



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 029**

51 Int. Cl.:  
**C07D 321/00** (2006.01)  
**A61K 31/335** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00959287 .4**  
86 Fecha de presentación : **18.08.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1218368**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54 Título: **Composición y procedimientos para modular la apoptosis en células que sobreexpresan proteínas miembro de la familia Bcl-2.**

30 Prioridad: **20.08.1999 US 149968 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es:  
**Fred Hutchinson Cancer Research Center  
1100 Fairview Avenue N., M/S: C2M 027  
Seattle, Washington 98109-1024, US**

72 Inventor/es: **Hockenbery, David, M.;  
Simon, Julian, A. y  
Tzung, Shie-Pon**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 287 029 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición y procedimientos para modular la apoptosis en células que sobreexpresan proteínas miembro de la familia Bcl-2.

## Antecedentes de la invención

Las mitocondrias juegan un papel central mediando la apoptosis en una cantidad de modelos de apoptosis (Kroemer y col., Immunol. Today 18:44-51 (1997); Zamzami y col., J. Exp. Med. 183:1533-44 (1996); Zamzami y col., J. Exp. Med. 182:367-77 (1995)). Las células inducidas para sufrir apoptosis muestran una interrupción temprana del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) que precede otros cambios de apoptosis, tales como la fragmentación nuclear y exposición de fosfatidilserina en la parte externa de la membrana plasmática. Las mitocondrias aisladas o los productos liberados por las mitocondrias inducen la apoptosis nuclear en un sistema reconstituido libre de células (Liu y col., Cell 86:147-157 (1996); Newmeyer y col., Cell 79:353-364 (1994)).

Los experimentos previos indicaron que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  previa a la apoptosis incluye la apertura de poros mitocondriales de permeabilización mitocondrial (PT), que son canales de alta conductividad en la parte interna de la membrana mitocondrial que corresponden a megacanales mitocondriales identificados por medio de estudios electrofisiológicos (Kroemer y col., *supra*; Zamzami y col. (1996), *supra*; Bernardi y col., Biochim. et Biophys. Acta 1275:5-9 (1996); Zoratti y col., Biochim. et Biophys. Acta 1241:139-176 (1995); Petit y col., FEBS Letters 396:7-13 (1996)). De hecho, la inducción de PT es suficiente para provocar todo el espectro de cambios asociados con la apoptosis. Por el contrario, los agentes que previenen la apertura de poros PT, tales como el ácido bongkrékico, atenúan la apoptosis (Kroemer y col., Immunol. Today 18:44-51 (1997); Zamzami y col., J. Exp. Med. 183:1533-1544 (1996); Zamzami y col., FEBS Letters 384:53-57 (1996)).

Miembros de la familia de Bcl-2 conservada con la evolución son reguladores importantes de la supervivencia y de la muerte celular por apoptosis. Las proteínas Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 y Mcl-1 son antagonistas de muerte mientras que Bax, Bak, Bad, Bcl-xs, Bid, y son agonistas de muerte (Kroemer y col., Nature Med. 6:614-620 (1997)). Las proteínas miembros de la familia de Bcl-2 están localizadas predominantemente en la membrana mitocondrial externa, pero también se encuentran en la membrana nuclear y en el retículo endoplásmico (Kroemer y col., *supra*).

Entre las proteínas miembros de la familia de Bcl-2, hay varios motivos de aminoácidos conservados, BH1-BH4. Los miembros proapoptóticos de la familia, Bax y Bad, contienen un dominio de BH3 que es suficiente para inducir la muerte celular (Chittenden y col., EMBO J. 14:5589-5596 (1995); Hunter y col., J. Biol. Chem. 271:8521-8524 (1996)). Resulta interesante destacar que el dominio de BH3 está conservado en las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. Recientemente, se ha informado que la escisión de Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-2 en el dominio del bucle elimina el dominio N-terminal de BH4 y convierte Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-2 en una potente molécula promuerta (Cheng y col., Science 278:1966-1968 (1997); Clem y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:554-559 (1998)).

El análisis de estructura por RMN de un complejo entre Bcl-x<sub>L</sub> y un péptido de 16 residuos que abarca el dominio Bak de BH3 demostró que el péptido BH3, en una configuración anfipática alfa helicoidal, se une con elevada afinidad al bolsillo hidrófobo creado por los dominios BH1, BH2 y BH3 de Bcl-x<sub>L</sub> (Sattler y col., Science 275:983-986 (1997)). Se cree que la leucina en posición 1 del núcleo del dominio BH3 y el ácido aspártico en posición 6 son residuos críticos para la inducción de heterodimerización y apoptosis. Otro hecho en favor de esta conclusión es que se han identificado un número de promotores de muerte "sólo de BH3" que no tienen similitud con Bcl-2 más allá de su homología de dominio BH3 (Kelekar y col., Trends Cell Biol. 8:324-330 (1998)). Éstos incluyen Bik, Bim, Hrk, Bad, Blk, y Bid, que no pueden homodimerizar, pero dependen de la unión a proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 para inducir la muerte celular.

Los mecanismos exactos por los que Bcl-2 previene la apoptosis siguen resultando difíciles de entender. En vista de la importancia de las mitocondrias en la apoptosis y la localización mitocondrial de Bcl-2, parece que un sitio importante donde Bcl-2 interrumpe las señales apoptóticas es a nivel de las mitocondrias. Se ha demostrado que Bcl-2 inhibe la apoptosis previniendo la transición de permeabilidad mitocondrial y estabilizando el  $\Delta\Psi_m$  (Zamzami y col., J. Exp. Med. 183:1533-1544 (1996)). En ausencia de Bcl-2, se liberan desde las mitocondrias factores apoptogénicos, tales como citocromo c y factor inductor de apoptosis (FIA) en respuesta a disparadores de apoptosis (Susin y col., J. Exp. Med. 184:1331-1341 (1996); Kluck y col., Science 275:1132-1136 (1997)). Esta liberación a su vez lleva a la activación posterior de caspasa y da como resultado cambios nucleares y de membrana asociados con la apoptosis.

Los miembros de la familia de Bcl-2 muestran una expresión específica de tejidos diferente. En el hígado del ser humano adulto, la expresión de Bcl-2 está confinada a las células de los conductos biliares (Charlotte y col., Am. J. Pathol. 144:460-465 (1994)) y está ausente en hepatocitos normales y malignos. En contraste, puede detectarse expresión de ARN de Bcl-x<sub>L</sub> y proteína en hepatocitos quiescentes en humanos adultos y aumentan 4 a 5 veces durante la fase G1 de hepatocitos en regeneración (Tzung y col., Am. J. Pathol. 150:1985-1995 (1997)). También se observa expresión aumentada de Bcl-x<sub>L</sub> en líneas celulares de hepatoma, tales como HepG2.

Se cree que algunas enfermedades están relacionadas con la regulación negativa de la apoptosis en las células afectadas. Por ejemplo, las neoplasias pueden resultar, al menos en parte, de un estado de resistencia a la apoptosis

en el que las señales de proliferación celular exceden de manera inadecuada las señales de muerte celular. Además, algunos virus de ADN, tales como el virus de Epstein-Barr, el virus de la peste porcina Africana y adenovirus, parasitan la maquinaria celular del huésped para dirigir su propia replicación y al mismo tiempo modulan la apoptosis para reprimir la muerte celular y permitir que la célula diana reproduzca el virus. Más aún, ciertas enfermedades, tales como afecciones linfoproliferativas, cáncer (incluyendo cáncer resistente a fármacos), artritis, inflamación enfermedades autoinmunes, y similares, pueden resultar de una regulación negativa de señales de muerte celular. En tales enfermedades, sería deseable promover mecanismos apoptóticos.

La mayoría de los agentes quimioterápicos disponibles en la actualidad apuntan al ADN celular e inducen la apoptosis en células tumorales (Fisher y col., *Cell* 78:539-542 (1994)). Una sensibilidad disminuida a la inducción de la apoptosis ha surgido como un modo importante de resistencia a fármacos. En particular, la sobre expresión de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> confieren resistencia a múltiples agentes quimioterápicos, que incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de topoisomerasas, inhibidores de microtúbulos y antibióticos antitumorales, y pueden constituir un mecanismo de quimiorresistencia clínica en ciertos tumores (Minn y col., *Blood* 86:1903-1910 (1995); Decaudin y col., *Cancer Res.* 57:62-67 (1997)).

Sin embargo, ni Bcl-2 ni Bcl-x<sub>L</sub>, protegen a las células de cualquier inductor de apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de Bcl-2 brinda poca protección frente a la muerte de timocitos inducida por Thy-1 y a la muerte inducida por Fas (Hueber y col., *J. Exp. Med.* 179:785-796 (1994); Memon y col., *J. Immunol.* 15:4644-4652 (1995)). A nivel mitocondrial, la sobreexpresión de Bcl-2 en la membrana mitocondrial externa inhibe la inducción de poros PT por hidróperóxido de t-butilo, protonóforo y atracilósido, pero no por iones calcio, diamida o caspasa 1 (Zamzami y col., *J. Exp. Med.* 183:1533-1544 (1996); Susin y col., *J. Exp. Med.* 186:25-37 (1997)). Por consiguiente, una clase de agentes mitocondrialmente activos puede afectar directamente la maquinaria de apoptosis mitocondrial evitando el sitio de función de Bcl-2 y la protección brindada por los miembros de la familia de Bcl-2. Un agente de este tipo puede ser potencialmente útil para solucionar la resistencia a múltiples fármacos conferida por Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> y son muy necesarios en la técnica.

Las antimicinas constituyen otra clase de agentes mitocondrialmente activos. Las antimicinas comprenden generalmente un resto salicilato de N-formilamino unido a un anillo dilactona a través de un enlace amida. Las antimicinas difieren en los grupos R unidos al anillo dilactona opuestos al enlace amida. (Véase, G. Rieske, *Pharm. Ther.* 11:415-420 (1980)). Por ejemplo, antimicina A<sub>1</sub>, tiene un grupo hexilo en la posición 2 del anillo dilactona mientras que antimicina A<sub>3</sub> tiene un grupo butilo en esa posición. Se ha publicado mucha bibliografía sobre la relación entre estructura y actividad de las antimicinas y su inhibición de citocromo bc<sub>1</sub> (Miyoshi y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1229:149-154 (1995); Tokutake y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1142:262-268 (1993); Tokutake y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1185:271-278 (1994)). La estructura publicada del complejo de citocromo bc<sub>1</sub> con antimicina A<sub>1</sub> revela que la antimicina A<sub>1</sub> ocupa una posición en el sitio de unión de Qi ubiquinona en el citocromo b (Xia y col., *Proc. Nat Acad. Sci. USA* 94:11399-11404 (1997)). Las antimicinas generalmente inhiben la respiración mitocondrial, lo que sugiere que las diferencias en los grupos R hidrófobos en el anillo dilactona no son críticas para la unión de citocromo b. Los estudios de mutagénesis y de actividad-estructura de antimicina demostraron que la actividad inhibidora de citocromo bc<sub>1</sub> es altamente dependiente del resto de ácido salicílico de N-formilamino (Tokutake y col., (1994), *supra*). La metilación del hidroxilo fenólico o la modificación del grupo N-formilamino reducen significativamente la capacidad de antimicina A de unirse al citocromo bc<sub>1</sub> e inhibirlo. La metilación del hidroxilo fenólico disminuye la actividad inhibidora en 2,5 logs. La sustitución del grupo formilamino con grupos acetilamino y propilamino en la posición 3 reduce la actividad de citocromo bc<sub>1</sub> en 1,2 y 2,4 logs, respectivamente. Por consiguiente, se entiende que el resto salicilato de N-formilamino es importante para la unión de las antimicinas al citocromo b.

Se ha descubierto recientemente que dos antimicinas, antimicina A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub>, inhiben la actividad de las proteínas antiapoptóticas miembros de la familia de Bcl-2, Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub>. Por consiguiente, estas moléculas son compuestos potencialmente útiles para la profesión médica y para pacientes que sufren alguna enfermedad proliferativa y otras enfermedades en las que la apoptosis está regulada inadecuadamente. Sin embargo, las antimicinas son tóxicas porque inhiben también la respiración mitocondrial. Por consiguiente, existe una necesidad crítica de derivados de las antimicinas que sean eficaces induciendo la apoptosis en células en las que la apoptosis está inadecuadamente regulada y que a la vez exhiban una inhibición disminuida de la respiración mitocondrial.

## Resumen de la invención

La presente invención está definida en las reivindicaciones y está basada en el sorprendente descubrimiento de que las antimicinas pueden inhibir la actividad de las proteínas antiapoptóticas miembros de la familia de Bcl-2, tales como Bcl-2 o Bcl-c<sub>1</sub>. La invención también está basada en el descubrimiento de que la actividad inhibidora de la respiración mitocondrial de las antimicinas es separable de la inhibición de las proteínas miembros de la familia de Bcl-2.

La presente invención proporciona el uso de agentes que comprenden derivados de antimicinas que modulan la apoptosis por medio de la unión a una proteína miembro de la familia de Bcl-2 para fabricar un medicamento como se define en la reivindicación 1. Estos agentes exhiben una unión disminuida a citocromo B (o al complejo de citocromo bc<sub>1</sub>, denominado de aquí en adelante como "citocromo B") comparada con las antimicinas no derivatizadas. En una forma de realización, el agente induce de preferencia la apoptosis en células que sobreexpresan una proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2. En otra forma de realización, el agente es sustancialmente no tóxico para las células que no sobreexpresan la proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2. El agente típicamente inhibe

la actividad de una proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2 por medio de la unión al bolsillo hidrófobo formado por los dominios BH1, BH2 y BH3 de la proteína.

Los agentes comprenden derivados de una antimicina, o una porción de los mismos, tales como la modificación química del resto dilactona (por ejemplo, el resto 4,9-dioxo-1,5-dioxanan-7-il éster). En una forma de realización de preferencia, el derivado de antimicina comprende al menos dos modificaciones químicas. La modificación disminuye la afinidad del derivado de antimicina por el citocromo B y aumenta la afinidad del derivado de antimicina por una proteína miembro de la familia de Bcl-2.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden el agente para tratar a un sujeto en el que una célula sobreexpresa una proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2. Tales composiciones son útiles para tratar enfermedades o afecciones asociadas con la apoptosis como se definen en la reivindicación 1.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un esquema general para la síntesis química de antimicina A<sub>3</sub>, y para la síntesis de derivados de antimicinas.

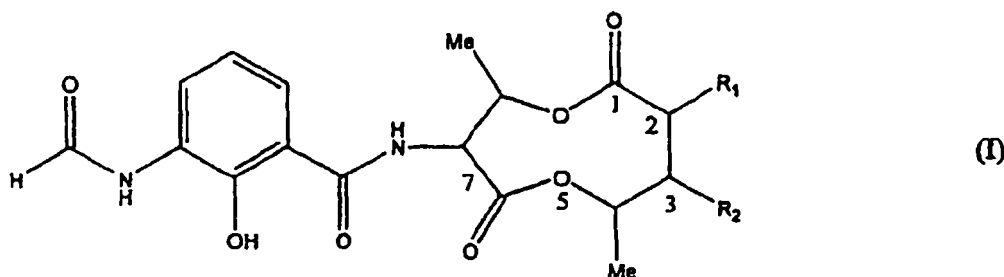
### Descripción de las formas de realización específicas

Previo a describir la invención con más detalle, resultará útil para su mayor comprensión, definir ciertos términos como se usan de aquí en adelante.

#### Definiciones

El término “apoptosis” se refiere a una red regulada de acontecimientos bioquímicos que llevan a una forma selectiva de suicidio celular, y se caracteriza por fenómenos bioquímicos y morfológicos fácilmente observables, tales como la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), condensación de la cromatina, que puede o no estar asociada con actividad de endonucleasas, migración de cromosomas, marginación en el núcleo celular, formación de cuerpos apoptóticos, hinchazón de mitocondrias, ensanchamiento de las crestas mitocondriales, apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial y/o disipación del gradiente de protones mitocondrial.

El término “antimicinas” se refiere a las antimicinas A<sub>0</sub> (a-d), A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub>, kitamicina A y B, urauquimicina B, deisovalerilblastomicina, y dehexil-deisovaleriloxi antimicina A. Las antimicinas se representan generalmente por la siguiente fórmula I, y tienen la configuración absoluta [2R, 3R, 4S, 7S, 8R]:



Los grupos en las posiciones R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> varían de la siguiente manera:

TABLA 1

Nombre	R1	R2
antimicina A <sub>0(a)</sub>	hexilo	ácido hexanoico
antimicina A <sub>0(b)</sub>	butilo	ácido heptanoico
antimicina A <sub>0(c)</sub>	octilo	ácido butanoico
antimicina A <sub>0(d)</sub>	heptilo	ácido isovalérico
antimicina A <sub>1</sub>	hexilo	ácido isovalérico
antimicina A <sub>2</sub>	hexilo	ácido butanoico
antimicina A <sub>3</sub>	butilo	ácido isovalérico

	antimicina A <sub>4</sub>	butilo	ácido butanoico
5	antimicina A <sub>5</sub>	etilo	ácido isovalérico
	antimicina A <sub>6</sub>	etilo	ácido butanoico
	kitamicina A	hexilo	hidroxilo
10	kitamicina B	isohexilo	hidroxilo
	urauquimicina B	isohexilo	hidroxilo
	diesovalerilblastomicina	butilo	hidroxilo
15	dehexil-deisovalerilblastomicina	hidrógeno	hidrógeno

El término “derivado de antimicina” se refiere a una modificación química de una antimicina, por la que se elimina(n) o sustituye(n) uno o más átomos de una antimicina, o se añaden átomos nuevos. Un “derivado de antimicina” además incluye porciones de una antimicina así como también modificaciones químicas de la misma, y variantes quirales de una antimicina.

El término “agente” se usa en este documento para indicar un compuesto químico, o una mezcla de compuestos químicos, sales y solvatos de los mismos, y similares, que son capaces de modular la actividad biológica de una proteína miembro de la familia de Bcl-2. Un agente comprende típicamente un derivado de antimicina.

El término “induce de preferencia” apoptosis se refiere a una estimulación de apoptosis al menos 5 veces mayor, a una concentración dada de un agente, en células que sobreexpresan una proteína miembro de la familia de Bcl-2 en comparación con células que no sobreexpresan la proteína miembro de la familia de Bcl-2 (por ejemplo, una DL<sub>50</sub> o CI<sub>50</sub> 5 veces mayor).

El término “sustancialmente no tóxico” se refiere a un agente que induce apoptosis en al menos aproximadamente 50 por ciento de las células que sobreexpresan una proteína miembro de la familia de Bcl-2, pero no induce apoptosis en más de aproximadamente 5%, de más preferencia menos que 1%, de las células que no sobreexpresan la proteína miembro de la familia de Bcl-2.

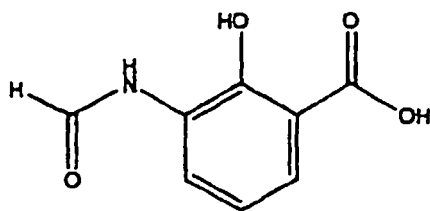
El término “proteína(s) miembro de la familia de Bcl-2” se refiere a una familia de proteínas conservada con la evolución caracterizada por tener uno o más dominios de homología de aminoácidos, BH1, BH2, BH3, y/o BH4. Las proteínas miembros de la familia de Bcl-2 incluyen, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1, Mcl-1, Bax, Bak, Bad, Bcl-xs y Bid. Las “proteínas miembros de la familia de Bcl-2” además incluyen esas proteínas, o sus fragmentos biológicamente activos, que tienen una similitud de menos 70% en la secuencia de aminoácidos a una proteína miembro de la familia de Bcl-2.

El término “proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2” se refiere a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1, Mcl-1, y otras proteínas caracterizadas por tener uno o más dominios de homología de aminoácidos, BH1, BH2, BH3, y/o BH4, y porque promueven la supervivencia celular atenuando o inhibiendo la apoptosis. Las “proteínas antiapoptóticas miembros de la familia de Bcl-2” además incluyen esas proteínas, o sus fragmentos biológicamente activos, que tienen una similitud de al menos 70% en la secuencia de aminoácidos a una proteína miembro de la familia de Bcl-2.

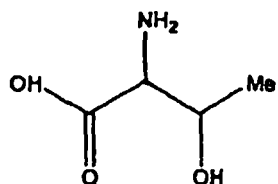
El término “biológicamente activa” o “actividad biológica” se refiere a la capacidad de una molécula para modular la apoptosis, tal como por medio de la unión a una proteína miembro de la familia de Bcl-2. Una molécula biológicamente activa puede modular la apoptosis causando un cambio en el gradiente mitocondrial de protones, causando un cambio en el hinchamiento mitocondrial o en las características morfológicas de las mitocondrias, afectando la liberación de una molécula indicadora, tal como, por ejemplo, rodamina 123 o calceína, desde mitocondrias o vesículas que comprenden una proteína antiapoptótica miembro de la familia de Bcl-2 formadora de poros o causando cualquier otro cambio morfológico asociado con la apoptosis.

Los derivados de antimicina pueden prepararse modificando químicamente una antimicina según procedimientos químicos convencionales. Por ejemplo, puede modificarse el grupo hidroxilo en el resto salicilato de antimicina A<sub>3</sub> usando un haluro de alquilo primario o diazometano para formar un derivado de antimicina 2-alcoxiéter (por ejemplo, 2-metoxiéter antimicina A<sub>3</sub>). Una antimicina puede también modificarse por acetilación.

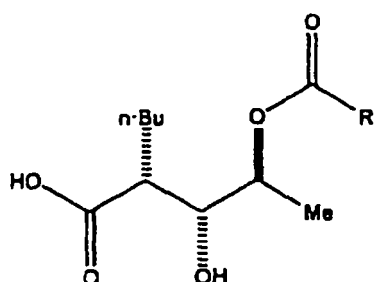
Como alternativa, pueden prepararse derivados de antimicina por medio de síntesis química (“total”) *de novo*. Por ejemplo, Shimano y col., (Tetrahedron 54:12745-12774 (1998), idearon un procedimiento sintético total para las dilactonas antifúngicas relacionadas UK-2A y UK-3A. Esta síntesis total puede usarse para preparar derivados de antimicina. Según este procedimiento, puede modelarse antimicina A<sub>3</sub> comprendiendo tres unidades estructurales: ácido N-formil-3-aminosalicílico, L-treonina, y el resto dilactona. (Véase las fórmulas III-V, respectivamente).



(III)



(IV)



(V)

La antimicina A3 puede sintetizarse uniendo estas unidades estructurales. Los derivados de una o más de estas unidades estructurales pueden unirse químicamente para formar derivados de antimicina.

Pueden prepararse también bibliotecas de derivados de antimicina mediante diseño racional. (Véase generalmente, Cho y col., *Pac. Symp. Biocompat.* 305-316 (1998); Sun y col., *J. Comput. Aided Mol. Des.* 12:597-604 (1998)). Por ejemplo, pueden prepararse bibliotecas de derivados de antimicina mediante síntesis de bibliotecas combinatorias químicas (véase generalmente DeWitt y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993); Publicación de Patente Internacional WO 94/08051; Baum, *Chem. & Eng. News*, 72:20-25 (1994); Burbaum y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:6027-6031 (1995); Baidwin y col., *J. Am. Chem. Soc.* 117:5588-5589 (1995); Nestler y col., *J. Org. Chem.* 59:4723-4724 (1994); Borehardt y col., *J. Am. Chem. Soc.* 116:373-374 (1994); Ohlmeyer y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926 (1993); y Longman, *Windhover's In Vivo The Business & Medicine Report* 12:23-31 (1994)).

Los siguientes artículos describen procedimientos para seleccionar moléculas de partida y/o criterios usados en su selección: Martin y col., *J. Med. Chem.* 38:1431-1436 (1995); Domine y col., *J. Med. Chem.*, 37:973-980 (1994); Abraham y col., *J. Pharm. Sci.* 83:1085-1100 (1994).

Una "biblioteca combinatoria" es una colección de compuestos en la que los compuestos que comprenden la colección están compuestos de uno más tipos de subunidades. Las subunidades pueden seleccionarse de restos naturales o no naturales, que incluyen dienos, compuestos de benceno, cicloalcanos, lactonas, dilactonas, aminoácidos, alcanos, y similares. Los compuestos de la biblioteca combinatoria difieren en una o más formas con respecto al número, orden, tipo o tipos de modificaciones hechas a una o más de las subunidades que comprenden los compuestos. Como alternativa, una biblioteca combinatoria puede referirse a una colección de "moléculas centrales" que varían en el número, tipo o posición de los grupos R que contienen y/o la identidad de moléculas que componen la molécula central. La colección de compuestos se genera de una manera sistemática. Cualquier procedimiento para generar sistemáticamente una colección de compuestos que difieren uno del otro en una o más de las formas descritas anteriormente es una biblioteca combinatoria.

Puede sintetizarse una biblioteca combinatoria en un soporte sólido a partir de uno o más materiales de partida de resinas unidas a fase sólida. La biblioteca puede contener cinco (5) o más, de preferencia diez (10) o más, moléculas orgánicas diferentes una de otra (es decir, cinco (5) moléculas diferentes y no (5) copias de la misma molécula). Cada una de las diferentes moléculas (diferente estructura básica y/o diferentes sustituyentes) estarán presentes en una cantidad tal que su presencia pueda determinarse mediante algún medio (por ejemplo, pueda aislarse, analizarse, detectarse con una pareja de unión o sonda adecuada). Las cantidades reales necesarias de cada molécula diferente para que su presencia pueda determinarse pueden variar debido a los procedimientos reales usados y pueden cambiar según avanzan las tecnologías de aislamiento, detección y análisis. Cuando las moléculas están presentes en cantidades sustancialmente equimolares, puede detectarse una cantidad de 100 picomoles o más. Las bibliotecas de preferencia comprenden cantidades sustancialmente equimolares de cada producto de reacción deseado y no incluyen cantidades

relativamente grandes o pequeñas de cualquier molécula dada de manera que la presencia de tales moléculas dominen o estén completamente suprimidas en cualquier ensayo.

Las bibliotecas combinatorias se preparan generalmente derivatizando un compuesto de partida sobre un soporte de fase sólida (tal como una perla). En general, el soporte sólido tiene una resina unida comercialmente disponible, tal como una Resina de Rink o de Merrifield. Tras unir el compuesto de partida, se unen los sustituyentes al compuesto de partida. Por ejemplo, puede unirse un compuesto de benceno a un soporte a través de una resina de Rink. Se hace reaccionar el anillo benceno simultáneamente con una amida, tal como un N-formilamino, N-acetilamino, N-propionilamino, y similar. Como alternativa, el compuesto de partida puede comprender el resto dilactona, o un precursor del mismo. Los sustituyentes se añaden al compuesto de partida, y pueden variarse proporcionando una mezcla de reactivos que comprenden los sustituyentes. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

(1) sustituyentes hidrocarburo, esto es, sustituyentes alifáticos (por ejemplo, alquilo o alquenilo), alicíclicos (por ejemplo, cicloalquilo, cicloalquenilo), núcleos aromáticos sustituidos con aromáticos, alifáticos y alicíclicos, y similares, así como también sustituyentes cíclicos;

(2) sustituyentes hidrocarburo sustituido, esto es, aquellos sustituyentes que contienen radicales no hidrocarburo que no alteran el sustituyente hidrocarburo predominante; aquellos expertos en la técnica conocerán tales radicales (por ejemplo, halo (especialmente cloro y fluoro), alcoxi, mercapto, alquilmercapto, nitro, nitroso, sulfoxi, y similares);

(3) heterosustituyentes, esto es, sustituyentes que, teniendo carácter predominantemente hidrocarburo, contendrán otros átomos diferentes de carbono. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, oxígeno, nitrógeno, y tales sustituyentes como piridilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, y similares. Los heteroátomos, y típicamente no más de uno, estarán presentes para cada átomo de carbono en los sustituyentes basados en hidrocarburo. Como alternativa, puede no haber tales radicales o heteroátomos en el sustituyente basado en hidrocarburo y será, por consiguiente, puramente hidrocarburo.

En una forma de realización, se prepara una biblioteca combinatoria de derivados de antimicina. Por ejemplo, el compuesto de partida puede ser un precursor del resto dilactona. Se sintetiza una biblioteca combinatoria de la dilactona usando la síntesis de Shimano (infra) variando los sustituyentes añadidos en cada etapa de la síntesis. Opcionalmente, tras la lactonización, se añaden a la biblioteca los restos treonina y ácido salicílico, o derivados de los mismos.

Los procedimientos para generar bibliotecas combinatorias son conocidos en la técnica, e incluyen los siguientes: Patentes de EEUU N° 5.958.792; 5.807.683; 6.004.617; 6.077.954.

Los agentes de la presente invención son útiles para tratar células en las que la señal de muerte celular está regulada negativamente y la célula afectada tiene una propensión inadecuadamente disminuida para la muerte celular, a las que se denomina de aquí en adelante como estando en un "estado apoptótico disminuido". La invención además proporciona medicamentos para administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente para tratar una enfermedad asociada con la apoptosis en la que resulta deseable inducir la apoptosis en ciertos tipos de células, tales como células infectadas con virus o que expresan autoanticuerpos. Típicamente, el agente se purifica sustancialmente previamente a la administración. El sujeto puede ser un animal, que incluye pero no se limita a, vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, y similares, y es típicamente un mamífero, y en una forma de realización particular, un ser humano. En otra forma de realización específica, el sujeto es un mamífero diferente de un ser humano.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un agente, tales como, por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el agente, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), y similares. Los agentes se administran como composiciones terapéuticas o farmacéuticas mediante cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica que incluyen, por ejemplo, vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, transdérmica, intratecal, intracerebral, intraperitoneal, epidural y otras. La administración puede ser rápida como por inyección o durante un período de tiempo como por medio de infusión lenta o inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuando la intención es administrar un agente a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más componentes capaces de promover la penetración del agente a través de la barrera hematoencefálica. Además, puede resultar deseable introducir un agente en el tejido blanco por cualquier vía adecuada, que incluye inyección intravenosa e intratecal. Puede usarse también administración intrapulmonar, tal como, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación del agente con un agente generador de aerosol.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse también por vía oral en cualquier forma de dosificación oral aceptable incluyendo, pero no limitado a, cápsulas, comprimidos, píldoras, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. Las ayudas de lubricación, tales como estearato de magnesio, también se añaden típicamente. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se necesitan suspensiones acuosas, el agente puede combinarse con ayudantes emulsivos y de suspensión. Si se desea, pueden usarse también algunos edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

En una forma de realización específica, puede resultar deseable administrar el agente localmente al área que necesita tratamiento; esta administración puede lograrse, por ejemplo, pero no limitado a, infusión local durante una cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, en combinación con un apósito para heridas tras la cirugía), por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, que incluye membranas tales como membranas o fibras de silástico. En una forma de realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o antiguo sitio) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.

En otra forma de realización, el agente puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat y col., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *supra*, pág. 317-327).

En otra forma de realización más, el agente puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, puede usarse una bomba (véase, por ejemplo, Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald y col., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek y col., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy y col., *Science* 228:190 (1985); During y col., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En otra forma de realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica, lo que requiere sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, Vol. 2, pág. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en, por ejemplo, la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

La presente invención también proporciona el uso de composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o de un estado o que figura en la Farmacopea de EEUU y otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más típicamente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, estabilizante, o transportador con el que se formula el agente para su administración. Los vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen animal, vegetal o de petróleo o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. El agua es un vehículo típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Pueden usarse también como vehículos líquidos soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y de glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. La composición puede, si se desea, contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsivos, o agentes tamponadores de pH. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con ligantes y vehículos convencionales tales como triglicéridos.

Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables están descritos en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente, típicamente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar una formulación apropiada para administrar al sujeto. La formulación deberá adaptarse al modo de administración.

En una forma de realización, el agente se formula de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso estéril. Cuando es necesario, la composición puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proveen por separado o mezclados juntos en formas de dosificación de monodosis. Por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsa que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición debe administrarse por infusión, puede administrarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse también una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, para poder mezclar los ingredientes previo a la administración.

Los agentes pueden formularse como formas neutras o como sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con los grupos amino libres tales como aquellas que derivan de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, y similares, y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como aquellas que derivan de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, y férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

La cantidad del agente que se combina con el vehículo para producir una forma de monodosis variará, dependiendo de la naturaleza del agente y la composición de la forma de dosificación. Deberá entenderse, sin embargo, que una dosis específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente particular, o estado de enfermedad dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, el juicio del médico tratante, y la gravedad de la enfermedad particular que se trata. La cantidad de agente activo dependerá también de la actividad específica del agente y de si el agente se administra conjuntamente con algún otro ingrediente terapéutico o profiláctico. Son útiles los niveles de dosificación de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día del agente activo.

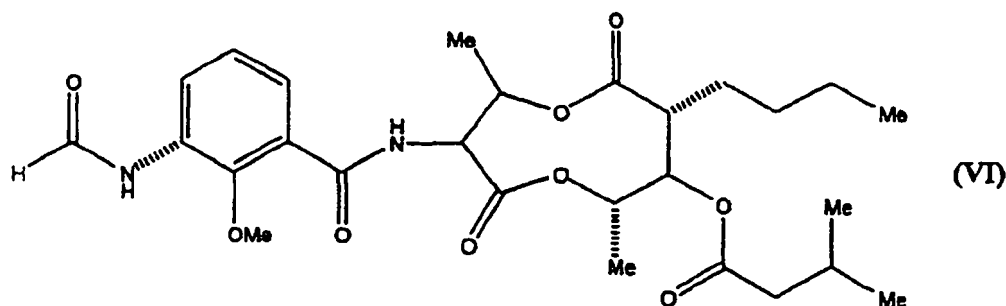
El medicamento puede estar en la forma de un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente puede haber junto con tal(es) recipiente(s) una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicha nota la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo como ilustrativos de diversos aspectos de la invención y no deben interpretarse como limitantes de la invención.

#### Ejemplo 1

Los estudios de respiración celular, niveles de ATP y especies reactivas de oxígeno en líneas celulares tratadas con antimicina A sugieren fuertemente que las diferencias observadas en la viabilidad celular no pueden explicarse por los efectos conocidos de antimicina A en la transferencia de electrones en mitocondrias o la fosforilación oxidativa. Para abordar definitivamente qué actividades de antimicina A están involucradas en la muerte celular selectiva de células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub>, se determinó la relación entre estructura y actividad para antimicina A<sub>3</sub> como un inhibidor de la actividad de poro de Bcl-x<sub>L</sub>.

En este ejemplo, se prepararon dos derivados de antimicina A<sub>3</sub>, metiléter de antimicina A<sub>3</sub> (2-metoxiéter antimicina A<sub>3</sub>) y fenaciléter de antimicina A<sub>3</sub> (ejemplo comparativo). La estructura de antimicina A<sub>3</sub> se mostró anteriormente (fórmula (I), donde R<sub>1</sub> es un grupo butilo). (Véase también van Tamelen y col., J. Am. Chem. Soc. 83:1639 (1961)). El metiléter de antimicina A tiene la siguiente fórmula (VI) y una configuración absoluta de [2R, 3R, 4S, 7S, 8R]:



El metiléter de antimicina A<sub>3</sub> se prepara directamente a partir de antimicina A<sub>3</sub> de la siguiente manera: Brevemente, se disolvió antimicina A<sub>3</sub> en éter dietílico y se hizo pasar una corriente de diazometano a través de la mezcla de reacción hasta persistencia del color amarillo. Se trató la mezcla de reacción con ácido acético hasta que se tornó incolora. Se redujo la mezcla hasta sequedad bajo presión reducida y se sometió a cromatografía en gel de sílice dando 14,3 mg de metiléter de antimicina A<sub>3</sub>. El producto resultante se caracterizó por RMN, espectroscopía infrarroja y espectroscopía de masas.

El derivado fenaciléter de antimicina A<sub>3</sub> se preparó de la siguiente manera: Se trató una solución de antimicina A<sub>3</sub> (5,7 mg, 10,95 mmol) en acetonitrilo seco con bromuro de fenacilo (4,4 mg, 21,9 mmol) y carbonato de potasio pulverizado (6,0 mg, 43,8 mmol). Se dejó la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Se aplicó la mezcla de reacción directamente a una columna de cromatografía en gel. Se eluyó el producto con acetato de etilo al 20%/hexano dando 5,4 mg (78%) del producto como un aceite incoloro. El producto resultante se caracterizó por RMN, espectroscopía infrarroja y espectroscopía de masas.

#### Ejemplo 2

Se estudió el derivado metiléter de antimicina A<sub>3</sub> preparado en el Ejemplo 1 para determinar su efecto en la vía apoptótica en células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub>. El derivado metiléter mostró previamente ser inactivo como inhibidor de citocromo bc<sub>1</sub>. (Véase, por ejemplo, Miyoshi y col., Biochim Biophys Acta 1229:149-154 (1995); Takotake y col., Biochim Biophys Acta 1185:271-278 (1994)). El metiléter tiene también un efecto insignificante en el consumo celular de O<sub>2</sub> comparado con el compuesto original antimicina A<sub>3</sub>. Se trataron líneas celulares TABX2S (que sobreexpresan

## ES 2 287 029 T3

Bcl-x<sub>L</sub>), TAMH.neo (control) y TABX1A (antisentido) con 2-metoxi antimicina A<sub>3</sub>. Estas líneas celulares exhibieron un patrón de citotoxicidad preferencial para células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub>, pero no para las células de control. Este patrón fue similar al del tratamiento de estas líneas celulares con antimicina A<sub>3</sub>, lo que indica que el efecto de este derivado de antimicina sobre la respiración celular fue separable del efecto sobre la apoptosis.

Para confirmar estos datos, se llevaron a cabo también ensayos con fracciones mitocondriales de cada línea celular usando la sonda mitocondrial JC-1. Las mitocondrias de células que sobreexpresan Bcl-x<sub>L</sub> (células TABX2S) se despolarizaron fuertemente tras añadir el derivado 2-metoxi a una concentración de 2 µg/ml. Como se observa para el compuesto relacionado, antimicina A<sub>3</sub>, las mitocondrias con niveles normales de expresión de Bcl-x<sub>L</sub> no fueron afectadas por el análogo 2-metoxi.

Finalmente, el derivado 2-metoxi antimicina A<sub>3</sub> demostró que se une a Bcl-2 recombinante. El derivado 2-metoxi antimicina A<sub>3</sub> no es fluorescente debido al sustituyente electrófilo adicional en el anillo benceno. Por consiguiente, la unión de 2-metoxi antimicina A<sub>3</sub> a la proteína Bcl-2 puede medirse en un ensayo de unión competitiva controlando la fluorescencia de antimicina A<sub>3</sub>. Para estos experimentos, se añadieron antimicina A<sub>3</sub> (2 µM) y ya sea 2-metoxiéter antimicina A<sub>3</sub> o fenaciléter antimicina A<sub>3</sub> (2 µM) simultáneamente al polipéptido de Bcl-2 (3 µM) y se dejó equilibrar durante 7,5 minutos a 22,5°C previo a medir la intensidad de fluorescencia de antimicina A<sub>3</sub>. La fluorescencia de un complejo antimicina A<sub>3</sub>-Bcl-2 recombinante unido previamente disminuyó exponencialmente con el añadido de 2-metoxi antimicina A<sub>3</sub>, lo que indica competición por el sitio de unión de antimicina A<sub>3</sub> en Bcl-2. Como otro control para especificidad de unión, se probó también el efecto del derivado fenaciléter de antimicina A<sub>3</sub>. Estos resultados sugieren firmemente que la sensibilidad celular y mitocondrial a la antimicina A<sub>3</sub> en líneas celulares que expresan Bcl-x<sub>L</sub> son el resultado de la unión directa de antimicina A<sub>3</sub> con la proteína Bcl-x<sub>L</sub>. Además, el derivado 2-metoxiéter de antimicina A<sub>3</sub> inhibió la formación de poros de Bcl-x<sub>L</sub> en un ensayo de permeabilidad de liposomas tan bien como la antimicina A<sub>3</sub>.

Los resultados demuestran que las antimicinas tienen dos actividades de unión a proteínas estructuralmente distinguibles, una para unión a citocromo bc<sub>1</sub>, y la otra para unión a proteínas miembros de la familia de Bcl-2, y que estas actividades son separables.

### Ejemplo 3

La síntesis total de antimicina A<sub>3</sub> se lleva a cabo esencialmente como describe Shimano para las dilactonas relacionadas UK-2A y UK-3A (Shimano, Tetrahedron 5412745-12774 1998). Brevemente, la antimicina A<sub>3</sub> está compuesta por tres unidades estructurales: un ácido N-formil-3-aminosalicílico, L-treonina y ácido 2-butil-3,4-dihidroxipentanoico. De los tres componentes estructurales, el ácido N-formil-3-aminosalicílico y la L-treonina están disponibles comercialmente. El ácido dihidroxipentanoico se prepara en una secuencia de reacciones de cuatro etapas comenzando con cloruro de caproilo. En referencia a la Figura 1, se hace reaccionar cloruro de caproilo con la oxazolidinona derivada de valina de Evans, (R)-4-isopropiloxazolidin-2-ona, y n-butil-Li (Etapa a). El aducto resultante (2) se hace reaccionar por condensación de aldol con un aldehído quiral derivado de ácido (S)-(-)-láctico (3) en presencia de dibutil-BOTf y trietilamina (Etapa b). Se protege el grupo 4-hidroxilo del aducto resultante (4) como un éter de t-butildimetilsililo (usando cloruro de TBS y DIEA), seguido por la hidrólisis mediada por peróxido (usando peróxido de hidrógeno e hidróxido de litio) del auxiliar quiral dando el ácido dihidroxipentanoico protegido de manera diferencial (5) (Etapas c y d). La protección diferencial de los dos alcoholes secundarios permite la incorporación de diversos ácidos carboxílicos en la posición 3 de la lactona. El ácido carboxílico se acopla al benciléster de N-FMOC-L-treonina con cloruro de BOP y DMAP (Etapa e). La eliminación de dos grupos protectores bencilo con H<sub>2</sub> y Pd/O dará el seco-ácido de dilactona (6) (Etapa f). La lactonización se produce usando una reacción formadora de éster mediada por BOP-Cl con DMAP (Etapa g). Se usa dietilamina para eliminar el grupo protector de FMOC dando la dilactona (7) (Etapa h). Se acopla el ácido N-formil-3-aminosalicílico a la dilactona usando química convencional de carbodiimida (Etapa i). En particular, se combina la dilactona con ácido N-formil-3-aminosalicílico usando EDCl y HOBT, seguido por el tratamiento con TBAF. La elaboración final de la estructura de antimicina A<sub>3</sub> derivatizada se realiza por eliminación mediada por fluoruro del grupo protector de sililo y acoplamiento cloruro ácido deseado (por ejemplo cloruro de isovalerilo y DIEA) (Etapas j y k).

### Ejemplo 4

Para preparar derivados de antimicina A<sub>3</sub> modificados en el resto isovalerato (es decir, R<sub>2</sub>) de la dilactona, la síntesis total de antimicina A<sub>3</sub> (como se describió en el Ejemplo 3) se lleva a cabo con las siguientes modificaciones: Tras la dilactonización, se sustituye el cloruro de isovalerilo por otro cloruro de acilo, tal como cloruro de acetilo, cloruro de butirilo, y similar.

### Ejemplo 5

Para preparar derivados de antimicina A<sub>3</sub> en los que el grupo butilo (es decir, R<sub>1</sub>) en la dilactona está sustituido con otro grupo R, la síntesis total de antimicina A<sub>3</sub> (como se describió en el Ejemplo 3) se lleva a cabo con las siguientes modificaciones: Se sustituye el cloruro de caproilo de la etapa 1 con otro cloruro de acilo, tal como cloruro de propionilo y otro cloruro de acilo lineal o ramificado.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de antimicina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la apoptosis seleccionada del grupo constituido por neoplasias, afecciones linfoproliferativas, cáncer y cáncer resistente a fármacos, en el que dicho derivado de antimicina se selecciona del grupo constituido por antimicina A<sub>0(a)</sub>, antimicina A<sub>0(b)</sub>, antimicina A<sub>0(c)</sub>, antimicina A<sub>0(d)</sub>, antimicina A<sub>1</sub>, antimicina A<sub>2</sub>, antimicina A<sub>3</sub>, antimicina A<sub>4</sub>, antimicina A<sub>5</sub>, antimicina A<sub>6</sub>, kitamicina A, kitamicina B, urauquimicina B, deisovalerilblastomicina, y dehexil-deisovalerilblastomicina; con la condición de que el grupo hidroxilo en el anillo benceno esté reemplazado con un grupo metoxi.

10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el derivado de antimicina es 2-metoxiéter antimicina A o A<sub>3</sub>.

15 3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el medicamento además comprende un vehículo farmacéutico.

4. El uso de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el medicamento está formulado para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intradérmica, transdérmica, intratecal, intracerebral, intraperitoneal, epidural u oral.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

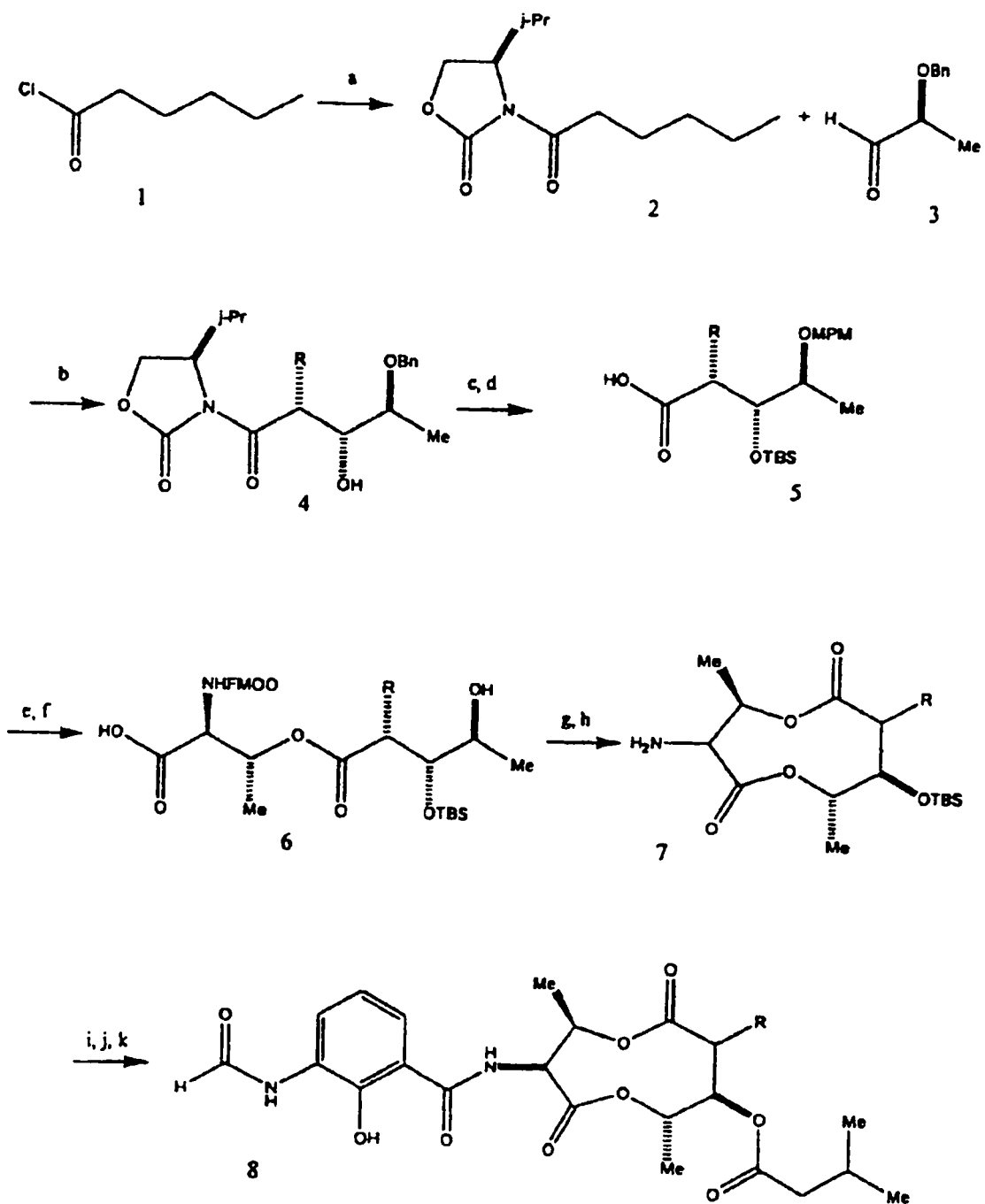


Fig. 1

# ES 2 287 029 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fred Hutchinson Cancer Research Center  
Hockenbery, David M.  
5 Simon, Julian A.  
Tzung, Shie-Pon

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA MODULAR LA APOPTOSIS EN CÉLULAS QUE SO-  
10 BREEXPRESAN PROTEÍNAS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE Bcl-2

<130> 14538A-004610PC  
<140>  
15 <141>

<150> 60/149.968  
<151> 20-08-1999  
20

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1  
25

<210> 1  
<211> 16  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido  
35

<400> 1

40 Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg  
1 5 10 15

45

50

55

60

65