Carrera 13A N° 89 - 38
Edificio Nippon Center ,Oficina 539
Conmutador: (57 1) 483 85 62
Bogotá D.C., Colombia.
www.estrategiajuridica.net

Estrategia Juridica

Bogotá D.C., 16 de septiembre de 2016

Superintendencia de Industria y Comercio
Radicado: 14155949 Folios: 193
Dependencia: Paten Fecha: 2016-09-16 15:10:56
Tipo aplicación: Respuesta a requerimiento
JV

Doctor
JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Dirección de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Ciudad

Expediente	14 ~~15~~ - 155949
Patente	NUEVOS DERIVADOS DE INDOLIZINA, SU PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN
Solicitante	LES LABORATORIES SERVIER VERNALIS (R&D) LTD
Asunto	**RESPUESTA AL OFICIO 7203 DEL 15 DE JUNIO DE 2016**

CLAUDETTE VERNOT HERNÁNDEZ, mayor de edad, identificada con la cédula de ciudadanía No. 51.722.517 expedida en Bogotá, portadora de la tarjeta profesional No. 57.111 del Consejo Superior de la Judicatura, actuando en calidad de apoderada de LES LABORATORIES SERVIER y VERNALIS (R&D) LTD, conforme a los poderes que obran en el expediente, por medio del presente escrito y encontrándome dentro del término concedido, me dirijo a usted para dar respuesta al requerimiento efectuado mediante Oficio 7203 del 15 de junio de 2016, notificado mediante fijación en lista el día 21 de junio de 2016.

I. RESPUESTA A LOS REQUERIMIENTOS

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

El examinador considera que el uso de las reivindicaciones 12 – 19 y 22 a 24 no es patentable, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión Andina 486.

Razón por la cual se ha decidido eliminar las reivindicaciones 12-19 y 22-24 que se relacionan con usos terapéuticos específicos de los compuestos de la invención.

- **Titulo**

El examinador considera que el título de la solicitud es 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.

Manifiesta que el objeto de la solicitud se refiere a compuestos derivados de 3 – [(2 – (2 – aminometil isoquinolin – 3 – il) carbonilfenil] indolizina – 1 – carboxamida., y sugiere modificar el título de la solicitud, de tal forma que mencione de manera detallada los compuestos obtenidos en la misma.

Por lo anterior, proponemos modificar el título de la siguiente manera:

"Nuevos derivados de 3-(2-{[3-(aminometil)-3, 4-dihidroisoquinolina-2 (1H)-il] carbonil] fenil) - 5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida, método de preparación de los mismos y composiciones farmacéuticas que los contienen ".

- **Reivindicaciones**

Reivindicación 1

El Examinador considera que 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. 2

En relación con este punto no estamos de acuerdo con la apreciación del Examinador.

En primer lugar, el Examinador señaló las denominaciones químicas genéricas tales como "(C1-C6) alquilo", así como las definiciones generales de "arilo", "heteroarilo" y "cicloalquilo" detalladas en la reivindicación 1.

Con respecto a "(C1-C6) alquilo", este término se refiere a un radical básico en química orgánica. Su definición y significado es inequívocamente comprensible por el experto en la técnica, es decir, un Químico.

Basándonos en nuestra experiencia, la definición del término "cicloalquilo" es clásica y totalmente aceptable. Este término abarca grupos carbocíclicos mono- o bi- cíclicos que contienen de 4 a 10 miembros de anillo los cuales son no aromáticos (véase por ejemplo el ejemplo 29, en el que R3 representa un 2,3-dihidro-1H-inden-5-il). Esta definición es clara y distinta de la definición de "arilo", en donde se listan solamente los grupos carbocíclicos aromáticos.

Nos gustaría hacer énfasis en que la definición del término "cicloalquilo" en la descripción tiene por objeto limitar con precisión el alcance de las reivindicaciones para las cuales se busca protección con el fin de evitar problemas de interpretación basados en literatura científica general. Lo mismo aplica para las definiciones de los términos "arilo" y "heteroarilo".

- *Con respecto al grupo Het:*

Creemos que la objeción del examinador no está fundada ya que una amplia variedad de grupos Het han sido ejemplificadas. Para la mayoría de los compuestos, Het representa un anillo de 6 miembros, pero los ejemplos para los cuales Het representa un anillo de 5 miembros también están disponibles (véase, por ejemplo, Ejemplos 76-77, 96), así como ejemplos para los cuales Het representa un anillo de 7 miembros (véanse los Ejemplos 83-84). Además del nitrógeno representado por X o por Y, otros heteroátomos han sido introducido en el grupo Het (véase, por ejemplo, ejemplos 73-75 en donde el heteroátomo adicional es un nitrógeno o ejemplos 78-82, 86, 98-99, 101 en donde el heteroátomo adicional es un oxígeno).

Para la mayoría de los ejemplos, Het es no aromático, pero también puede ser aromático (véanse los ejemplos 56 a 71, en donde Het representa un fenilo fusionado o los ejemplos 120-121, en donde Het representa una piridina fusionada).

Por último, el nitrógeno adicional del grupo Het u otros miembros del anillo puede ser sustituido (véase, por ejemplo, ejemplos 72-73, 102, 106, 113).

Por lo tanto, creemos que el grupo Het está soportado razonablemente por la descripción. La definición de Het, así como sus posibles sustituyentes, es una generalización razonable de las estructuras de los ejemplos para los cuales se ha demostrado una actividad en la especificación.

3

- *Con respecto a las definiciones de los grupos R_a, R_b, R_c, y R_d:*

Hemos restringido el alcance de las definiciones inicialmente mencionadas en la reivindicación 1 (véase el conjunto de reivindicaciones modificado) con el fin de ajustarse de cerca a la estructura de los compuestos ejemplificados.

- *Con respecto a los grupos R_1 y R_2:*

La definición de estos grupos es clara y acorde con las estructuras de los compuestos divulgados en la descripción. Los ejemplos en donde R_1 y R_2 son grupos alquilo han sido divulgados (véanse los ejemplos 52, 108, 110, 146).

Muchos ejemplos en donde R_1 y R_2 forman, junto con el átomo de nitrógeno que los porta, un heterocicloalquilo han sido descritos. Con respecto al heterocicloalquilo resultante, todos los tamaños de anillo han sido explorados:

(i) ejemplos 156-157 presentan cuatro miembros en el anillo;
(ii) los ejemplos 149 y 153 presentan cinco miembros en el anillo;
(iii) la mayoría de los ejemplos presentan seis miembros en el anillo ya que R_1 y R_2 forman, con el átomo de nitrógeno que los porta, una morfolina, una tiomorfolina (ejemplo 147) o una piperazina;
(iv) Los ejemplos 14 y 46 presentan siete miembros en el anillo.

Por último, además del átomo de nitrógeno, varios heteroátomos han sido introducidos en el núcleo del grupo heterocicloalquilo (ver oxígeno, nitrógeno, SO_2 en las estructuras representadas anteriormente). Además, se han explorado variados sustituyentes en el grupo heterocicloalquilo (véanse los ejemplos 15-17, 105, 107, 123, 127-128, 149).

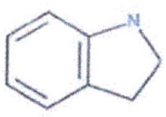
En conclusión, la definición de R_1 y R_2, así como sus posibles sustituyentes, es una generalización razonable de las estructuras de los ejemplos para los cuales se ha demostrado una actividad en la especificación.

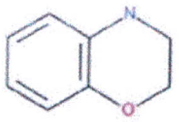
- *Con respecto al grupo R_3:*

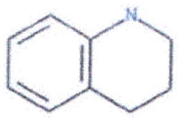
Con excepción del grupo (C_2-C_6) alquenilo, todos los posibles grupos mencionados en la definición de R_3 han sido ilustrados por medio de los ejemplos divulgados en la especificación. Más precisamente:

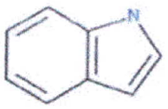
(i) R_3 representa un grupo alquilo en los ejemplos 87 - 88;
(ii) R_3 representa un grupo alquinilo en el ejemplo 138;
(iii) R_3 representa un cicloalquilo en el ejemplo 29 (es decir, un grupo carbocíclico no aromático bicíclico);
(iv) R_3 representa un grupo (C_4-C_{10}) cicloalquilo - (C_1-C_6) alquilo en los ejemplos 133 y 136;
(v) R_3 representa un grupo arilo (opcionalmente sustituido) en los ejemplos 1-6, etc;
(vi) en la mayoría de los casos, R_3 representa un grupo heteroarilo tal como se define en la reivindicación 1, es decir, un grupo mono o bicíclico compuesto por de 5 a 10 miembros

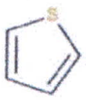
en el anillo, que tiene al menos un residuo aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos. Más específicamente, R_3 puede representar:

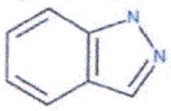

ejemplos 8, 9 etc


ejemplos 27, 41

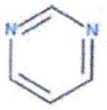

ejemplo 26


ejemplos 7, 10 etc

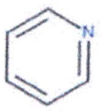

ejemplo 85

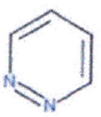

ejemplo 50


ejemplo 151, 154


ejemplo 155

4


ejemplos 139, 142, 145


ejemplo 140

Por lo tanto, varios tipos de anillos de heteroarilo han sido probados (monocíclico o bicíclico, incluyendo heteroátomos N, O o S...).

En conclusión, la definición de R_3 es una generalización razonable de las estructuras de los ejemplos para los cuales se ha demostrado una actividad en la especificación.

- *Con respecto al grupo R_4:*

También aceptamos limitar significativamente la definición de R_4 con base en la estructura de los compuestos ejemplificados (véase el conjunto de reivindicaciones modificado).

Reivindicaciones 20 y 21

Considera el Examinador que las reivindicaciones 20 y 21 no son claras porque el término "asociación" no es preciso 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.

No estamos de acuerdo.

Las terapias de combinación en oncología son probadas actualmente con el fin de mejorar la eficacia de los tratamientos, así como la calidad de vida de los pacientes (ver Komarova et al Nature 2013 291; Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005 1059: 61-69). Tales estrategias terapéuticas son operaciones de rutina para los médicos clínicos en oncología.

Por lo tanto, la combinación de las reivindicaciones 20 y 21 son realizaciones específicas de la invención. Como estas combinaciones genéricas y la correspondiente Markush de fórmula (I) se reivindican en la misma solicitud de patente, no hay necesidad de probar ningún efecto sinérgico en el presente caso.

La patentabilidad de las combinaciones es evaluada a partir de la patentabilidad de los compuestos de fórmula (I); estos deben ser considerados como nuevos e inventivos con base en el hecho que los compuestos de fórmula (I) son nuevos e inventivos.

En aras de claridad, sugerimos reemplazar el término "asociación" con el término "combinación farmacéutica" en las reivindicaciones 20-21.

- **Descripción**

Considera el Examinador que la descripción de la solicitud no divulga la invención de manera suficientemente completa para que 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.

Por lo anterior, proponemos remplazar el término "asociación" con el término "combinación farmacéutica" en donde sea apropiado en la descripción.

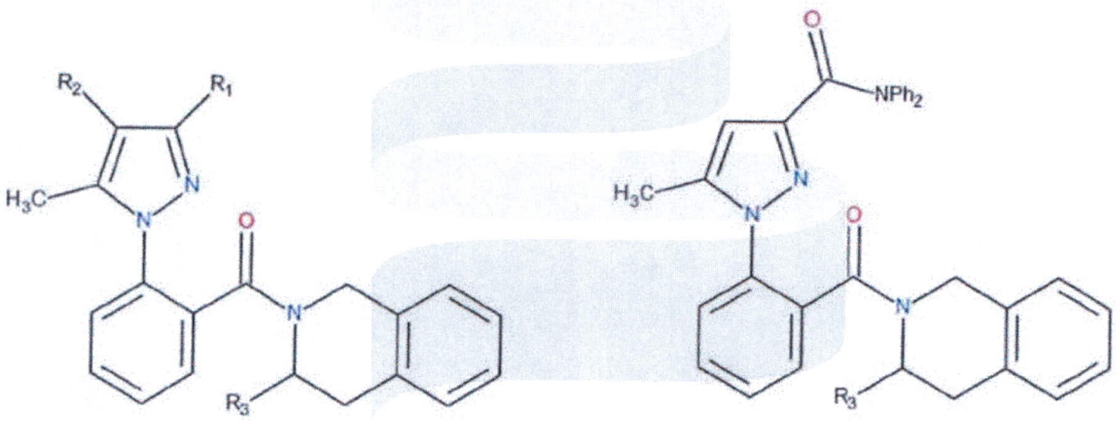
5

- **Examen de patentabilidad**

El Examinador considera que la reivindicación 1, carece de Nivel Inventivo, de acuerdo a lo divulgado en los documentos D1 y D2 y las reivindicaciones 2 a 8, 11, 20 y 21 dependientes de la reivindicación 1, también carecen de Nivel Inventivo.

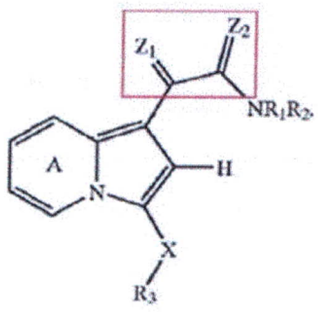
Con respecto a D1

Este documento divulga derivados de 1-(2- [1,2, 3, 4-tetraisoquinolinil carbonil] fenil) -1 *H*-pirazol, así como su actividad farmacológica como inhibidores selectivos de la proteína Bcl-2



Con respecto a D2

Este documento divulga las siguientes estructuras químicas, así como su actividad anti-cáncer



(I)

en donde X puede representar un grupo carboxi, R_3 representa un grupo arilo opcionalmente sustituido, y Z_1 y Z_2 representan independientemente un grupo seleccionado de: =0, =S, =N-OR_{12}, y =NR_{12}.

D1 es considerado como el documento más cercano de la técnica anterior. Los compuestos de la invención presentan un núcleo central de tipo indolizina el cual permite distinguirlos de los compuestos divulgados en D1. Esta diferencia estructural es crucial ya que los compuestos resultantes son significativamente mucho más potentes sobre el Bcl-2 objetivo (IC_{50} son al menos 10 veces más bajos para los compuestos de la invención frente a los compuestos de D1).

No estamos de acuerdo con la apreciación del Examinador al afirmar que los compuestos de la presente invención son anticipados por la divulgación de D1+D2.

6

Teniendo en cuenta el conocimiento técnico de D2, la persona experta en la técnica llegaría a la conclusión que el fragmento -(C=Z_1)-(C=Z_2) es crucial para la actividad farmacológica de los compuestos descritos en D2. Además, el fragmento 1,2,3,4-tetraisoquinolin il carbonil no se describe como un posible sustituyente del grupo arilo (R_3) en D2 (véase el párrafo [0042]).

Por lo tanto, los compuestos de D2 muestran al menos dos características esenciales con respecto a los compuestos de la invención. La persona experta en la técnica no puede derivar la Markush de la invención mediante la combinación de fragmentos de D1 y D2 citados por el Examinador. Nada en D2 sugiere que el fragmento de indolizina pueda ser incorporado con éxito en la fórmula química de D1, mientras que se reemplazan selectivamente el fragmento -(C=Z_1) - (C=Z_2)- por un fragmento –C = O.

Considerando estos argumentos, el conocimiento químico divulgado en D1+D2 es útil al verlo en retrospectiva, pero no es obvio el utilizar este conocimiento cuando se examinan estructuras químicas alternativas para el diseño de inhibidores potentes Bcl-2. La combinación especifica de fragmentos de carboxamida + indolizina-fenilo + tetraisoquinolinacarbonilo como se define en la fórmula general (I) de la invención es original.

Los compuestos de la invención son el resultado de un programa intensivo de investigación con el fin de concebir inhibidores de Bcl-2 potentes y selectivos como se describe en la presente solicitud de patente. Por lo tanto, estos, de forma inequívoca, cumplen con el requisito de nivel inventivo.

Consideramos que los argumentos y modificaciones expuestas a lo largo del presente escrito permitirán superar las objeciones presentadas por el examinador.

Por favor, tenga en cuenta que el caso correspondiente ha sido otorgado sin ninguna modificación en los Estados Unidos de América (véase el documento US 9,120,791 B2).

Las reivindicaciones correspondientes también han sido permitidas en Europa (patente a ser concedida en un futuro cercano).

II. MODIFICACIÓN VOLUNTARIA

Se agrega una nueva reivindicación dependiente al conjunto de reivindicaciones (ver conjunto modificado de reivindicaciones):

9. Sal clorhidrato de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

La mayoría de los compuestos descritos específicamente en el presente caso se han obtenido y caracterizado en la forma de una sal de adición. La sal clorhidrato es incluso más preferida. Por lo tanto, esta nueva reivindicación está bien soportada de forma inequívoca en la descripción.

III. ANEXOS

1. Nuevo capítulo de Reivindicaciones.
2. Nuevo capítulo de Reivindicaciones con control de cambios en donde se evidencian las modificaciones realizadas.
3. Artículo titulado: "Calculated treatment" – Natalia L. Komarova. 7
4. Artículo titulado "Preclinical Modeling of Combination Treatments: Fantasy or Requirement?" – Shannon Decker and Edward Sausville.
5. Documento Patente US 9,120,791 B2

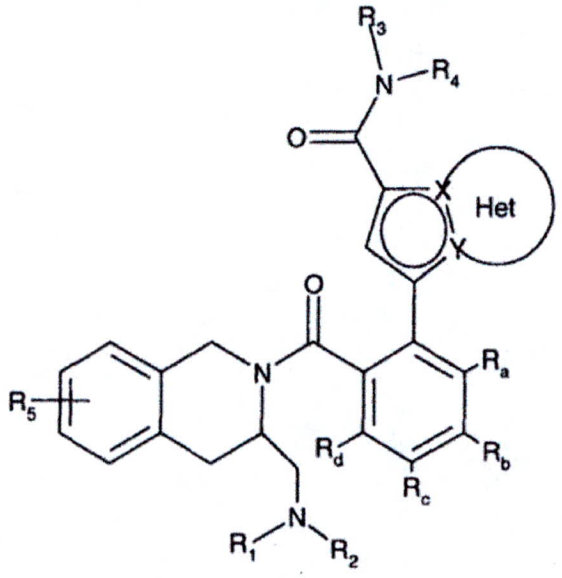
Atentamente,

Claudette Vernot Hernández
C.C. No. 51.722.517 de Bogotá.
T.P. No. 57.111 del C.S de la J.

ANEXO 1

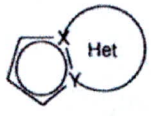
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

- X e Y representan un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, entendiéndose que estos no pueden representar simultáneamente dos átomos de carbono o dos átomos de nitrógeno,
- la parte Het del grupo 

representa un ciclo opcionalmente sustituido, aromático o no aromático, constituido por 5, 6 ó 7 miembros de anillo, y que puede contener, además del nitrógeno representado por X o por Y, de uno a 3 heteroátomos elegidos independientemente de entre oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
- R_1 y R_2 representan independientemente el uno del otro un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
  o bien R_1 y R_2 forman con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un heterocicloalquilo constituido por 4 a 7 miembros de anillo y que puede contener,

además del átomo de nitrógeno, otro heteroátomo elegido entre oxígeno, azufre, SO_2 y NR en el que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo alquil(C_1-C_6)sulfonilo, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,

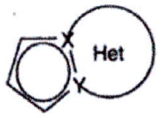
- R_3 representa un grupo alquilo (C1-C6) lineal o ramificado, un grupo alquinilo (C_2-C_6), un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo(C_4-C_{10}) alquilo (C_1-C_6) en donde el grupo alquilo puede ser lineal o ramificado, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- R_4 representa un grupo fenilo, un priminidinil, un ciclohexil o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
- R_5 representa un átomo de hidrógeno o un atomo de halógeno,
- R_a y R_d cada uno representan un atomo de hidrogeno
- ~~R_a~~ R_b, y R_c representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo trifluorometoxi,

o los sustituyentes del par, (R_b,R_c) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un ciclo constituido por 5 a 7 miembros de anillo, que puede contener de uno a 3 heteroátomos elegidos de entre oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, entendiéndose también que uno o varios átomos de carbono del ciclo definido anteriormente puede(n) estar deuterado(s),

entendiéndose que:

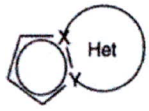
- por "arilo", se entiende un grupo fenilo, naftilo, bifenilo o indenilo,
- por "heteroarilo", se entiende cualquier grupo mono o bicíclico constituido por 5 a 10 miembros de anillo, que posee al menos una parte aromática y que contiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre oxígeno, azufre y nitrógeno,
- por "cicloalquilo", se entiende cualquier grupo carbocíclico no aromático, mono o bicíclico, que contiene de 4 a 10 miembros de anillo,

los grupos alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así definidos pueden estar sustituidos con 1 a 3 grupos elegidos de entre alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, espiro (C_3-C_6), alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado, alquil(C_1-C_6)-S-, hidroxi, oxo (o *N-óxido* llegado el caso), nitro, ciano, -COOR', NR'R'', polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, trifluorometoxi, alquil(C_1-C_6)sulfonilo o halógeno, entendiéndose que R' y R'' representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,

pudiendo estar la parte Het del grupo 

definido anteriormente sustituida con un grupo elegido entre alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, hidroxi, $NR_1'R_1''$, y halógeno, entendiéndose que R_1' y R_1'' tienen las mismas definiciones que los grupos R' y R'' mencionados anteriormente,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.



2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que el grupo representa uno de los grupos siguientes: 5,6,7,8-tetrahidroindolizina sustituida opcionalmente con un hidroxi, indolizina, 1,2,3,4-tetrahidropirrolo[1,2-*a*]pirazina, 3,4-dihidropirrolo[1,2-*a*]pirazina-2(1*H*)-carboxilato de terc-butilo, 3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina, 2,3-dihidro-1*H*-pirrolizina sustituida opcionalmente con un hidroxi, 6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirrolo[1,2-*a*]azepina o pirrolo[1,2-*a*]pirazina.

3. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_1 y R_2 representan cada uno un grupo alquilo sustituido opcionalmente con un metoxi, o bien R_1 y R_2 forman con el átomo de nitrógeno al que están unidos un heterocicloalquilo elegido entre los grupos siguientes: morfolino sustituido opcionalmente con uno o varios alquilo(s) (C_1-C_6) lineal(es) o ramificado(s), óxidomorfolino, tiomorfolino 1,1-dióxido, 1,4-oxazepán, 3-metoxipirrolidina, 3,3-difluoropirrolidina, 3-metoxiazetidina, 3-fluoroazetidina, oxopiperazina o piperazina, estando sustituidos los dos últimos grupos con un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo metilsulfonilo.

4. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_a y R_d representan cada uno un átomo de hidrógeno y (R_b, R_c) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un grupo 1,3-dioxolano en el que uno de los átomos de carbono está deuterado opcionalmente, un grupo 1,4-dioxano, un grupo 1,4-dioxepano, o bien R_a, R_c y R_d representan cada uno un átomo de hidrógeno y R_b representa un halógeno, un metilo, un metoxi, un etoxi, un trifluorometilo o un trifluorometoxi.

5. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_4 representa un grupo 4-hidroxifenilo, un grupo 3-fluoro-4-hidroxifenilo ó un grupo 5-hidroxipirimidina.

6. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_3 representa un grupo elegido de entre fenilo, indol, indolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina, indano, 1*H*-indazol, 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina, pirimidina, ciclobutilmetilo, ciclopropilmetilo, 1*H*-pirazol, piridina, piridazina, conteniendo estos grupos opcionalmente uno o más sustituyentes elegidos de entre halógeno, alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, ciano y alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado.

7. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 elegido de entre el grupo siguiente:

- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil }-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-{2,2-dideuterio-6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{7-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,

- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- *N*-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,
- 6-{5-cloro-2-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-8-carboxamida,
- 3-(5-cloro-2-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}fenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,
- *N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- N-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,
- 6-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-fenil-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*]-[1,4]oxazina-8-carboxamida,

- *N*-(3-fluorofenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

8. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 elegido de entre el grupo siguiente:

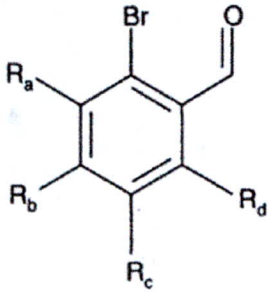
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*) isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-{2,2-dideuterio-6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{7-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- N-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*) isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,

- 6-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo-[2,1-*c*][1,4]oxazina-8-carboxamida,
- 3-(5-cloro-2-{[(3S)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*) il]carbonil}fenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

9. Sal clorhidrato de un compuesto de formula (I) de acuerdo a las reivindicaciones 7-8.

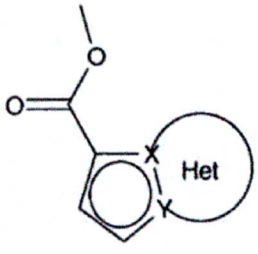
10. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 caracterizado porque se utiliza como producto de partida el compuesto de fórmula (II):



(II)

en la que R_a, R_b, R_c y R_d son tales como se han definido en la fórmula (I),

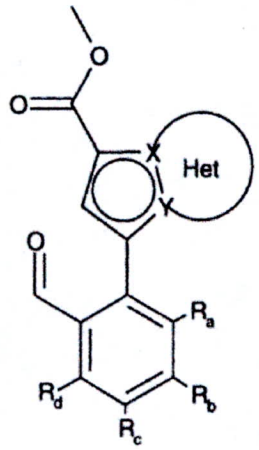
compuesto de fórmula (II) que se somete a una reacción de Heck, en medio acuoso u orgánico, en presencia de un catalizador de paladio, de una base, de una fosfina y del compuesto de fórmula (III):



(III)

en la que los grupos X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),

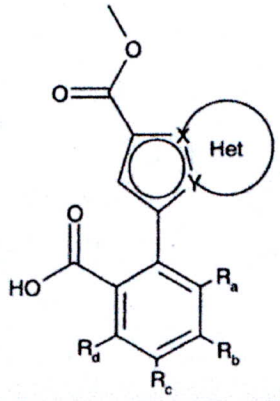
para obtener el compuesto de fórmula (IV):



(IV)

en la que R_a, R_b, R_c, R_d, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (1),

compuesto de fórmula (IV) cuya función aldehído se oxida en ácido carboxílico para formar el compuesto de fórmula (V):



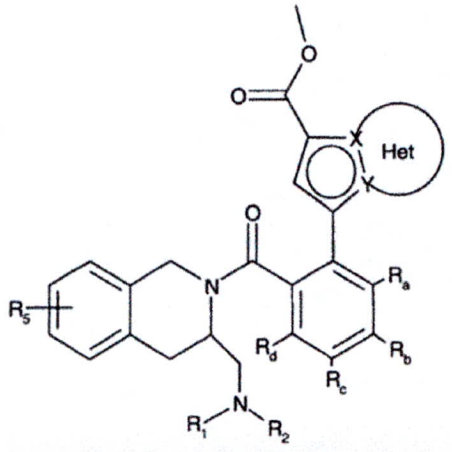
(V)

en la que R_a, R_b, R_c, R_d, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),
compuesto de fórmula (V) que es sometido a un acoplamiento peptídico con un compuesto de fórmula (VI):



(VI)

en la que R_1, R_2, y R_5 son tales como se han definido en la fórmula (I),
para dar lugar al compuesto de fórmula (VII):



(VII)

en la que R_a, R_b, R_c, R_d, R_1, R_2, R_5, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),

compuesto de fórmula (VII) cuya función éster se hidroliza para dar lugar al ácido carboxílico o al carboxilato correspondiente, el cual puede convertirse en un derivado de ácido tal como el cloruro de acilo o el anhídrido correspondiente, antes de acoplarse con una amina NHR_3R_4, en la que R_3 y R_4 tienen el mismo significado que en la fórmula (I), para dar lugar al compuesto de fórmula (I),
compuesto de fórmula (1) puede purificarse según una técnica clásica de separación, que se transforma, si se desea, en sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable y del que se separan opcionalmente los isómeros según una técnica clásica de separación,

y se entiende que en cualquier momento que se considere oportuno, durante el procedimiento precedentemente descrito, determinados grupos (hidroxi, amino ...) de los reactivos iniciales o de los intermedios de síntesis pueden ser protegidos y subsecuentemente desprotegidos, conforme a las necesidades de la síntesis.

11. Procedimiento de preparación según la reivindicación 10 de un compuesto de fórmula (I) en el que uno de los grupos R_3 o R_4 está sustituido con una función hidroxi caracterizado porque la amina NHR_3R_4 se somete previamente a una reacción de protección de la función hidroxi antes de cualquier acoplamiento con el ácido carboxílico

formado a partir del compuesto de fórmula (VII), o con uno de los derivados de ácido correspondiente, el compuesto de fórmula (I) protegido resultante experimenta subsecuentemente una reacción de desprotección y se convierte opcionalmente en una de sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

12. Composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una de sus sales de adición con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable en combinación con uno o mas excipientes farmacéuticamente aceptables.

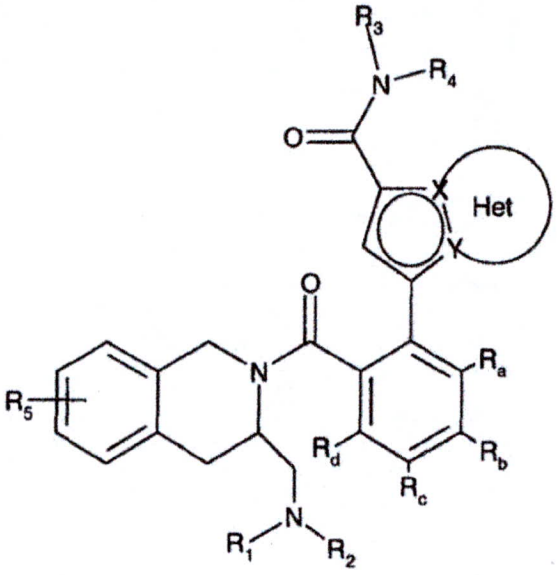
13. Combinación farmacéutica de un compuesto de fórmula (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 con un agente anticanceroso elegido entre los agentes genotóxicos, los venenos mitóticos, los anti-metabolitos, los inhibidores del proteasoma, los inhibidores de quinasas o los anticuerpos.

14. Composición farmacéutica que contiene la combinaciónsegún la reivindicación 13 en combinación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

ANEXO 2

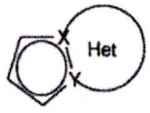
REIVINDICACIONES (versión con cambios resaltados)

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

- X e Y representan un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno, entendiéndose que estos no pueden representar simultáneamente dos átomos de carbono o dos átomos de nitrógeno,
- la parte Het del grupo 

representa un ciclo opcionalmente sustituido, aromático o no aromático, constituido por 5, 6 ó 7 miembros de anillo, y que puede contener, además del nitrógeno representado por X o por Y, de uno a 3 heteroátomos elegidos independientemente de entre oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
- R_1 y R_2 representan independientemente el uno del otro un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
  o bien R_1 y R_2 forman con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un heterocicloalquilo constituido por 4 a 7 miembros de anillo y que puede contener,

además del átomo de nitrógeno, otro heteroátomo elegido entre oxígeno, azufre, SO_2 y NR en el que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo alquil(C_1-C_6)sulfonilo, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,

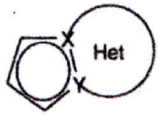
- R_3 representa un grupo alquilo (C1-C6) lineal o ramificado, ~~un grupo alquenilo (C_2-C_6),~~ un grupo alquinilo (C_2-C_6), un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo(C_4-C_{10}) alquilo (C_1-C_6) en donde el grupo alquilo puede ser lineal o ramificado, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- R_4 representa un grupo ~~arilo~~ fenilo, ~~heteroaril~~ un priminidinil, un ciclohexil ~~cicloalquilo~~ o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,
- R_5 representa un átomo de hidrógeno o un atomo de halógeno,
- R_a y R_d cada uno representan un atomo de hidrogeno
- ~~R_a~~ R_b, y R_c ~~y R_d~~ representan ~~independientemente los unos de los otros~~ un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo hidroxi, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo trifluorometoxi,

o los sustituyentes ~~de una de las parejas~~ del par ~~(R_a,R_b)~~, (R_b,R_c) ~~o (R_c,R_d)~~ forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un ciclo constituido por 5 a 7 miembros de anillo, que puede contener de uno a 3 heteroátomos elegidos de entre oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo -C(O)-O-Alk en el que Alk es un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, entendiéndose también que uno o varios átomos de carbono del ciclo definido anteriormente puede(n) estar deuterado(s),

entendiéndose que:

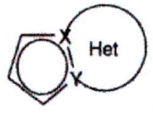
- por "arilo", se entiende un grupo fenilo, naftilo, bifenilo o indenilo,
- por "heteroarilo", se entiende cualquier grupo mono o bicíclico constituido por 5 a 10 miembros de anillo, que posee al menos una parte aromática y que contiene de 1 a 3 heteroátomos elegidos entre oxígeno, azufre y nitrógeno,
- por "cicloalquilo", se entiende cualquier grupo carbocíclico no aromático, mono o bicíclico, que contiene de 4 a 10 miembros de anillo,

los grupos alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así definidos pueden estar sustituidos con 1 a 3 grupos elegidos de entre alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, espiro (C_3-C_6), alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado, alquil(C_1-C_6)-S-, hidroxi, oxo (o *N-óxido* llegado el caso), nitro, ciano, -COOR', NR'R'', polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, trifluorometoxi, alquil(C_1-C_6)sulfonilo o halógeno, entendiéndose que R' y R'' representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado,

pudiendo estar la parte Het del grupo 

definido anteriormente sustituida con un grupo elegido entre alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, hidroxi, $NR_1'R_1''$, y halógeno, entendiéndose que R_1' y R_1'' tienen las mismas definiciones que los grupos R' y R'' mencionados anteriormente,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que el grupo 

representa uno de los grupos siguientes: 5,6,7,8-tetrahidroindolizina sustituida opcionalmente con un hidroxi, indolizina, 1,2,3,4-tetrahidropirrolo[1,2-*a*]pirazina, 3,4-dihidropirrolo[1,2-*a*]pirazina-2(1*H*)-carboxilato de terc-butilo, 3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-c][1,4]oxazina, 2,3-dihidro-1*H*-pirrolizina sustituida opcionalmente con un hidroxi, 6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-pirrolo[1,2-*a*]azepina o pirrolo[1,2-*a*]pirazina.

3. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_1 y R_2 representan cada uno un grupo alquilo sustituido opcionalmente con un metoxi, o bien R_1 y R_2 forman con el átomo de nitrógeno al que están unidos un heterocicloalquilo elegido entre los grupos siguientes: morfolino sustituido opcionalmente con uno o varios alquilo(s) (C_1-C_6) lineal(es) o ramificado(s), óxidomorfolino, tiomorfolino 1,1-dióxido, 1,4-oxazepán, 3-metoxipirrolidina, 3,3-difluoropirrolidina, 3-metoxiazetidina, 3-fluoroazetidina, oxopiperazina o piperazina, estando sustituidos los dos últimos grupos con un grupo

alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, un grupo polihalógenoalquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo metilsulfonilo.

4. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_a y R_d representan cada uno un átomo de hidrógeno y (R_b, R_c) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un grupo 1,3-dioxolano en el que uno de los átomos de carbono está deuterado opcionalmente, un grupo 1,4-dioxano, un grupo 1,4-dioxepano, o bien R_a, R_c y R_d representan cada uno un átomo de hidrógeno y R_b representa un halógeno, un metilo, un metoxi, un etoxi, un trifluorometilo o un trifluorometoxi.

5. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_4 representa un grupo 4-hidroxifenilo, un grupo 3-fluoro-4-hidroxifenilo ó un grupo 5-hidroxipirimidina.

6. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que R_3 representa un grupo elegido de entre fenilo, indol, indolina, 1,2,3,4-tetrahidroquinolina, 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina, indano, 1*H*-indazol, 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina, pirimidina, ciclobutilmetilo, ciclopropilmetilo, 1*H*-pirazol, piridina, piridazina, conteniendo estos grupos opcionalmente uno o más sustituyentes elegidos de entre halógeno, alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, ciano y alcoxi (C_1-C_6) lineal o ramificado.

7. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 elegido de entre el grupo siguiente:

- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil }-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-{2,2-dideuterio-6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,

- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{7-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- *N*-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,
- 6-{5-cloro-2-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]oxazina-8-carboxamida,
- 3-(5-cloro-2-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}fenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,
- *N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- N-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3S)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-2,3-dihidro-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,

- 6-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-fenil-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*]-[1,4]oxazina-8-carboxamida,
- *N*-(3-fluorofenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

8. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 elegido de entre el grupo siguiente:

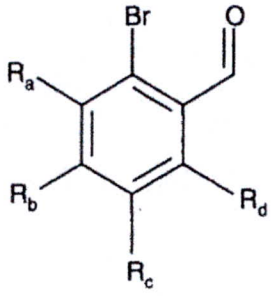
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*) isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-{2,2-dideuterio-6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indazol-5-il)-3-(6-{[(3*S*)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il]carbonil}-1,3-benzodioxol-5-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{7-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il}-*N*-fenil-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-1-indolizina carboxamida,
- N-[4-(hidroxi)fenil]-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-5,6,7,8-tetrahidro-1-indolizina carboxamida,
- *N*-(4-hidroxifenil)-3-{6-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)carbonil]-1,3-benzodioxol-5-il}-*N*-fenil-1-indolizina carboxamida,

- 3-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*) isoquinolinil)carbonil]fenil}-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-indol-5-il)-1-indolizina carboxamida,
- 6-{5-cloro-2-[((3*S*)-3-(4-morfolinilmetil)-3,4-dihidro-2(1*H*)-isoquinolinil)-carbonil]fenil}-*N*-(3-fluoro-4-metilfenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirrolo-[2,1-*c*][1,4]oxazina-8-carboxamida,
- 3-(5-cloro-2-{[(3S)-3-(morfolin-4-ilmetil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*) il]carbonil}fenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-5,6,7,8-tetrahidroindolizina-1-carboxamida,

sus enantiómeros y diastereoisómeros, así como sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

9. Sal clorhidrato de un compuesto de formula (I) de acuerdo a las reivindicaciones 7-8.

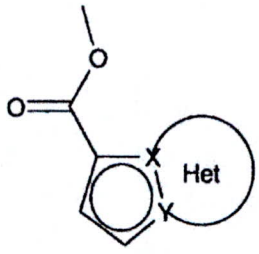
~~9.~~10. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 caracterizado porque se utiliza como producto de partida el compuesto de fórmula (II):



(II)

en la que R_a, R_b, R_c y R_d son tales como se han definido en la fórmula (I),

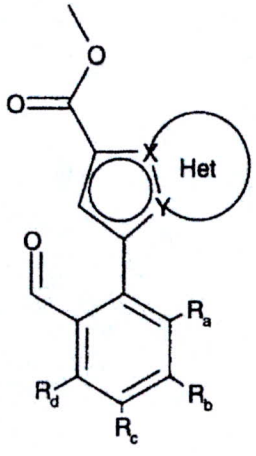
compuesto de fórmula (II) que se somete a una reacción de Heck, en medio acuoso u orgánico, en presencia de un catalizador de paladio, de una base, de una fosfina y del compuesto de fórmula (III):



(III)

en la que los grupos X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),

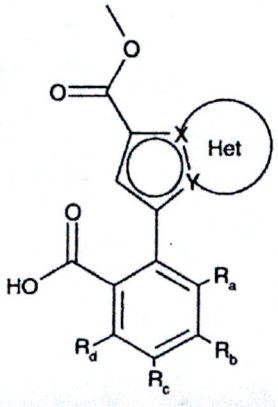
para obtener el compuesto de fórmula (IV):



(IV)

en la que R_a, R_b, R_c, R_d, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (1),

compuesto de fórmula (IV) cuya función aldehído se oxida en ácido carboxílico para formar el compuesto de fórmula (V):



(V)

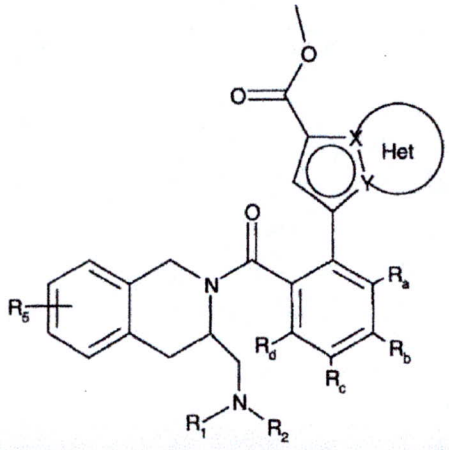
en la que R_a, R_b, R_c, R_d, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),

compuesto de fórmula (V) que es sometido a un acoplamiento peptídico con un compuesto de fórmula (VI):



(VI)

en la que R_1, R_2, y R_5 son tales como se han definido en la fórmula (I),
para dar lugar al compuesto de fórmula (VII):



(VII)

en la que R_a, R_b, R_c, R_d, R_1, R_2, R_5, X, Y y Het son tales como se han definido en la fórmula (I),

compuesto de fórmula (VII) cuya función éster se hidroliza para dar lugar al ácido carboxílico o al carboxilato correspondiente, el cual puede convertirse en un derivado de ácido tal como el cloruro de acilo o el anhídrido correspondiente, antes de acoplarse con una amina NHR_3R_4, en la que R_3 y R_4 tienen el mismo significado que en la fórmula (I), para dar lugar al compuesto de fórmula (I),
compuesto de fórmula (1) puede purificarse según una técnica clásica de separación, que se transforma, si se desea, en sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable y del que se separan opcionalmente los isómeros según una técnica clásica de separación,

y se entiende que en cualquier momento que se considere oportuno, durante el procedimiento precedentemente descrito, determinados grupos (hidroxi, amino ...) de los reactivos iniciales o de los intermedios de síntesis pueden ser protegidos y subsecuentemente desprotegidos, conforme a las necesidades de la síntesis.

~~10.~~11. Procedimiento de preparación según la reivindicación ~~9~~ 10 de un compuesto de fórmula (I) en el que uno de los grupos R_3 o R_4 está sustituido con una función hidroxi caracterizado porque la amina NHR_3R_4 se somete previamente a una reacción de protección de la función hidroxi antes de cualquier acoplamiento con el ácido carboxílico formado a partir del compuesto de fórmula (VII), o con uno de los derivados de ácido correspondiente, el compuesto de fórmula (I) protegido resultante experimenta subsecuentemente una reacción de desprotección y se convierte opcionalmente en una de sus sales de adición a un ácido o a una base farmacéuticamente aceptable.

~~11.~~12. Composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~8~~ 9 o una de sus sales de adición con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable en combinación con uno o mas excipientes farmacéuticamente aceptables.

~~12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su utilización como agente pro-apoptótico.~~

~~13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 útiles para su utilización en el tratamiento de los cánceres, de las enfermedades inmunitarias y auto-inmunes.~~

~~14. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 para su utilización en el tratamiento de los cánceres de la vejiga, del cerebro, de mama, del útero, de las leucemias linfoides crónicas, del cáncer colorrectal, de los cánceres del esófago, del hígado, de las leucemias linfoblásticas, de los linfomas foliculares, de los melanomas, de las hemopatías malignas, de los mielomas, del cáncer de ovario, del cáncer de pulmón de células no pequeñas, del cáncer de la próstata y del cáncer de pulmón de células pequeñas.~~

~~15. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento útil como agente pro-apoptótico.~~

~~16. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres, de las enfermedades inmunitarias y auto-inmunes.~~

~~17. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres de la vejiga, del cerebro, de mama, del útero, de las leucemias linfoides crónicas, del cáncer colorrectal, de los cánceres del esófago, del hígado, de las leucemias linfoblásticas, de los linfomas foliculares, de los melanomas, de las hemopatías malignas, de los mielomas, del cáncer de ovario, del cáncer de pulmón de células no pequeñas, del cáncer de la próstata y del cáncer de pulmón de células pequeñas.~~

~~18. Compuesto de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 8, o una de sus sales de adición con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable, para su utilización en el tratamiento de los cánceres de la vejiga, del cerebro, de mama, del útero, de las leucemias linfoides crónicas, del cáncer colorrectal, de los cánceres del esófago, del hígado, de las leucemias linfoblásticas, de los linfomas foliculares, de los melanomas, de las hemopatías malignas, de los mielomas, del cáncer de ovario, del cáncer de pulmón de células no pequeñas, del cáncer de la próstata y del cáncer de pulmón de células pequeñas.~~

~~19. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 8, o de una de sus sales de adición con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres de la vejiga, del cerebro, de mama, del útero, de las leucemias linfoides crónicas, del cáncer colorrectal, de los cánceres del esófago, del hígado, de las leucemias linfoblásticas, de los linfomas foliculares, de los melanomas, de las hemopatías malignas, de los mielomas, del cáncer de ovario, del cáncer de pulmón de células no pequeñas, del cáncer de la próstata y del cáncer de pulmón de células pequeñas.~~

~~20.~~ 13. ~~Asociación~~ Combinación farmacéutica de un compuesto de fórmula (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a ~~8~~ 9 con un agente anticanceroso elegido entre los agentes genotóxicos, los venenos mitóticos, los anti-metabolitos, los inhibidores del proteasoma, los inhibidores de quinasas o los anticuerpos.

~~21.~~14. Composición farmacéutica que contiene la ~~asociación~~ combinaciónsegún la reivindicación ~~20~~ 13 en combinación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

~~22. Asociación según la reivindicación 20 para su utilización en el tratamiento de los cánceres.~~

~~23. Utilización de una asociación según la reivindicación 20 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres.~~

~~24. Compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su utilización en asociación con una radioterapia en el tratamiento de los cánceres.~~

ANEXO 3

explored by comparing the rate of a process — such as the rate at which a particle will decay into other, lighter particles — with the rate of its CP-related process, in which all the initial and final particles are replaced with the corresponding antiparticles. If these rates are measured to be different, then a 'CP asymmetry' has been observed. Measurements of CP asymmetries are interesting for two reasons. First, they provide stringent tests of the standard model of particle physics. Second, they may provide hints that could point scientists in the direction of a solution to the mystery of the Universe's matter–antimatter imbalance.

Among the four known forces of nature — the standard model's weak, strong and electromagnetic forces, and the gravitational force — the weak force is the only one that distinguishes between matter and antimatter. But even the weak force would not do so if it were not that three quark particles exist for each of two charge types: the down, strange and bottom quarks, which have a charge that is minus one-third of the proton's charge; and the up, charm and top quarks, which have a charge that is two-thirds of the proton's charge. With three quarks of either charge, the weak force has a single coupling constant (a parameter that quantifies the force's strength), which is different for particles and antiparticles[2,3]. If, as the standard model predicts, all CP asymmetries are proportional to this single coupling constant, then the sizes of these asymmetries are correlated. By contrast, most theories that go beyond the standard model have many independent coupling constants that distinguish particles from antiparticles, and thus predict deviations from the standard-model correlations.

Mesons are bound states of one quark and one antiquark. Until the LHCb measurement was made, CP asymmetries had been observed in the decays of three types of meson: K^0 mesons, B^0 mesons, and $B^{\pm}$ mesons. The LHCb experiment is the first to measure CP asymmetry in the decay of a fourth type of meson, the B_s^0 meson. The fact that, within the standard model, the difference in the laws of physics followed by matter and antimatter is encoded in a single parameter provides a particularly strong correlation between this asymmetry and an asymmetry in B^0 decay that has been measured by several experiments with high accuracy. Although neither of these asymmetries, nor the corresponding decay rates, can be theoretically predicted with any accuracy, the product of the CP asymmetry with the decay rate should, according to the standard model, be equal (to a good approximation) between the B_s^0 decay and the B^0 decay[4,5]. The LHCb measurement is consistent with the predicted equality at the level of a few per cent, implying yet another triumph of the standard model.

In many extensions of the standard model, new particles are predicted to interact more strongly with the heavier quarks (strange, bottom, charm and top) than with the lighter ones (up and down). The K^0 mesons, the B^0 mesons and the $B^{\pm}$ mesons all have either a down (anti)quark or an up (anti)quark. But the B_s^0 mesons are different: they are made up of a strange quark and a bottom antiquark. Their antiparticles are composed of a bottom quark and a strange antiquark. Thus, scientists had hoped that although the effects of new physics were negligibly small in all previously measured CP asymmetries, they would be large enough to be observed in B_s^0 decays. Frustratingly, this seems not to be the case.

"The LHCb measurement reinforces the standard model's explanation of how the weak force distinguishes matter from antimatter."

The standard-model prediction[2] of how the weak force distinguishes between matter and antimatter therefore continues to successfully describe all measurements of CP asymmetries in meson decays. However, the standard model fails to explain the Universe's matter–antimatter imbalance. All structures in the Universe, from clusters of galaxies to human cells, are made of matter: protons, neutrons and electrons. Their antiparticles — the antiprotons, antineutrons and positrons — are not found in the Universe at large. If the laws of nature were identical for matter and antimatter, then particles and antiparticles would have been created in equal amounts and would then have annihilated each other, leaving only pure radiation and no matter structures in the Universe. Our very existence is possible only because of CP asymmetries. The standard model allows all antimatter to disappear from the Universe, but it predicts that the amount of surviving matter is many orders of magnitude smaller than observed.

Therefore, there must exist a force, as yet unknown to us, that distinguishes matter from antimatter in a way that is much stronger than that of the weak force. Theorists have made various suggestions as to what this new force might be. To disclose the nature of this force, further hints from experiments are needed. Searching for CP asymmetries in neutrino 'oscillations' of one type into another and for the electric-dipole moments of the neutron and the electron, in addition to measuring CP asymmetries in B_s^0-meson decays, seem the most promising avenues through which to obtain such hints. The consistency of the LHCb measurement with the standard model provides further motivation to pursue the other searches even more vigorously. ■

Yosef Nir *is in the Department of Particle Physics, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel.*
e-mail: yosef.nir@weizmann.ac.il

1. Aaij, R. *et al. Phys. Rev. Lett.* **110,** 221601 (2013).
2. Kobayashi, M. & Maskawa, T. *Prog. Theor. Phys.* **49,** 652–657 (1973).
3. Jarlskog, C. *Phys. Rev. Lett.* **55,** 1039–1042 (1985).
4. Lipkin, H. J. *Phys. Lett. B* **621,** 126–132 (2005).
5. Gronau, M. & Rosner, J. L. *Phys. Lett. B* **482,** 71–76 (2000).

CANCER

Calculated treatment

Mathematical modelling linked with patient data suggests that combination therapy is more effective than sequential treatment at preventing drug resistance in cancer. This predictive approach may pave the way for personalized therapies.

NATALIA L. KOMAROVA & C. RICHARD BOLAND

In a study published in *eLIFE*, Bozic *et al.*[1] use a mathematical approach to examine tumour evolution and response to chemotherapy. In one example, they describe a patient who had the skin cancer melanoma characterized by an estimated tumour burden of 9.8×10^{10} cells and 8 metastatic lesions. Their modelling predicts a 0% chance of disease control using a single drug, but that the likelihood of successful treatment could rise to 88% during combined therapy with two drugs. The approach offers a brave, quantitative look at designing targeted therapy for cancer.

The search for cancer treatments has traversed a long and thorny path, with more failures and disappointments than glimpses of success. A major breakthrough was achieved with the development of a drug called imatinib in the 1990s. This inhibitor of tyrosine kinase enzymes showed breathtaking success for treating chronic myelogenous leukaemia (CML). Imatinib and other small-molecule inhibitors 'recognize' and attack cancer cells, but spare normal cells, thereby reducing side effects compared with conventional chemotherapy. Since the discovery of imatinib, dozens of other such inhibitors have been developed for treating different cancers. However, the initial excitement surrounding these drugs was tempered by the appearance of drug resistance — the phenomenon in which disease returns a few months after initial treatment success[2].

33

© 2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Cancer is a process of Darwinian evolution played out in a particular organ. Normal cells divide and die, and each division brings a small chance of genetic change. Most such mutations are deleterious, and the cells die without leaving offspring, but some confer new properties that promote growth or survival and can lead to cancer. The greatest challenge for drugs targeted at such cells is the further evolution of mutations that confer drug resistance. Combining multiple drugs that have distinct mechanisms of action might provide a solution to this problem. The concept of a 'drug cocktail' was introduced in 1996 in the context of treating AIDS. There, the emergence of viral strains resistant to single drug treatments rendered all previous attempts to control the disease unsuccessful. Viral evolution in a patient is conceptually similar to the evolution of cancer cells, so similar treatment strategies might work well for both diseases.

Current common practice for treating cancers with small-molecule inhibitors is to administer the agents sequentially, starting with a 'first-line' drug and switching to 'second-line' therapies if the tumour relapses. Bozic *et al.* assessed the effectiveness of this approach using sophisticated mathematical techniques and data from patients with melanoma or with pancreatic or colorectal cancers. They convincingly demonstrate that a sequential strategy "precludes any chance for cure", even in the best-case scenario in which no single mutants confer resistance to both drugs. However, they show that simultaneously combining two or more drugs can provide much-needed hope for patients.

As demonstrated last year[3], drug-resistant mutants typically exist at low levels in tumours before the beginning of treatment. Treatment with a single drug gives a competitive advantage to mutants resistant to that drug, such that by the time of the switch to a second-line therapy, there is a high chance that a mutant that is also resistant to the second drug (a doubly resistant mutant) has already emerged (Fig. 1). But combination therapy eliminates cells that are singly resistant to either drug and therefore — because the likelihood of a doubly mutated cell emerging in such a population is low — greatly increases the chance of success.

The greatest obstacle for combination treatments is the phenomenon of cross-resistance, in which a single mutation confers resistance to more than one drug. But even if such mutants are generated, the authors estimate that combination treatment can be beneficial in some cases, whereas single-drug and sequential strategies offer no hope.

Previous mathematical analyses have also shown[4] that cyclic treatments are ineffective compared with combination treatments, and have led to the proposal[5] that a combination of three anticancer drugs would be needed to treat CML. It has also already been argued[6] that, even in the presence of cross-resistant mutations in CML, combination treatments give patients a better chance of cure than do single-drug treatments. And *in vitro* studies[7] that compared CML cells treated with one small-molecule inhibitor with those treated with a combination of two or three demonstrated that the combined therapy suppressed cell proliferation more effectively. But with Bozic and colleagues' success in synthesizing theoretical and experimental methods and applying the analysis to solid tumours, these modelling studies have taken a leap forward.

Even more significantly, the authors' paper outlines a roadmap for future personalized therapies, by showing that specific parameters for a patient can be measured and used in a mathematical model to calculate the probability of treatment success and to design the best possible treatment strategy. The authors extracted tumour parameters — including its size at presentation, cell division and cell death rates, and changes in the associated kinetic parameters following treatment — from 20 patients with melanoma who were treated with the small-molecule inhibitor vemurafenib. With this information, they were able to predict the most likely outcome of single, dual and triple therapies for each patient.

There is a bright future for this approach. As new drugs and more information on the exact mechanisms of drug action become available, the model can be iteratively improved. For example, there is currently a strong research focus on cellular plasticity, the heterogeneity of cells within a tumour and the role of cancer stem cells. But it is not known how the presence of cancer cells with differing properties affects a tumour's susceptibility to targeted treatments. Moreover, the evolutionary costs of resistance for a cell have not been quantified in most cases, nor have mutation rates for molecular changes of various kinds, although estimates have been made for the number of mutations conferring resistance to certain drugs in CML[7,8]. The potential complications of drug cocktails — including toxicity and undesirable drug interactions — must also be taken into account. But the overall message is loud and clear: mathematics can help to calculate treatment strategies, and the best hope so far lies in combination therapies. ■

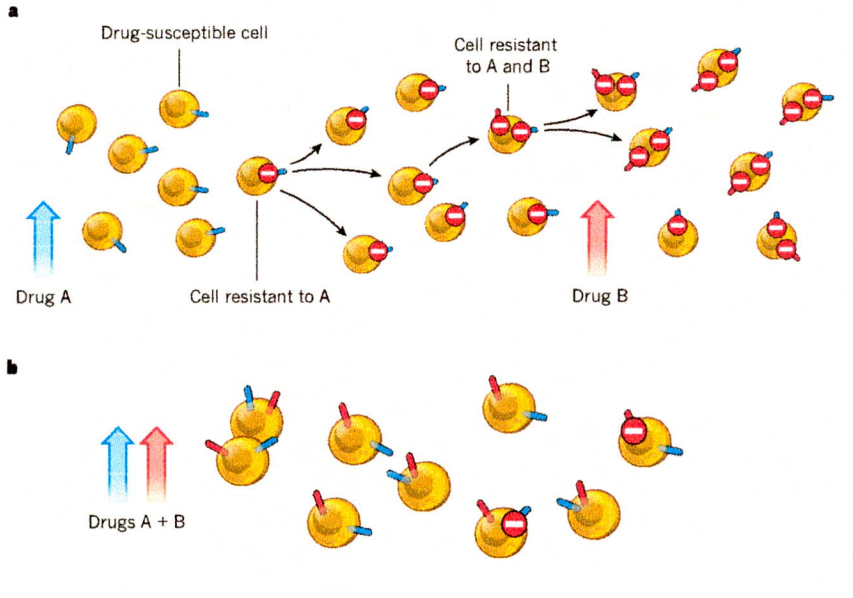


Figure 1 | Single-drug versus combination therapy. **a**, During therapy with one drug alone, a cell that acquires a mutation that confers resistance to the drug will be at a proliferative advantage. By the time this is recognized and treatment with a second drug is started, it is likely that a cell resistant to both drugs will already have emerged. **b**, Starting therapy with both drugs simultaneously means that cells acquiring single resistance will be immediately eliminated by the other drug. Bozic *et al.*[1] use mathematical modelling to show that this approach increases the chance of effective treatment.

Natalia L. Komarova *is in the Departments of Mathematics and Ecology and Evolutionary Biology, University of California Irvine, Irvine, California 92697, USA.* **C. Richard Boland** *is in the Department of Gastroenterology, Baylor University Medical Center, Dallas 75246, Texas, USA.*
e-mail: komarova@uci.edu

1. Bozic, I. *et al. eLIFE* **2**, e00747 (2013).
2. Zhang, J., Yang, P. L. & Gray, N. S. *Nature Rev. Cancer* **9**, 28–39 (2009).
3. Diaz, L. A. Jr *et al. Nature* **486**, 537–540 (2012).
4. Katouli, A. A. & Komarova, N. L. *Bull. Math. Biol.* **73**, 549–584 (2011).
5. Komarova, N. L. & Wodarz, D. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 9714–9719 (2005).
6. Komarova, N. L., Katouli, A. A. & Wodarz, D. *PLoS ONE* **4**, e4423 (2009).
7. Bradeen, H. A. *et al. Blood* **108**, 2332–2338 (2006).
8. Katouli, A. A. & Komarova, N. L. *PLoS ONE* **5**, e12300 (2010).

© 2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

34

ANEXO 4

Preclinical Modeling of Combination Treatments: Fantasy or Requirement?

SHANNON DECKER AND EDWARD A. SAUSVILLE

University of Maryland Marlene and Stewart Greenebaum Cancer Center, Baltimore, Maryland 21201, USA

ABSTRACT: **Combination chemotherapy is considered the "norm" in cancer chemotherapy. While the development of classical combination regimens took into account factors such as single-agent activity, different toxicity profiles, and advantageous pharmacology of the component drugs, in the era of targeted therapies there are additional considerations such as new mechanisms of resistance due to modulation of pathway dependence. Since it is not feasible to test all of the possible combinations clinically, some method for preclinically identifying and prioritizing promising combinations is necessary. While *in vivo* animal models can be used for safety testing and some pharmacokinetics, even they can quickly become prohibitively resource intensive for the purpose of efficacy determinations. Therefore, factors such as biologic rationale, reliable *in vitro* results in more than one tumor type, achievable *in vivo* pharmacology, and selectivity of primary tumor cell activity become important in the evaluation of potential combination regimens.**

KEYWORDS: **combination chemotherapy; cancer; synergy; preclinical models**

COMBINATIONS ARE THE "NORM" IN CANCER CHEMOTHERAPY

In cancer treatment, combination chemotherapy has been found more effective than single-drug regimens and, in fact, is accepted as the "norm." Combination therapies have been the basis of the major success stories in the treatment of various cancers. Initial treatment for acute lymphoblastic leukemia (ALL) usually consists of a regimen such as vincristine, prednisone, and anthracycline with or without asparaginase, resulting in complete remissions in a large majority of cases. More than 75% of all newly diagnosed patients with adult Hodgkin's lymphoma can be cured with combination chemotherapy and/or radiation therapy. One of the most effective and least toxic chemotherapy regimens for this disease is known as ABVD and consists of a combination of adriamycin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine. In lung cancer, the combination of carboplatin and paclitaxel is clinically useful. Even in epithelial cancers, such as testis or adjuvant therapies for breast or colon cancers, combination therapies are standard.

Address for correspondence: Edward A. Sausville, University of Maryland Marlene and Stewart Greenebaum Cancer Center, 22 S. Greene Street, Baltimore, MD 21201. Voice: 410-328-7394; fax: 410-328-6896.
esausville@umm.edu

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1059: 61–69 (2005). **© 2005 New York Academy of Sciences.**
doi: 10.1196/annals.1339.024

36

One empirical basis for understanding the success of certain combination therapies is that they represent pharmacologically tolerable combinations of drugs that affect the same target but that have often been selected due to different "large" organ toxicities.[1] Three of the four drugs in the ABVD regimen target DNA. While three of the four in the regimen cause decreases in white blood cells and platelets, the nonhematologic toxicities vary. Adriamycin produces cardiac toxicity, vinblastine causes neurotoxicity, and bleomycin has pulmonary side effects.

A different view of how to produce useful combination regimens suggests that in addition to having different spectra of toxicity, preferably with minimal cross resistance, other important criteria are that each of the drugs have proven efficacy as single agents, and they actually have different mechanisms of action in eliciting an antiproliferative effect.[2] Ideally, the drugs should be administered at the maximum tolerated dose for the shortest time compatible with normal cell compartment recovery. In the lung cancer regimen mentioned above, both carboplatin and paclitaxel have some single-agent activity, with carboplatin targeting DNA and paclitaxel acting on tubulin. Both drugs lower white blood cell counts and platelets, with paclitaxel having neurotoxicity as an additional side effect.

TARGETED THERAPY AND COMBINATION DESIGN

In addition to empirical approaches to combination design, the development of targeted therapies has created the possibility for a "rational" basis for constructing combinations where the drugs are selected to affect different targets and/or circumvent resistance. For example, the use of combinations of reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors is the standard of care in the treatment of AIDS and seems to prevent the facile development of mutant resistant strains of the HIV virus. In this case, two distinct targets—each crucial to creating a successful viral replication cycle—convey a profound antiviral effect when coincidentally inhibited. An analogous strategy is used in the treatment of tuberculosis, which rapidly becomes resistant to monotherapy.

This rational approach to combination design requires consideration of the targets and pathways involved. For instance, one can take into account whether a linear or concentric model of target action applies (FIG. 1). In the classic linear model with a single pathway affected, a series of drugs each acting on its own component of that linear pathway could be imagined as conveying benefit when used in combination. Alternatively and somewhat more likely, the tumor could exist in a "super state" where there are multiple pathways that all contribute to tumor survival and growth. One could then design a combination drug strategy that affects each of the targets contributing to the super state.

Another method for approaching targets and pathways in the context of combination design is to consider what has been described as the six essential alterations in cell physiology in malignancy: evasion of apoptosis; self-sufficiency in growth signals; insensitivity to anti-growth signals; sustained angiogenesis; limitless replicative potential; and capacity for tissue invasion and metastasis.[3] The first three of these alterations can be thought of as the targets of more classical cancer chemotherapy agents, while the latter three are the focus of intense interest for the development of many new targeted therapies. Acting on the more "classical" targets, such as DNA

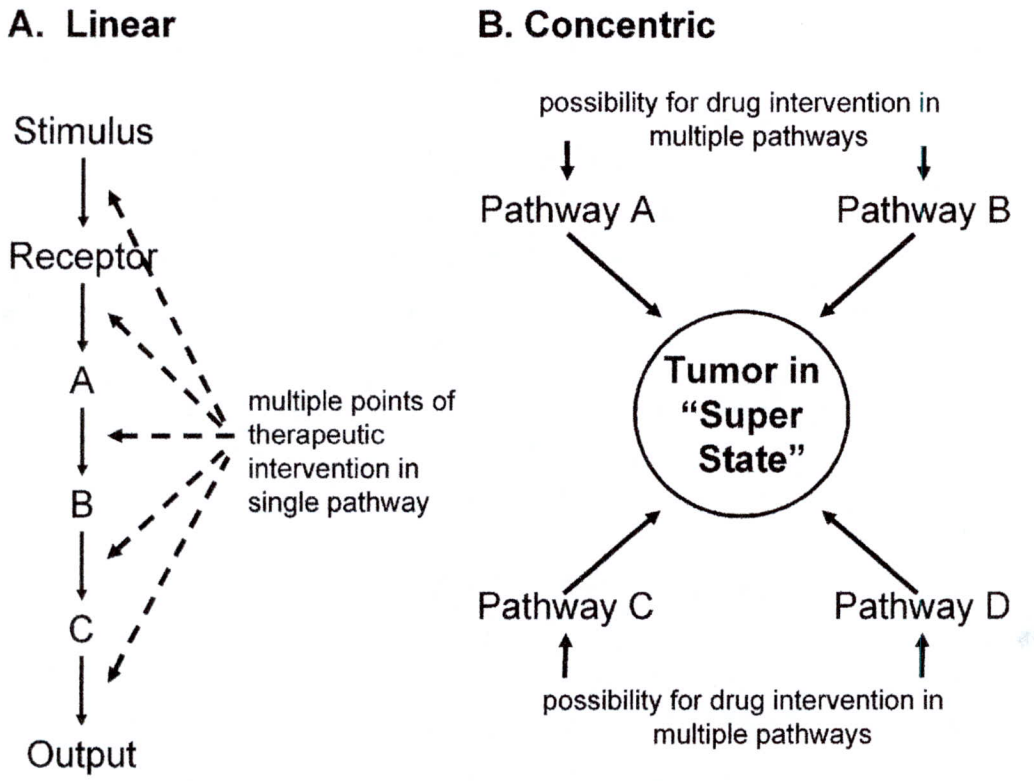


FIGURE 1. Models of target action. (**A**) In a classic linear model, a single pathway needs to be affected by candidate agents. (**B**) In a concentric model, multiple pathways contribute to tumor survival and growth.

or tubulin, is in essence a means of evoking a "stress response" leading to the induction of apoptosis. For DNA-interactive agents, this could mean affecting the p53 checkpoint response or p53-induced genes, while for a tubulin-targeted drug the stress evokes a mitotic checkpoint response. Useful targeted agents will also evoke a stress response depending on how important the drug's target is in sustaining an anti-apoptotic influence.

While minimal cross resistance was a desired characteristic of a classical combination regimen, inclusion of targeted therapies in combination regimens offers potential additional avenues of resistance. In addition to the classical mechanisms of drug resistance related to the drug itself, such as efflux, metabolism, and target expression, another means of resistance that arises with targeted agents is through the modulation of pathway dependence. In the super state example in FIGURE 1, if a drug affecting only pathway A were used, the tumor could alter its growth and survival so as to exist without pathway A, rendering that drug alone ineffective. This was actually recently illustrated by the development of resistance to A431 squamous cell carcinoma xenografts to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies for two cycles.[4] A431 cell variants were developed from recurring resistant tumors which grew faster and were clearly less responsive to the anti-EGFR antibodies than the parental line. The investigators looked at the relative expression

levels of a number of different targets in these variants, including relative VEGF expression. In five of the six resistant cell variants, VEGF expression levels were elevated relative to the parent line. These results suggest that, at least in this example, acquired resistance can develop to a targeted therapy and can proceed, in part, by selecting advantageous tumor subpopulations which upregulate a different, parallel growth-modulating pathway, in this case modifying the tumor stroma. Resistance does not appear therefore to have arisen in relation to the drug-affected pathway, but with another pathway having been called into play.

Taking into account target, pathway, and resistance issues, one could imagine designing a combination of targeted agents for the treatment of bulk tumor that consisted of an anti-proliferative, a pro-apoptotic, and an anti-vascular therapy. A recent clinical trial of an anti-vascular agent with an anti-proliferative regimen demonstrated that this sort of combination could be beneficial in a patient population.[5] The trial placed patients with previously untreated metastatic colorectal carcinoma into one of three groups: bolus IFL (5-fluorouracil, leucovorin, and irinotecan) + placebo; bolus IFL + the anti-vascular antibody bevacizumab; or 5-fluorouracil, leucovorin, and bevacizumab. The overall response rate for IFL + placebo was 34.7% with a duration of 7.1 months, while IFL + bevacizumab was 44.9% with a duration of 10.4 months ($P = 0.029$). Improvement was also seen in progression-free survival, 6.2 months for IFL + placebo versus 10.6 months for IFL + bevacizumab ($P < 0.00001$).

Other clinical results from the combination of classical regimens with targeted agents include those with the RAF-kinase and VEGFR inhibitor BAY43-9006. In a phase II randomized discontinuation trial in a variety of advanced solid tumors, there were no complete responses to the single agent, but partial responses in renal (35%), sarcoma (10%), thyroid (40%), and melanoma (2%).[6] A phase II trial in melanoma of BAY-43-9006 with carboplatin and paclitaxel, however, achieved 40% PR and 43% stable disease.[7] Taken together, these data raise the possibility of modulation of sensitivity *in vivo* to platinum by BAY43-9006. One potential mechanism is better delivery of the drug because of the effects of the anti-vascular compound on interstitial fluid pressure.[8]

In contrast to a classical combination regimen where each component of the regimen had some level of activity as a single agent, the possibility exists that the targeted agents may be relatively to completely inactive as single agents. Another design strategy therefore is to combine two or more anti-signaling molecules that alone may not be toxic, but in combination they affect two or more critical pathways or have an augmented effect on one pathway. For preventive therapy, a strategy that combines an anti-mutator, an anti-telomerase, and an anti-invasive could be envisioned.

PRECLINICAL TESTING OF COMBINATIONS

Clinical trials of combination regimens are extremely expensive and time-consuming. Furthermore, the number of potential combinations is virtually unlimited. So the question is whether it is possible to determine preclinically which combinations will be effective. In April 2003, the U.S. National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program (NCI DTP) held a workshop on defining the

efficacy of combinations.[9] Some of the goals of the workshop were to attempt to determine what preclinical data would represent convincing evidence that a combination should be tested clinically, and how best to prioritize the possibilities. The outcome of the workshop suggested that one should utilize the *in vitro* data to prioritize for those regimens clearly showing synergy as opposed to mere lack of antagonism. *In vitro* data should represent more than one tumor type. There should be a biologic rationale for the combination. Ideally, evidence should exist for greater activity against tumor cells as opposed to normal cells. *In vivo* tumor efficacy of the combination was not considered necessary, although obviously a plus if present. If possible, clear evidence of likely safety in the *in vivo* models should be demonstrated. Pharmacokinetics, however, should be utilized from early human studies, where available, to model regimens that approximate non-antagonistic interactions *in vitro*. The concentrations studied *in vitro* should clearly be those that are relevant clinically.

SYNERGY

Given the enormous number of possible combinations of drugs, the idea of prioritizing synergistic combinations and not selecting antagonistic ones is obviously desirable. Synergism in fact is almost critical to define in those situations where the single agents are relatively ineffective on their own. Defining synergy, however, is no simple matter, and a variety of techniques for doing so has been covered in great detail elsewhere.[10]

One of the more straightforward methods for determining synergy is known as fractional effect analysis, where the effect of the drugs alone is multiplied and compared with the effect of the combination at the same drug concentrations. Although simple, it has the significant limitation of assuming a linear concentration–effect relationship for each agent as well as the combination.

The isobologram representation is one of the most commonly used methods for calculating synergy. Concentration– effect curves are calculated for each drug alone and for the effect of a variable concentration of one drug in the presence of a fixed concentration of the other. The "apparent" IC_{50} (50% inhibitory concentration) of the combination is then plotted, representing expected additivity. If the observed effect of the combination falls to the left of the expected curve, there is synergy and to the right, antagonism. In addition to being a very labor-intensive method that does not allow quantitation of synergism, this method also occasionally produces sigmoidal observed curves that lie on both sides of the expected curve. Although there are complicated three-dimensional response surface approaches that overcome some of the limitations of isobolograms, their complexity often dictates against them.

The well-known Chou and Talalay median-drug effect analysis is a somewhat more accessible method to overcome the sigmoidicity problem found with isobolograms.[11] The drug mixture is at constant concentration ratios so that the relative effects of each drug in the mixture are identical. The growth inhibitory effect of each drug, the sigmoidicity of the curves, and an estimated IC_{50} are used to calculate a combination index (CI) that serves as a quantitative measure of synergism. This method has the advantage of allowing evaluation of drug combinations where the drugs interact in the same pathway or in completely separate pathways.

PROBLEMS IN DESIGNING SIGNALING COMBINATIONS

Definition of synergy is by no means the only issue that remains unresolved in the design of signaling combinations in cancer treatment. We do not know yet how to diagnose the "mixture" of pathways acting in a tumor, and what would be a basis for selecting certain combination regimen drug members. Also unknown is the best time in the natural history of the tumor for intervention with agents affecting combined pathways, whether "up front" or after a certain sequence of standard and investigational therapies. It would also be useful to know whether there are any qualitative differences in the results that are achievable between certain drug types, such as antibodies versus small molecules or between different types of small molecules. If so, why and how can they be exploited?

COMBINATIONS OF KINASE-DIRECTED AGENTS

A look at any of a number of schematic illustrations of the principal pathways involved for some of the new kinase-directed agents in development reveals the complexity of attempting to select the best possible combinations. Among the combinations of new agents that have been tried preclinically are the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol with the erbB receptor-directed monoclonal antibody trastuzumab. Flavopiridol has been shown to inhibit CDK4 activity after cyclin D1 expression in MCF7 breast cancer cells.[12] On Western blots, cyclin D1 starts to diminish after 6 h of exposure to flavopiridol and is almost completely gone by 10 h. CDK4 activity follows slightly behind, beginning to diminish at 8 h. Effects on steady-state mRNA levels after treatment with 300 nM flavopiridol show a similar time course. Cyclin D1 is downstream of erbB2, and Nahta *et al.* demonstrated that cyclin D1 functions are essential and rate limiting for erbB2 transformation.[13] These results suggested the combination of drugs active against erbB2 and cyclin D1 (trastuzumab and flavopiridol). They found that these two drugs were synergistically cytotoxic against erbB2-positive breast cancer cell lines and that adding flavopiridol to trastuzumab synergistically lowered erbB2 levels in these cells.

The PDK1-Akt survival pathway (FIG. 2) has also been the focus of numerous drug discovery efforts. The alkylphospholipid perifosine, which is currently in clinical trials, causes almost complete loss of Akt phosphorylation on at least two key sites.[14] Perifosine was further shown to decrease plasma membrane localization of Akt at approximately 5 μM. In patients, a loading dose followed by maintenance dosing produces approximately these levels.[16,17] UCN-01 produced this effect by inhibiting the upstream kinase, PDK1. The combination of perifosine and UCN-01 was tested *in vitro* because these two drugs both produce loss of phosphorylation of Akt, but through different mechanisms.[18] Using the Chou and Talalay method, this combination was shown to be moderately synergistic. Further, cell cycle analysis of the effect of the combination showed an increase in the percentage of cells arresting in G0/G1, 87% for the combination versus 51% for controls, 52% for perifosine-treated, and 69% for UCN-01–treated.

UCN-01 was also tested *in vitro* in combination with the geldanamycin analogue 17-AAG, an antagonist of the molecular chaperone hsp90. Synergistic induction of apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential was observed in leukemia

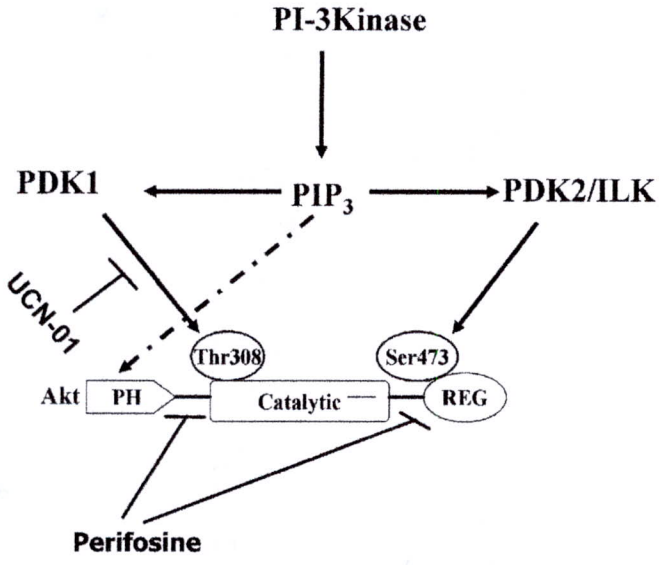


FIGURE 2. The PDK1-Akt survival pathway. Points of action of perifosine and UCN-01 are shown. Numerous drug discovery efforts not reviewed here have focused on various other targets in the pathway.

cells.[19] Explication of the basis of this synergy indicated that 17-AAG potentiates UCN-01 cytotoxicity and that interference with both the Akt and Raf-1/MEK/MAP kinase cytoprotective signaling pathways contributes to this effect.

ANIMAL MODELS AND COMBINATIONS

While the above examples all demonstrate synergy *in vitro*, the question often arises whether *in vitro* combination data are sufficient to justify moving forward to human clinical trials. There are, however, a number of problems with using animal models for the assessment of combinations. An appropriately powered animal experiment with untreated controls, vehicle controls, a Drug A alone group, a Drug B alone group, and a combination group easily exceeds over 100 animals. Logistical and cost issues aside, the pharmacology in mice, or whatever species is desired, must approximate the pharmacology in humans, and even then it will be difficult to predict the pharmacokinetic interactions. One must either control for or actively design pharmacology into the study. Finally, the results can easily show not only additive or synergistic efficacy, but also additive or synergistic toxicity that may or may not be relevant to the human experience.

Animal models have both logistical and technical limitations; therefore, in attempting to define a "roadmap" to the clinic for new combination therapies, the guidelines emerging from the NCI DTP workshop on prioritizing on synergy, biologic rationale, selectivity, likely safety, and favorable pharmacokinetics can serve as an initial series of filters to weed out combinations that do not merit animal or clinical testing. Given that combination therapies have always been a major basis of success in the treatment of cancer and that the nature of the new generations of drugs

that is emerging makes it even less likely that a monotherapy will suffice, it is hoped that what will materialize after applying a series of appropriate *in vitro* filters will be a select and manageable number of combination designs for more advanced testing in a clinical setting.

[COMPETING INTERESTS: Dr. Edward A. Sausville is on the Scientific Advisory Board for Kosan Biosciences and is a consultant for Kosan Biosciences and Keryx Pharmaceuticals. The author declares a competing financial interest.]

REFERENCES

1. DEVITA, JR., V.T., R.C. YOUNG & G.P. CANELLOS. 1975. Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. Cancer **35:** 98–110.
2. ZOLI, W., L. RICOTTI, A. TESEI, *et al.* 2001. In vitro preclinical models for a rational design of chemotherapy combinations in human tumors. Crit. Rev. Oncol./Hematol. **37:** 69–82.
3. HANAHAN, D. & R.A. WEINBERG. 2000. The hallmarks of cancer. Cell **100:** 57–70.
4. VILORIA-PETIT, A., T. CROMBET, S. JOTHY, *et al.* 2001. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies *in vivo*: a role for altered tumor angiogenesis. Cancer Res. **61:** 5090–5101.
5. HURWITZ, H., L. FEHRENBACHER, W. NOVOTNY, *et al.* 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N. Engl. J. Med. **350:** 2335–2342.
6. RATAIN, M.J., K.T. FLAHERTY, W.M. STADLER, *et al.* 2004. Preliminary antitumor activity of BAY 43-9006 in metastatic renal cell carcinoma and other advanced refractory solid tumors in a phase II randomized discontinuation trial (RDT). 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (post-meeting edit.). J. Clin. Oncol. **22:** 4501.
7. FLAHERTY, K.T., M. BROSE, L. SCHUCHTER, *et al.* 2004. Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin (C) and paclitaxel (P) demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. Proc. ASCO **23:** 7507.
8. GERBER, H.P. & N. FERRARA. 2005. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. Cancer Res. **65:** 671–680.
9. GITLER, M.S., A. MONKS & E.A. SAUSVILLE. 2003. Preclinical models for defining efficacy of drug combinations: mapping the road to the clinic. Mol. Cancer Ther. **2:** 929–932.
10. PETERS, G.J., C.L. VAN DER WILT, C.J.A. VAN MOORSEL, *et al.* 2000. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. Pharmacol. & Ther. **87:** 227–253.
11. CHOU, T.C. & P. TALALAY. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regul. **22:** 27–55.
12. CARLSON, B., T. LAHUSEN, S. SINGH, *et al.* 1999. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. Cancer Res. **59:** 4634–4641.
13. NAHTA, R., J.D. IGLEHART, B. KEMPKES, *et al.* 2002. Rate-limiting effects of cyclin D1 in transformation by erbB2 predicts synergy between herceptin and flavopiridol. Cancer Res. **62:** 2267–2271.
14. KONDAPAKA, S.B., S.S. SINGH, G.P. DASMAHAPATRA, *et al.* 2003. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. Mol.Cancer Ther. **2:** 1093–1103.
15. VAN UMMERSEN, L., K. BINGER, J. VOLKMAN, *et al.* 2004. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. Clin. Cancer Res. **10:** 7450–7456.

16. MONGA, M., R.A. MESSMANN, D. HEADLEE, *et al.* 2002. A phase I trial of oral perifosine in patients with refractory neoplasms. Proc. ASCO **21:** 1837.
17. SATO, S., N. FUJITA & T. TSURUO. 2002. Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). Oncogene **21:** 1727–1738.
18. DASMAHAPATRA, G.P., P. DIDOLKAR, M.C. ALLEY, *et al.* 2004. In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines. Clin. Cancer Res. **10:** 5242–5252.
19. JIA, W., C. YU, M. RAHMANI, *et al.* 2003. Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways. Blood **102:** 1824–1832.

ANEXO 5

55746 US

The United States of America

The Director of the United States Patent and Trademark Office

Has received an application for a patent for a new and useful invention. The title and description of the invention are enclosed. The requirements of law have been complied with, and it has been determined that a patent on the invention shall be granted under the law.

Therefore, this

United States Patent

Grants to the person(s) having title to this patent the right to exclude others from making, using, offering for sale, or selling the invention throughout the United States of America or importing the invention into the United States of America, and if the invention is a process, of the right to exclude others from using, offering for sale or selling throughout the United States of America, or importing into the United States of America, products made by that process, for the term set forth in 35 U.S.C. 154(a)(2) or (c)(1), subject to the payment of maintenance fees as provided by 35 U.S.C. 41(b). See the Maintenance Fee Notice on the inside of the cover.

Michelle K. Lee

Director of the United States Patent and Trademark Office

55746 US

US009120791B2

(12) **United States Patent**
Le Diguarher et al.

(10) **Patent No.: US 9,120,791 B2**
(45) **Date of Patent: Sep. 1, 2015**

(54) **INDOLIZINE COMPOUNDS, A PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM**

(71) Applicants: **LES LABORATOIRES SERVIER**, Suresnes Cedex (FR); **VERNALIS (R&D) Ltd.**, Winnersh (GB)

(72) Inventors: **Thierry Le Diguarher**, Saint Denis de l'Hôtel (FR); **Patrick Casara**, Strasbourg (FR); **Jérôme-Benoît Starck**, Rueil-Malmaison (FR); **Jean-Michel Henlin**, Suresnes (FR); **James Edward Paul Davidson**, Great Shelford (GB); **James Brooke Murray**, Linton (GB); **Christopher John Graham**, Newmarket (GB); **I-Jen Chen**, Cambridge (GB); **Olivier Geneste**, Rucil-Malmaison (FR); **John Hickman**, Paris (FR); **Stéphane Depil**, Issy les Moulineaux (FR); **Arnaud Le Tiran**, Croissy sur Seine (FR); **Miklos Nyerges**, Leanyfalu (HU); **Guillaume De Nanteuil**, Suresnes (FR)

(73) Assignees: **LES LABORATOIRES SERVIER**, Suresnes Cedex (FR); **VERNALIS (R&D) LTD**, Winnersh (GB)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **14/374,071**

(22) PCT Filed: **Jan. 23, 2013**

(86) PCT No.: **PCT/FR2013/050136**

§ 371 (c)(1),
(2) Date: **Jul. 23, 2014**

(87) PCT Pub. No.: **WO2013/110890**

PCT Pub. Date: **Aug. 1, 2013**

(65) **Prior Publication Data**

US 2015/0051189 A1 Feb. 19, 2015

(30) **Foreign Application Priority Data**

Jan. 24, 2012 (FR) 12 00193

(51) **Int. Cl.**

C07D 471/00	(2006.01)
A61K 31/475	(2006.01)
C07D 471/04	(2006.01)
C07D 487/04	(2006.01)

(Continued)

(52) **U.S. Cl.**

CPC ***C07D 471/04*** (2013.01); ***A61K 31/475*** (2013.01); ***A61K 31/496*** (2013.01); ***A61K 31/5377*** (2013.01); ***A61K 31/5383*** (2013.01); ***A61K 31/541*** (2013.01); ***A61K 31/55*** (2013.01); ***A61K 31/553*** (2013.01); ***A61K 45/06*** (2013.01); ***A61N 5/1001*** (2013.01); ***C07D 207/30*** (2013.01); ***C07D 211/06*** (2013.01); ***C07D 211/80*** (2013.01); ***C07D 471/00*** (2013.01); ***C07D 487/04*** (2013.01); ***C07D 491/052*** (2013.01); ***C07D 498/04*** (2013.01)

(58) **Field of Classification Search**

None

See application file for complete search history.

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

2005/0070570 A1 3/2005 Garcia et al.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO	WO 03/093297	11/2003
WO	WO 2008/131000	10/2008

(Continued)

OTHER PUBLICATIONS

International Preliminary Report on Patentability for PCT/FR2013/050136 on Jul. 29, 2014.

Perez, H.L., et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22, 3946-3950.

Schroeder, G.M., et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22, 3951-3956.

International Search Report for PCT/FR2013/050136 of Mar. 5, 2013.

Porter, J. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 19, No. 1, p. 230-233, Jan. 1, 2009.

Porter, J. et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 19, No. 6, p. 1767-1772, Mar. 15, 2009.

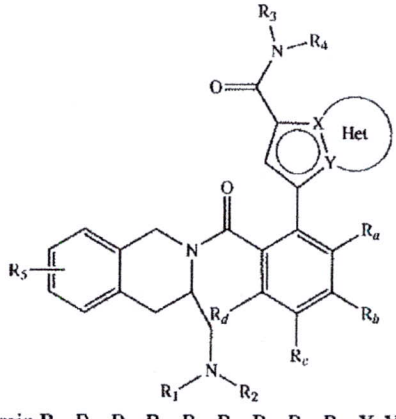
Primary Examiner — Zinna Northington Davis

(74) *Attorney, Agent, or Firm* — Hueschen and Sage

(57) **ABSTRACT**

Compounds of formula (I):

(I)



wherein R_a, R_b, R_c, R_d, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, X, Y and Het are as defined in the description.

Medicinal products containing the same which are useful in treating pathologies involving a deficit in apoptosis, such as cancer, auto-immune diseases, and diseases of the immune system.

12 Claims, No Drawings

(51) **Int. Cl.**

C07D 491/052	(2006.01)
C07D 207/30	(2006.01)
C07D 211/06	(2006.01)
C07D 211/80	(2006.01)
A61K 31/496	(2006.01)
A61K 31/5377	(2006.01)
A61K 31/5383	(2006.01)
A61K 31/541	(2006.01)
A61K 31/55	(2006.01)
A61K 31/553	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61N 5/10	(2006.01)
C07D 498/04	(2006.01)

(56) **References Cited**

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

WO	WO 2009/073545	6/2009
WO	WO 2009/102468	8/2009
WO	WO 2012/162365	11/2012

INDOLIZINE COMPOUNDS, A PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM

The present invention relates to new indolizine compounds, to a process for their preparation and to pharmaceutical compositions containing them.

The compounds of the present invention are new and have very valuable pharmacological characteristics in the field of apoptosis and cancerology.

Apoptosis, or programmed cell death, is a physiological process that is crucial for embryonic development and maintenance of tissue homeostasis.

Apoptotic-type cell death involves morphological changes such as condensation of the nucleus, DNA fragmentation and also biochemical phenomena such as the activation of caspases which cause damage to key structural components of the cell, so inducing its disassembly and death. Regulation of the process of apoptosis is complex and involves the activation or repression of several intracellular signalling pathways (Cory S. et al., Nature Review Cancer, 2002, 2, 647-656).

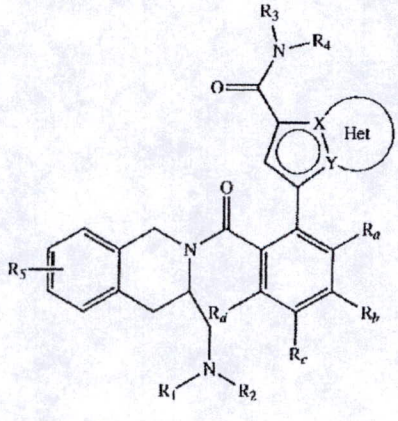
Deregulation of apoptosis is involved in certain pathologies. Increased apoptosis is associated with neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease and ischaemia. Conversely, deficits in the implementation of apoptosis play a significant role in the development of cancers and their chemoresistance, in autoimmune diseases, inflammatory diseases and viral infections. Accordingly, absence of apoptosis is one of the phenotypic signatures of cancer (Hanahan D. et al., Cell 2000, 100, 57-70).

The anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family are associated with numerous pathologies. The involvement of proteins of the Bcl-2 family is described in numerous types of cancer, such as colon cancer, breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, bladder cancer, ovarian cancer, prostate cancer, chronic lymphoid leukaemia, follicular lymphoma, myeloma, prostate cancer, etc. Overexpression of the anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family is involved in tumorigenesis, in resistance to chemotherapy and in the clinical prognosis of patients affected by cancer. There is, therefore, a therapeutic need for compounds that inhibit the anti-apoptotic activity of the proteins of the Bcl-2 family.

In addition to being new, the compounds of the present invention have pro-apoptotic properties making it possible to use them in pathologies involving a defect in apoptosis, such as, for example, in the treatment of cancer and of immune and auto-immune diseases.

The present invention relates more especially to compounds of formula (I):

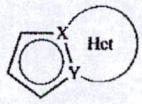
(I)



wherein:

X and Y represent a carbon atom or a nitrogen atom, it being understood that they may not simultaneously represent two carbon atoms or two nitrogen atoms,

the Het moiety of the group



represents an optionally substituted, aromatic or non-aromatic ring composed of 5, 6 or 7 ring members, which may contain, in addition to the nitrogen represented by X or by Y, from one to 3 hetero atoms selected independently from oxygen, sulphur and nitrogen, it being understood that the nitrogen in question may be substituted by a group representing a hydrogen atom, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group or a group —C(O)—O-Alk wherein Alk is a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group,

R_1 and R_2 independently of one another represent a hydrogen atom or a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group, or R_1 and R_2 form with the nitrogen atom carrying them a heterocycloalkyl composed of from 4 to 7 ring members, which may contain, in addition to the nitrogen atom, another hetero atom selected from oxygen, sulphur, SO_2 and NR wherein R represents a hydrogen atom, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group, a $(C_1$-$C_6)$alkylsulphonyl group, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$polyhaloalkyl group or a group —C(O)—O-Alk wherein Alk is a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group,

R_3 represents a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group, a $(C_2$-$C_6)$alkenyl group, a $(C_2$-$C_6)$alkynyl group, a cycloalkyl group, a $(C_4$-$C_{10})$cycloalkyl-$(C_1$-$C_6)$alkyl group wherein the alkyl group may be linear or branched, an aryl group or a heteroaryl group,

R_4 represents an aryl, heteroaryl, cycloalkyl or linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group,

R_5 represents a hydrogen atom or a halogen atom,

R_a, R_b, R_c and R_d independently of one another represent a hydrogen atom, a halogen atom, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkoxy group, a hydroxy group, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$ polyhaloalkyl group, or a trifluoromethoxy group, or the substituents of one of the pairs (R_a,R_b), (R_b,R_c) or (R_c, R_d) form together with the carbon atoms carrying them a ring composed of from 5 to 7 ring members, which may contain from one to 3 hetero atoms selected from oxygen, sulphur and nitrogen, it being understood that the nitrogen in question may be substituted by a group representing a hydrogen atom, a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group or a group —C(O)—O-Alk wherein Alk is a linear or branched $(C_1$-$C_6)$alkyl group, it also being understood that one or more carbon atoms of the ring defined hereinbefore may be deuterated,

it being understood that:

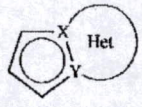
"aryl" means a phenyl, naphthyl, biphenyl or indenyl group,

"heteroaryl" means any mono- or bi-cyclic group composed of from 5 to 10 ring members, having at least one aromatic moiety and containing from 1 to 3 hetero atoms selected from oxygen, sulphur and nitrogen,

"cycloalkyl" means any mono- or bi-cyclic non-aromatic carbocyclic group containing from 4 to 10 ring members,

it being possible for the alkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkyl and heterocycloalkyl groups so defined to be substituted by from 1 to 3 groups selected from optionally substituted linear or branched (C_1-C_6)alkyl, (C_3-C_6)spiro, linear or branched (C_1-C_6)alkoxy, (C_1-C_6)alkyl-S—, hydroxy, oxo (or N-oxide where appropriate), nitro, cyano, —COOR', NR'R", linear or branched (C_1-C_6)polyhaloalkyl, trifluoromethoxy, (C_1-C_6) alkylsulphonyl or halogen, it being understood that R' and R" independently of one another represent a hydrogen atom or a linear or branched (C_1-C_6)alkyl group,

it being possible for the Het moiety of the group



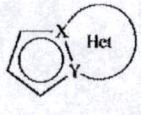
defined hereinbefore to be substituted by a group selected from linear or branched (C_1-C_6)alkyl, hydroxy, $NR_1'R_1"$ and halogen, it being understood that R_1' and $R_1"$ have the same definitions than the groups R' and R" mentioned hereinbefore,

to their enantiomers and diastereoisomers, and to addition salts thereof with a pharmaceutically acceptable acid or base.

Among the pharmaceutically acceptable acids there may be mentioned, without implying any limitation, hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulphuric acid, phosphonic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid, lactic acid, pyruvic acid, malonic acid, succinic acid, glutaric acid, fumaric acid, tartaric acid, maleic acid, citric acid, ascorbic acid, oxalic acid, methanesulphonic acid, camphoric acid etc.

Among the pharmaceutically acceptable bases there may be mentioned, without implying any limitation, sodium hydroxide, potassium hydroxide, triethylamine, tert-butylamine etc.

The group:



advantageously represents one of the following groups: 5,6,7,8-tetrahydroindolizine optionally substituted by a hydroxy, indolizine, 1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine, tert-butyl 3,4-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-2(1H)-carboxylate, 3,4-dihydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]oxazine, 2,3-dihydro-1H-pyrrolizine optionally substituted by a hydroxy, 6,7,8,9-tetrahydro-5H-pyrrolo[1,2-a]azepine or pyrrolo[1,2-a]pyrazine.

In the preferred compounds of the invention, R_1 and R_2 each represents an alkyl group optionally substituted by a methoxy, or R_1 and R_2 form with the nitrogen atom carrying them a heterocycloalkyl selected from the following groups: morpholine optionally substituted by one or more linear or branched (C_1-C_6)alkyl(s), oxidomorpholine, thiomorpholine 1,1-dioxide, 1,4-oxazepan, 3-methoxypyrrolidine, 3,3-difluoropyrrolidine, 3-methoxyazetidine, 3-fluoroazetidine, oxopiperazine or piperazine, the last two groups being substituted by a linear or branched (C_1-C_6)alkyl group, a linear or branched (C_1-C_6)-polyhaloalkyl group or a methylsulphonyl group.

Preferably, R_a and R_d each represents a hydrogen atom and (R_b,R_c) form together with the carbon atoms carrying them a 1,3-dioxolane group wherein one of the carbon atoms is optionally deuterated, a 1,4-dioxane group, a 1,4-dioxepane group, or R_a, R_c and R_d each represents a hydrogen atom and R_b represents a halogen, a methyl, a methoxy, an ethoxy, a trifluoromethyl or a trifluoromethoxy.

The preferred group R_4 is a 4-hydroxyphenyl, 3-fluoro-4-hydroxyphenyl or 5-hydroxypyrimidine.

In the preferred compounds, R_3 represents a group selected from phenyl, indole, indoline, 1,2,3,4-tetrahydroquinoline, 3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine, indane, 1H-indazole, 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine, pyrimidine, cyclobutylmethyl, cyclopropylmethyl, 1H-pyrazole, pyridine, pyridazine, those groups optionally having one or more substituents selected from halogen, linear or branched (C_1-C_6)alkyl, cyano and linear or branched (C_1-C_6)-alkoxy.

The preferred compounds of the invention are listed below:

N-(4-hydroxyphenyl)-3-{6-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-yl}-N-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-1-indolizine carboxamide,

3-{5-chloro-2-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)-carbonyl]phenyl}-N-(4-hydroxyphenyl)-N-(1-methyl-1H-indol-5-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1-indolizine carboxamide,

N-(4-hydroxyphenyl)-N-(1-methyl-1H-indazol-5-yl)-3-{2,2-dideuterio-6-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-yl}-5,6,7,8-tetrahydro-1-indolizine carboxamide,

N-(4-hydroxyphenyl)-N-(1-methyl-1H-indazol-5-yl)-3-(6-{[(3S)-3-(morpholin-4-ylmethyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl]carbonyl}-1,3-benzodioxol-5-yl)-5,6,7,8-tetrahydroindolizine-1-carboxamide,

N-(4-hydroxyphenyl)-3-{7-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl}-N-phenyl-5,6,7,8-tetrahydro-1-indolizine carboxamide,

N-(4-hydroxyphenyl)-N-(1-methyl-1H-indol-5-yl)-3-{6-[((3S)-3-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-yl}-1-indolizine carboxamide,

N-[4-(hydroxy)phenyl]-N-(1-methyl-1H-indol-5-yl)-3-{6-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-yl}-5,6,7,8-tetrahydro-1-indolizine carboxamide,

N-(4-hydroxyphenyl)-3-{6-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]-1,3-benzodioxol-5-yl}-N-phenyl-1-indolizine carboxamide,

3-{5-chloro-2-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)carbonyl]phenyl}-N-(4-hydroxyphenyl)-N-(1-methyl-1H-indol-5-yl)-1-indolizine carboxamide,

6-{5-chloro-2-[((3S)-3-(4-morpholinylmethyl)-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinyl)-carbonyl]phenyl}-N-(3-fluoro-4-methylphenyl)-N-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]oxazine-8-carboxamide,

50