) Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. *Science* **1997**, *275*, 983; (d) Petros, A. M.; Nettesheim, D. G.; Wang, Y.; Olenjiczak, E. T.; Meadows, R. P.; Mack, J.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Zhang, H.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2528.
- Huang, Z. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1059.
- (a) Oltsdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.-C.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H. *Nature* **2005**, *435*, 677; (b) Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; Smith, B. J.; Deshayes, K.; Zobel, K.; Colman, P. M.; Fairlie, W. D. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1711.
- Stauffer, S. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *7*, 961.
- (a) Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S. K.; Xiao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3421; (b) Park, C.-M.; Bruncko, M.; Adickes, J.; Bauch, J.; Ding, H.; Kunzer, A.; Marsh, K. C.; Nimmer, P.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; Tahir, S. K.; Tse, C.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6902.
- Stephenson, E. F. M. *Org. Syn. Coll. Vol.* **1966**, *3*, 475.
- Page, D.; Naismith, A.; Schmidt, R.; Coupal, M.; Labarre, M.; Gosselin, M.; Bellemare, D.; Payza, K.; Brown, W. J. *Med. Chem.* **2001**, *44*, 2387.
- Nose, A.; Kudo, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1529.
- HTRF-LANCE assays detected interactions of Bcl-2 proteins expressed as GST-fusion proteins and a biotinylated 16- or 26-mer BH3 peptides. Interactions were detected using europium-conjugated anti-GST antibody and APC-labelled streptavidin (Perkin Elmer) using a Wallac Victor 2 plate reader.
- Malhotra, S. K.; Johnson, F. *Chem. Commun.* **1968**, *19*, 1149.
- Crystallisation and solution of structure performed by Sareum Ltd, 2 Iconix Park, Pampisford, Cambridge, CB22 3EG, United Kingdom, <http://www.sareum.co.uk>. Crystallographic data for the structure in this paper have been deposited with the PDB.
- Bruncko, M.; Oost, T. K.; Belli, B.; Ding, H.; Joseph, M. K.; Kunzer, A. R.; Martineau, D.; McClellan, W. J.; Mitten, M. J.; Ng, S.-C.; Nimmer, P. M.; Oltsdorf, T.; Park, C.-M.; Petros, A. M.; Shoemaker, A. R.; Song, X.; Wang, X.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 641.
- Zhang, H.; Nimmer, P. M.; Tahir, S. K.; Chen, J.; Fryer, R. M.; Hahn, K. R.; Iciek, L. A.; Morgan, S. J.; Nasarre, M. C.; Nelson, R.; Preusser, L. C.; Reinhart, G. A.; Smith, M. L.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W.; Tse, C. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 943.
- Payne, A.; Porter, J.; Watkins, C.; Edwards, C.; Ford, D.; de Candole, B.; Hutchinson, B.; Turner, J.; Lemmens, I.; Tavernier, J.; Davis, J.; Stubberfield, C.; *Abstracts of Papers, Molecular Targets and Cancer Therapeutics EORTC-AACR-NCI, San Francisco, CA, October 22–26, 2007*; B297.