

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 922 898**

(51) Int. Cl.:

**C07D 413/14** (2006.01)  
**C07D 403/14** (2006.01)  
**A61K 31/553** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2017 PCT/US2017/040866**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18009638**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2017 E 17740578 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022 EP 3481822**

---

(54) Título: **Inhibidores multifuncionales de las rutas biológicas de MEK/PI3K y mTOR/MEK/PI3K y métodos terapéuticos que usan los mismos**

(30) Prioridad:

**06.07.2016 US 201662359001 P  
03.02.2017 US 201762454163 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.09.2022**

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)  
Office of Technology Transfer 1600 Huron Parkway, 2nd Floor Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

(72) Inventor/es:

**ROSS, BRIAN, D. y VAN DORT, MARCIAN**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 922 898 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

Inhibidores multifuncionales de las rutas biológicas de MEK/PI3K y mTOR/MEK/PI3K y métodos terapéuticos que usan los mismos

5           **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/452.163, presentada el 3 de febrero de 2017 y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/359.001, presentada el 6 de julio de 2016.

10           **Campo de la invención**

15           La presente invención se refiere a inhibidores multifuncionales, incluyendo inhibidores bifuncionales, inhibidores trifuncionales e inhibidores tetrafuncionales de mTOR, MEK y PI3K, y a usos terapéuticos para tratar afecciones y enfermedades en donde la inhibición de uno o más de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio. Los presentes inhibidores multifuncionales son útiles como agentes para la terapia contra el cáncer, o bien solos o bien en combinación con radiación y/o agentes quimioterápicos.

20           **Antecedentes de la invención**

25           La hiperactivación aberrante de KRAS desempeña un papel destacado en el inicio y la progresión de los tumores en un amplio espectro de cánceres humanos. Las mutaciones de KRAS comprenden el 86 % de todas las mutaciones de RAS y están asociadas con la frecuencia más alta, aproximadamente el 22 %, de todos los tumores malignos humanos (1). La incidencia de mutaciones de KRAS es especialmente alta en tumores malignos pancreáticos y colorrectales, donde se produce a una frecuencia de más del 90 % y más del 40 %, respectivamente. Los cánceres pancreático y colorrectal se encuentran entre los más letales de todos los cánceres y son la cuarta y tercera causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos (2). Aproximadamente el 80 % de todos los casos de cáncer pancreático se presentan con enfermedad localmente avanzada o metastásica, lo que impide la intervención quirúrgica. Actualmente, 30           no existen opciones curativas para el tratamiento de cánceres activados por KRAS. Las opciones de tratamiento para pacientes mutantes para KRAS con cáncer colorrectal metastásico en los que no ha funcionado la quimioterapia de primera línea con una fluoropirimidina y oxaliplatino también son limitadas.

35           La invasión, motilidad y metástasis de células tumorales es una causa significativa de mortalidad de pacientes con cáncer. El proceso de metástasis tumoral resulta debido a una serie compleja de procesos (36). Estudios han notificado que la ruta de PI3K/Akt está implicada significativamente en la progresión y metástasis tumorales (37). Además, se ha notificado que los inhibidores de MEK así como PI3K son eficaces en la regulación por disminución de fenotipos prometástasis en células tumorales (38). Inhibidores que median en el bloqueo de la quinasa MAPK (MEK), que está aguas abajo de BRAF en la ruta de MAPK y se ha asociado con una supervivencia libre de progresión y global mejorada en pacientes con melanoma BRAF V600 (que comprenden mutaciones tanto V600E como V600K) (39, 40). En conjunto, se ha establecido la inhibición de las rutas de proteína quinasa activada por mitógeno (Ras/Raf/MEK/ERK) y fosfoinosítido 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) con capacidades de motilidad e invasivas (metastásicas) reducidas (41, 42). Por lo tanto, los agentes dirigidos molecularmente contra las rutas de señalización de Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt son importantes para la inhibición del crecimiento y la metástasis de 45           células tumorales. Se anticipa que la inhibición de la migración, invasión y metástasis de células tumorales a través de la supresión doble de las rutas de Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt desempeña un papel clave en la mejora de los regímenes de terapia contra el cáncer. Los compuestos que seleccionan como diana simultáneamente las rutas de Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt deben proporcionar una inhibición mejorada de los fenotipos invasivos y los procesos prometastásicos para el tratamiento de enfermedad primaria y metastásica conduciendo a una disminución de la mortalidad de los pacientes.

55           Los esfuerzos para desarrollar fármacos que seleccionen como diana directamente KRAS mutante siguen suponiendo un reto porque las cuestiones de especificidad son problemáticas. En consecuencia, los esfuerzos en la intervención farmacológica de la señalización de KRAS se han centrado intensamente en los últimos años en dianas aguas abajo en las dos rutas efectoras centrales de RAS, RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR (3, 4). RAF y MEK han generado varios programas de descubrimiento de fármacos que han dado como resultado candidatos clínicos atractivos (5-7). La actividad clínica de los inhibidores de BRAF probablemente estará restringida a pacientes con tumores mutados para BRAF porque la ausencia de una mutación de BRAF está asociada con inducción, en lugar de inhibición, de la señalización de MAPK en respuesta a este enfoque dirigido (8-10). Por el contrario, se ha demostrado que los inhibidores de MEK ejercen efectos antiproliferativos en aproximadamente la mitad de los tumores mutantes para KRAS sometidos a prueba (11). Es prometedor que el inhibidor de MEK CI-1040, así como trametinib, hayan provocado ambas respuestas objetivas en las pruebas de fase 1 (12, 13). Por lo tanto, la inhibición de MEK es un enfoque viable para el tratamiento de cánceres activados por KRAS, pero en un entorno de monoterapia, es poco probable que la inhibición de MEK produzca el grado de actividad necesario para producir un impacto significativo en el resultado en 60           esta población de pacientes resistentes.

Una estrategia para mejorar la actividad de agente individual de inhibidor de MEK es la selección como diana adicional de la señalización de PI3K. Esta estrategia de combinación se basa en pruebas *in vitro* e *in vivo* que sugieren que los tumores mutantes para KRAS requieren una inhibición doble de las rutas de MAPK y PI3K para lograr la inhibición máxima del crecimiento tumoral (11, 14-16). Se ha demostrado que la liberación de bucles de retroalimentación negativa conduce a la activación de la ruta alternativa cuando se inhibe una cualquiera (16, 17). La activación de la ruta de PI3K, comúnmente debido a mutaciones de PI3KCA o pérdida de PTEN, representa un mecanismo de resistencia importante a la terapia con inhibidores de MEK en cánceres mutantes para KRAS. La inhibición combinada de ambas rutas conduce a un aumento significativo en la apoptosis y el encogimiento tumoral (18).

- 5        Debido a que la ruta de transducción de señales de RAS/RAF/MEK/ERK se activa en un porcentaje significativo de las formas más agresivas y mortales de los cánceres humanos, varios inhibidores de molécula pequeña que seleccionan como diana esta ruta o bien han sido aprobados por la FDA o bien están en desarrollo clínico activo. Desafortunadamente, a pesar de la eficacia clínica de un inhibidor de BRAF disponible comercialmente, es decir, PLX4032 o vemurafenib, en el tratamiento de tumores que portan ambas mutaciones activantes de BRAF y KRAS, el fármaco es ineficaz contra tumores con BRAF nativo debido a la inducción paradójica de la señalización de ERK.

10      Por tanto, en la técnica se conocen inhibidores de mTOR, MEK y PI3K. Por ejemplo, likura *et al.* patente estadounidense n.º 7.897.792 dan a conocer una clase de inhibidores de MEK a base de cumarina. Se dan a conocer inhibidores de PI3K, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.os 2010/0249099; 2011/0009405; y 2011/0053907. Se da a conocer el uso combinado de inhibidores de PI3K y MEK para tratar el cáncer de pulmón, por ejemplo, en Engelman *et al.*, *Nature Medicine*, vol. 14, número 14, páginas 1351-56 (2008).

15      También se conocen inhibidores de mTOR en la técnica, por ejemplo, en los documentos WO 2006/122806, WO 2010/003816, la patente estadounidense n.º 9.284.315 y el documento WO 2012/068106. En algunas realizaciones, un inhibidor de la técnica anterior es un inhibidor doble de mTOR y PI3K.

20      La modulación de los componentes distales de la ruta de PI3K también se ha implicado en una amplia variedad de otros procesos patológicos, incluyendo infecciones y enfermedades inmunitarias/inflamatorias caracterizadas por la destrucción de tejido (27). Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un problema de salud mundial importante. 25     Se sabe que cascadas de señalización intracelular que incluyen, por ejemplo, las proteínas quinasas activadas por mitógeno p38 y ERK, son importantes en la regulación de la metaloproteína de la matriz (MMP) (28). La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) se reconoce cada vez más como una cascada de señalización clave que está implicada en la regulación de diversas respuestas inflamatorias (29, 30, 31). La señalización de PI3K es vital para la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-10 de monocitos, mientras que la regulación por incremento de quimiocinas inducida por Mtb puede inhibirse por inhibidores de PI3K (32). PIP3, el producto aguas abajo de la actividad de PI3K, también se requiere para la maduración de fagosomas micobacterianos (33). La inhibición de AKT puede producir un efecto supresor global sobre la secreción y la expresión génica de las MMP y el crecimiento intracelular de Mtb se evita mediante la inhibición de AKT (34), y se ha encontrado que la inhibición farmacológica de AKT reduce los niveles de infección micobacteriana (35). Los compuestos que seleccionan como diana las rutas de señalización relacionadas 30     con estos procesos de señalización pueden ser eficaces para la interrupción de los mecanismos de transducción de señales en la infección micobacteriana, junto con proporcionar una reducción en el daño inflamatorio del tejido.

35      La ruta de señalización celular mTOR es un componente de la ruta de supervivencia celular de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que desempeña un papel significativo en la regulación de la proliferación y el crecimiento celulares. Se considera que la activación aberrante de la ruta de PI3K está implicada en muchos tipos de cáncer, lo que conduce a resistencia asociada a la terapia. La ruta de PI3K/AKT/mTOR está implicada en la regulación del metabolismo, el crecimiento y la supervivencia celulares, la progresión del ciclo celular y la transcripción y traducción. AKT reside aguas abajo de la señalización de fosfoinositido 3-quinasa (PI3K), que se activa tras la unión de ligandos (tales como insulina u otros factores de crecimiento) a tirosina quinasas receptoras (RTK) en la superficie celular. La AKT activada fosforila una gama de sustratos, incluyendo PRAS40, BAD y FOXO3. La ruta de señalización celular mTOR actúa aguas arriba y aguas abajo de Akt y, por lo tanto, sirve como unión de señalización crítica en la ruta de PI3K. La quinasa mTOR se ensambla en dos complejos distintos dentro de la célula (mTORC1 y mTORC2), y están ubicados a ambos lados del centro de señalización de AKT. El complejo sensible a rapamicina con raptor (mTORC1) reside aguas abajo de AKT, mientras que el complejo insensible a rapamicina con rictor (mTORC2) puede activar completamente AKT mediante fosforilación directa en Ser473. Por lo tanto, está bien establecido que mTOR es capaz de formar dos complejos multiproteicos primarios conocidos como mTORC1 y mTORC2. Estos complejos sirven para regular las síntesis de proteínas celulares, que son requisitos clave para la homeostasis celular, incluyendo el crecimiento y la proliferación. Por lo tanto, mTOR es una ruta de señalización del cáncer muy relevante aguas abajo de los receptores de superficie, y existe una necesidad significativa de fármacos mejorados capaces de seleccionar 40     como diana mTOR.

45      La activación unida a ligando de un receptor transmembrana conduce a la activación de PI3K, que posteriormente fosforila Akt, que se desfosforila por PTEN. Debido a la señalización mejorada aguas abajo de la ruta de PI3K/Akt/mTOR, el cáncer junto con enfermedades autoinmunitarias, incluyendo procesos inflamatorios, son en parte responsables de estas enfermedades y ejercen numerosos efectos biológicos aguas abajo, incluyendo la traducción 50     de ARNm mediante fosforilación de dianas aguas abajo, tales como quinasa 4E-BP1 y p70 S6, la supresión de la

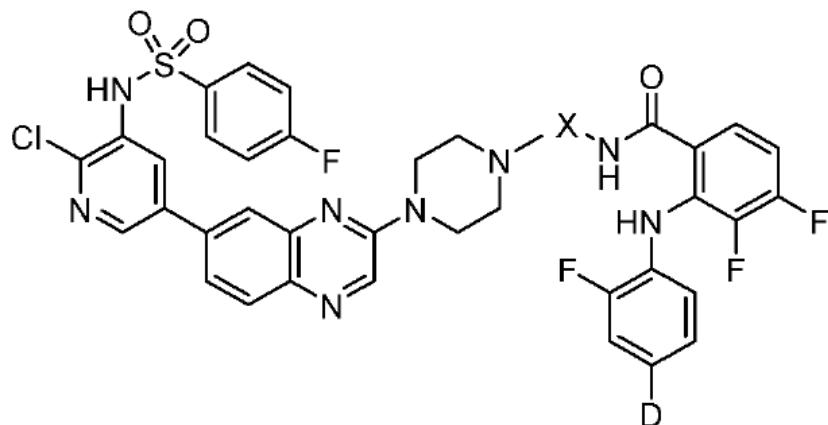
autofagia a través de Atg13 y ULK1, la biogénesis de ribosomas y la activación de la transcripción que conduce a un aumento de la actividad mitocondrial o adipogénesis. Por lo tanto, mTOR es una diana aguas abajo de la señalización de EGFR/PI3K/Akt y MET junto con una interferencia significativa con la señalización de MEK y, por consiguiente, se considera una diana clave para el tratamiento terapéutico de diversos tipos de enfermedades.

- 5 La desregulación de las rutas de PI3K/AKT/mTOR y MEK conduce a un crecimiento y proliferación celulares no controlados. Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de compuestos y métodos para tratar cánceres y otras enfermedades y afecciones mediante la inhibición de mTOR, MEK y PI3K.
- 10 Marcian, E. Van Dort *et al.* J. Med Chem. 59, 2512 - 2522, 2016 dan a conocer inhibidores de MEK/PI3K.
- Nishimura, N. *et al.* J. Med Chem. 54, 4735 - 4751, 2011 y el documento WO 2009/155121 dan a conocer inhibidores de mTOR(PI3K).
- 15 A pesar del descubrimiento de inhibidores moleculares pequeños de mTOR, MEK y PI3K, el diseño de inhibidores potentes de mTOR, MEK y PI3K sigue suponiendo un reto significativo en el descubrimiento moderno de fármacos. En consecuencia, todavía existe la necesidad en la técnica de inhibidores multifuncionales de mTOR, MEK y PI3K que tengan propiedades físicas y farmacológicas que permitan el uso de los inhibidores multifuncionales en aplicaciones terapéuticas. La presente invención proporciona compuestos multifuncionales de agente individual diseñados para  
20 unirse a mTOR, MEK y PI3K, e inhibir la actividad de mTOR, MEK y PI3K.

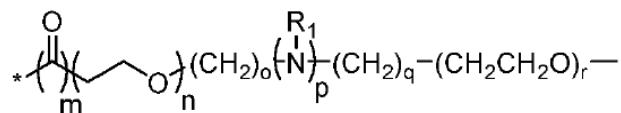
### Sumario de la invención

- 25 La presente invención se refiere a un único compuesto que selecciona como diana conjuntamente las rutas de MAP quinasa y PI3K, y a usos en el tratamiento de un cáncer mediante la administración de un compuesto de este tipo a un individuo que lo necesita. Los presentes compuestos se han desarrollado para seleccionar como diana conjuntamente estas importantes rutas de señalización con el fin de combatir enfermedades asociadas con la desregulación de su ruta.
- 30 Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos multifuncionales novedosos que son capaces de inhibir dos o tres rutas de transducción de señales clave (es decir, mTOR, MEK y PI3K) implicadas en el crecimiento, la progresión y la metástasis tumorales. Se han conjugado inhibidores individuales de mTOR, PI3K y MEK, químicamente modificados para acomodar ligadores, al tiempo que mantienen una alta afinidad de unión hacia sus respectivas dianas enzimáticas, para proporcionar los presentes inhibidores bifuncionales, trifuncionales y  
35 tetrafuncionales de mTOR/MEK/PI3K. Los presentes compuestos inhiben la progresión tumoral impulsada por KRAS al seleccionar como diana simultáneamente dos o tres nodos reguladores críticos, mTOR, MEK y PI3K, y al hacerlo interceptan la interferencia que se produce entre sus respectivas rutas.
- 40 Por lo tanto, la presente invención se refieren a inhibidores multifuncionales de las enzimas mTOR, MEK y PI3K, a composiciones que comprenden los inhibidores y al uso de los inhibidores en un tratamiento terapéutico de afecciones y enfermedades en donde la inhibición de la actividad de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio. Los presentes compuestos son potentes inhibidores de la activación de mTOR, la activación de MEK y la activación de PI3K, y son útiles en el tratamiento de cánceres, y particularmente tumores mutantes para KRAS.
- 45 La presente invención se refiere a compuestos trifuncionales capaces de inhibir la actividad de mTOR, MEK y PI3K que tienen la siguiente fórmula estructural:

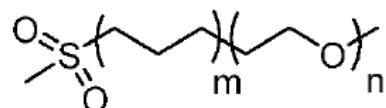
(a)



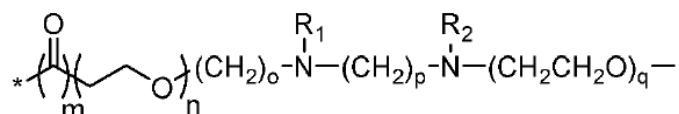
en donde D es,  $-C\equiv CH$  o  $-C\equiv C-R$ , R = alquilo o arilo, y X se selecciona del grupo que consiste en:



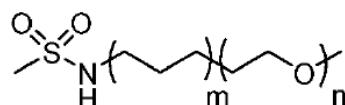
- 5  $\text{R}_1$ , independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 0, 1$ ;  $q = 0 - 6$ ;  $r = 2 - 6$ ,



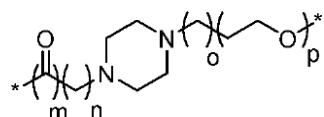
- 10 en donde, independientemente,  $m = 0 - 6$ ;  $n = 2 - 6$ ,



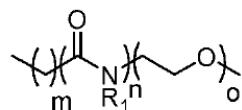
- 15 en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 1 - 6$ ;  $q = 2 - 6$  y  $\text{R}_1, \text{R}_2$ , independientemente, son H, alquilo o arilo,



- 20 en donde, independientemente,  $m = 0 - 6$ ;  $n = 2 - 6$ ,

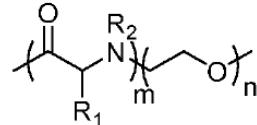


en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 2 - 6$ ,



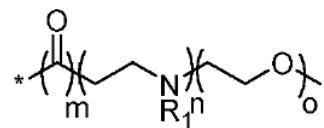
25

$\text{R}_1$ , independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente,  $m = 0 - 6$ ;  $n = 1 - 6$ ;  $o = 2 - 6$ ,



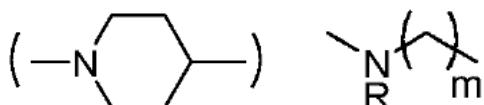
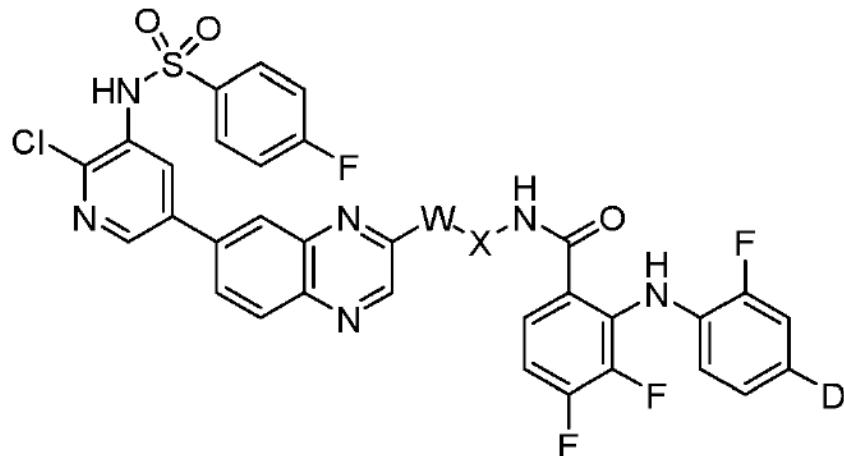
30

$\text{R}_1, \text{R}_2$ , independientemente, son H, alquilo o arilo, en donde, independientemente,  $m = 1 - 6$ ;  $n = 2 - 6$ , y



$\text{R}_1$ , independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente,  $\text{m} = 0, 1$ ;  $\text{n} = 1 - 6$ ;  $\text{o} = 2 - 6$ .

5 (b)

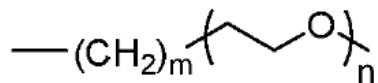


en donde  $\text{W}$  es

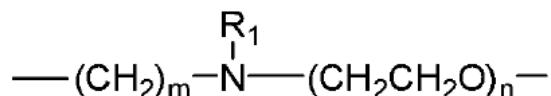
$\text{y R es H, alquilo o arilo y m} = 0, 1 - 6$ ;

10

$\text{D} = \text{I}, -\text{C}\equiv\text{CH}, -\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$ , donde  $\text{R} = \text{alquilo o arilo}$ , en donde  $\text{X}$  se selecciona del grupo que consiste en:

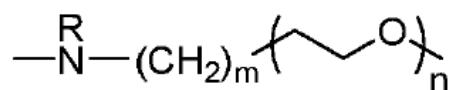


15 en donde  $\text{m} = 0, 1 - 6$ ;  $\text{n} = 1 - 6$ ; o cualquier combinación de  $\text{m}$  y  $\text{n}$

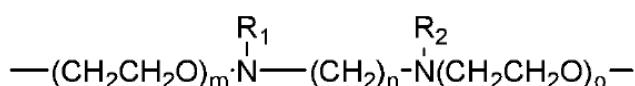


$\text{R}_1 = \text{H, alquilo o arilo en donde m, n son independientemente } 1 - 6$

20



en donde  $\text{R}$  es H, alquilo o arilo y  $\text{m} = 0, 1 - 6$ ;  $\text{n} = 1 - 6$ ; o cualquier combinación de  $\text{m}$  y  $\text{n}$



25

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son independientemente H, alquilo o arilo y m, n, o son independientemente 1 - 6

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 Una realización de la presente invención es proporcionar una composición que comprende (a) un presente inhibidor multifuncional y (b) un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable útil en el tratamiento de enfermedades o afecciones en donde la inhibición de uno o más de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio.

10 Otra realización de la presente invención es usar dicho compuesto anterior o una composición para tratar a un individuo para una enfermedad o afección en donde la inhibición de al menos uno de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio.

15 La enfermedad o afección de interés puede ser, por ejemplo, un cáncer.

15 Estas y otras realizaciones y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

#### Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra la estructura acoplada del compuesto 14 en el bolsillo alostérico de MEK1 (A) y en PI3K $\alpha$  (B);  
 la figura 2 muestra la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11 y 14 que seleccionan como diana las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT a partir de células de tumor pulmonar A-549 (figura 2A) y de glioma D54 (figura 2B) cultivadas;  
 25 la figura 3 muestra la cuantificación de la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11 y 14;  
 la figura 4 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vitro* en ratones que portan tumores por el compuesto 14;  
 30 la figura 5 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones que portan glioma D54 intracerebral por MV4-162 (compuesto 14) o MB4-168;  
 la figura 6 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en líneas tumorales de melanoma de crecimiento  
 35 subcutáneo A357 y A2058 en ratones;  
 la figura 7 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en la línea tumoral de cáncer de colon de crecimiento subcutáneo CT26 en ratones;  
 40 la figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia frente a los días transcurridos para animales tratados con MV4-162 (compuesto 14);  
 la figura 9 contiene gráficos que muestran los volúmenes tumorales de los tumores de melanoma A2058 y A357 para MV-162 (compuesto 14) y animales tratados con control de vehículo;  
 45 la figura 10 contiene gráficos que muestran el porcentaje de cambio en el volumen tumoral frente a los días para animales tratados con un control de vehículo y MV4-162 (compuesto 14);  
 50 la figura 11 ilustra y representa gráficamente la masa tumoral para ratones tratados con el compuesto 14 (MV4-162) y un control de vehículo. Ninguno de los compuestos mencionados en las figuras mencionadas anteriormente pertenece a la invención.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

55 La presente invención se describe en relación con realizaciones preferidas. Sin embargo, debe apreciarse que la invención no se limita a las realizaciones dadas a conocer. Se entiende que, dada la descripción de las realizaciones de la invención en el presente documento, un experto en la técnica puede realizar diversas modificaciones dentro del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones.

60 El término "PI3K", como se usa en el presente documento, significa una fosfoinosítido-3-quinasa de clase I (que incluye la clase Ia y la clase Ib), de clase II o de clase III, como se define en la publicación de patente estadounidense n.<sup>o</sup> 2011/0009405.

65 El término "MEK", como se usa en el presente documento, significa proteína quinasa activada por mitógeno.

El término "mTOR", como se usa en el presente documento, significa una diana mecanística de rapamicina.

La expresión "una enfermedad o afección en la que la inhibición de mTOR y/o PI3K y/o MEK proporciona un beneficio" se refiere a una afección en la que al menos uno de mTOR, PI3K y MEK, y/o una acción de al menos uno de mTOR, PI3K y MEK, es importante o necesario, por ejemplo, para el inicio, el progreso, la expresión de esa enfermedad o afección, o una enfermedad o una afección que se sabe que se trata por un inhibidor de mTOR, PI3K o MEK. Un ejemplo de una afección de este tipo incluye, pero no se limita a, un cáncer. Un experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente si un compuesto trata una enfermedad o afección mediada por uno o más de mTOR, PI3K y MEK para cualquier tipo de célula particular, por ejemplo, mediante ensayos que pueden usarse convenientemente para evaluar la actividad de compuestos particulares.

El término "segundo agente terapéutico" se refiere a un agente terapéutico diferente de un presente inhibidor multifuncional y que se sabe que trata la enfermedad o afección de interés. Por ejemplo, cuando un cáncer es la enfermedad o afección de interés, el segundo agente terapéutico puede ser un fármaco quimioterápico conocido, como taxol, o radiación, por ejemplo.

El término "enfermedad" o "afección" indica alteraciones y/o anomalías que, por regla general, se consideran afecciones o funciones patológicas, y que pueden manifestarse por sí mismas en forma de signos, síntomas y/o malos funcionamientos particulares. Como se demuestra a continuación, los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de MEK y PI3K o mTOR, MEK y PI3K y pueden usarse en el tratamiento de enfermedades y afecciones en las que la inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K proporciona un beneficio.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a eliminar, reducir o mejorar una enfermedad o afección, y/o síntomas asociados con la misma. Aunque no se excluye, tratar una enfermedad o afección no requiere que la enfermedad, afección, o los síntomas asociados con la misma se eliminen por completo. Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares pueden incluir reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o afección, o de una recurrencia de una enfermedad o afección previamente controlada, en un sujeto que no tiene, pero está en riesgo de o es susceptible a, volver a desarrollar una enfermedad o afección o una recurrencia de la enfermedad o afección. El término "tratar" y sinónimos contemplan administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un individuo que necesite tal tratamiento.

Dentro del significado de la invención, "tratamiento" también incluye profilaxis de recaídas o profilaxis de fases, así como el tratamiento de signos, síntomas y/o malos funcionamientos agudos o crónicos. El tratamiento puede orientarse sintomáticamente, por ejemplo, para suprimir los síntomas. Puede efectuarse durante un período corto, orientarse a medio plazo, o puede ser un tratamiento a largo plazo, por ejemplo, dentro del contexto de una terapia de mantenimiento.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad del/de los principio(s) activo(s) que es suficiente para administrar eficazmente el/los principio(s) activo(s) para el tratamiento de una afección o enfermedad de interés a un individuo que lo necesite. En el caso de un cáncer u otro trastorno de proliferación, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente puede reducir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la proliferación celular no deseada; reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; reducir la señalización de mTOR, MEK y PI3K en las células diana; y/o aliviar, hasta cierto punto, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el compuesto o la composición administrada evite el crecimiento y/o destruya las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

El término "recipiente" significa cualquier receptáculo y cierre para el mismo adecuado para almacenar, transportar, dispensar y/o manipular un producto farmacéutico.

El término "prospecto" significa información que acompaña a un producto farmacéutico que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia necesarios para permitir al médico, farmacéutico y paciente tomar una decisión informada con respecto al uso del producto. El prospecto generalmente se considera como la "etiqueta" para un producto farmacéutico.

"Administración concurrente", "administrado en combinación", "administración simultánea" y frases similares significan que dos o más agentes se administran simultáneamente al sujeto que está tratándose. Por "simultáneamente", quiere decirse que cada agente se administra o bien simultáneamente o bien secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo. Sin embargo, si no se administran simultáneamente, se entiende que se administran a un individuo en una secuencia y lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado y que pueden actuar conjuntamente. Por ejemplo, un presente inhibidor multifuncional puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo como segundo agente terapéutico. Un presente inhibidor multifuncional y el segundo agente terapéutico pueden administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Cuando un presente inhibidor multifuncional y el segundo

agente terapéutico no se administran simultáneamente, se entiende que pueden administrarse en cualquier orden a un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, un presente inhibidor multifuncional puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas 5 antes), concomitantemente con, o posteriormente a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas 10 después) de la administración de una segunda modalidad de tratamiento con agente terapéutico (por ejemplo, radioterapia), a un individuo que lo necesite. En diversas realizaciones, un presente inhibidor multifuncional y el segundo agente terapéutico se administran con 1 hora de diferencia, 10 minutos de diferencia, 30 minutos de diferencia, menos de 1 hora de diferencia, 1 hora de diferencia, de 1 hora a 2 horas de diferencia, de 2 horas a 3 horas de diferencia, de 3 horas a 4 horas de diferencia, de 4 horas a 5 horas de diferencia, de 5 horas a 6 horas de diferencia, de 6 horas a 7 horas de diferencia, de 7 horas a 8 horas de diferencia, de 8 horas a 9 horas de diferencia, de 9 horas a 10 horas de diferencia, de 10 horas a 11 horas de diferencia, de 11 horas a 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia o no más de 48 horas de 15 diferencia. En una realización, los componentes de las terapias de combinación se administran con de 1 minuto a 24 horas de diferencia.

El uso de los términos "un", "una", "el/la", y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) ha de interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, 20 a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. El uso de todos y cada uno 25 de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende ilustrar mejor la invención y no es una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

La investigación ha establecido que la selección como diana de mTOR, MEK y PI3K usando inhibidores de molécula 30 pequeña es una estrategia terapéutica viable contra el cáncer. Sin embargo, se sabe que los cánceres con mutación de KRAS están activados constitutivamente, son refractarios al tratamiento convencional y son un marcador para un mal pronóstico. Dos rutas efectoras de KRAS, MAPK y PI3K, son importantes precursores de la proliferación y supervivencia, respectivamente, y son mecanismos de resistencia entre sí. Estudios preclínicos de cánceres han demostrado que la inhibición múltiple de rutas efectoras tiene efectos sinérgicos, lo que proporciona una justificación 35 para las terapias de combinación en un entorno clínico.

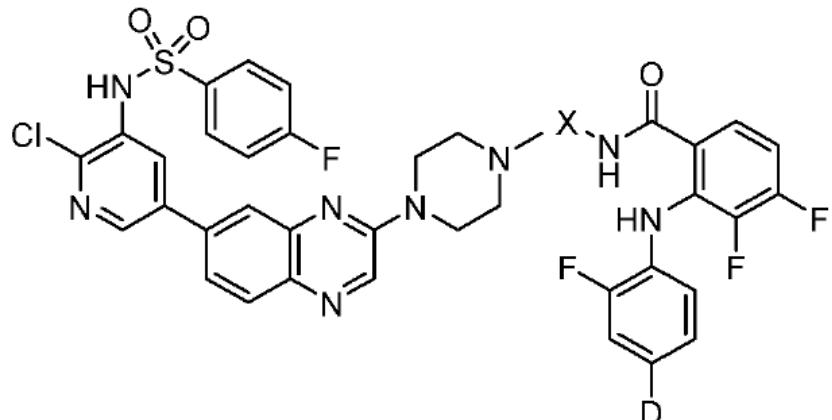
La relevancia clínica de estos hallazgos está investigándose actualmente en ensayos de combinación con inhibidores de MEK administrados con inhibidores de PI3K o AKT (19). Sin embargo, un fármaco de "combinación de agente 40 individual" no promiscuo ofrece varias ventajas previstas con respecto a un enfoque de cóctel diseñado racionalmente. En primer lugar, los efectos inespecíficos se agravan cuando se combinan dos agentes separados independientemente de la selectividad de los componentes individuales. Algunas actividades inespecíficas han demostrado ser ventajosas para el tratamiento de poblaciones de pacientes no deseados. Por ejemplo, el inhibidor "selectivo" de la quinasa abl imatinib ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de GIST impulsado por c-kit, así 45 como ciertos tumores malignos dirigidos por PDGFR (20). Sin embargo, en el mayor número de casos, el daño colateral en forma de toxicidades no mecanísticas se produce cuando se inhiben las dianas de quinasa no deseadas. En segundo lugar, diferentes perfiles farmacocinéticos entre agentes individuales pueden ser problemáticos cuando se combinan en la práctica clínica, lo que puede agravarse además por sensibilidades de interacción fármaco-fármaco 50 diferentes. Problemas de cumplimiento del paciente y los costes de los fármacos respaldan además el diseño de entidades químicas individuales para alterar la señalización a través de múltiples nodos. También se encuentran obstáculos logísticos cuando se realizan ensayos de combinación con dos agentes no aprobados. Aunque los datos clínicos con el inhibidor de MEK trametinib parecen prometedores (21, 22), es menos probable que se apruebe un inhibidor de PI3K o AKT en el futuro previsible. Las células tumorales presentan una amplia gama de mecanismos para restaurar el flujo a través de la ruta de PI3K/AKT/mTOR cuando se exponen a un inhibidor de PI3K, limitando de ese modo su eficacia de agente individual y dificultando su camino de aprobación reguladora (23). La eficacia favorable 55 derivada de un inhibidor horizontal, es decir, paralelo, de la señalización de PI3K/AKT y MEK/ERK, en comparación con la selección como diana en una sola etapa, se ha confirmado en datos clínicos tempranos (19).

Los presentes compuestos son inhibidores multifuncionales unidos químicamente para seleccionar como diana 60 específicamente tanto las rutas de MAPK como de PI3K. Una sola molécula que tiene esta capacidad de inhibición de rutas combinada aumenta la eficacia y la seguridad con respecto a inhibidores individuales que seleccionan como diana una sola ruta. La administración de un solo fármaco, a diferencia de dos fármacos, también aumenta el cumplimiento del paciente con un régimen de tratamiento prescrito.

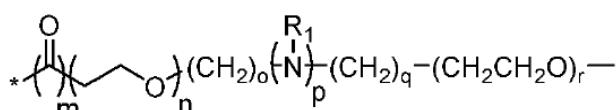
La presente invención se refiere a una nueva clase de inhibidores multifuncionales de MEK y PI3K o mTOR, MEK y 65 PI3K. Por lo tanto, los inhibidores multifuncionales de MEK/PI3K de la presente invención son útiles en el tratamiento de cánceres y precánceres en sujetos que necesitan tal tratamiento. En una realización, la presente invención se

refiere a compuestos trifuncionales capaces de inhibir la actividad de mTOR, MEK y PI3K que tienen la siguiente fórmula estructural:

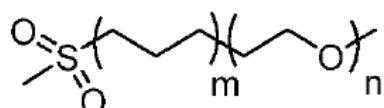
5 (a)



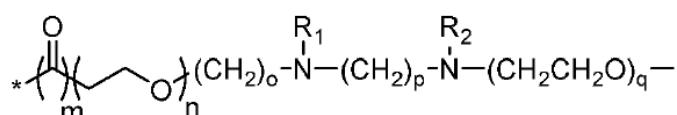
en donde D es I,  $-C\equiv CH$  o  $-C\equiv C-R$ , R = alquilo o arilo, y X se selecciona del grupo que consiste en:



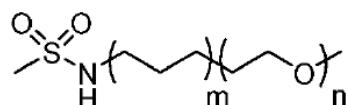
10  $R_1$ , independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 0, 1$ ;  $q = 0 - 6$ ;  $r = 2 - 6$ ,



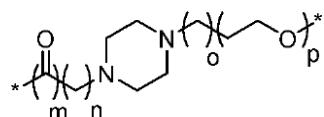
15 en donde, independientemente,  $m = 0 - 6$ ;  $n = 2 - 6$ ,



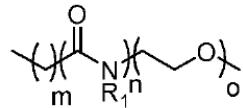
20 en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 1 - 6$ ;  $q = 2 - 6$  y  $R_1, R_2$ , independientemente, son H, alquilo o arilo,



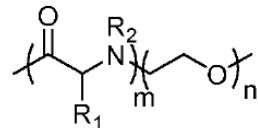
25 en donde, independientemente,  $m = 0 - 6$ ;  $n = 2 - 6$ ,



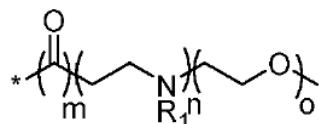
en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 2 - 6$ ,



5 R<sub>1</sub>, independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 0 - 6; n = 1 - 6; o = 2 - 6,



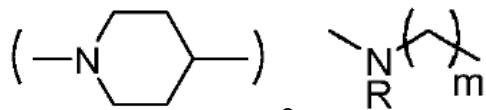
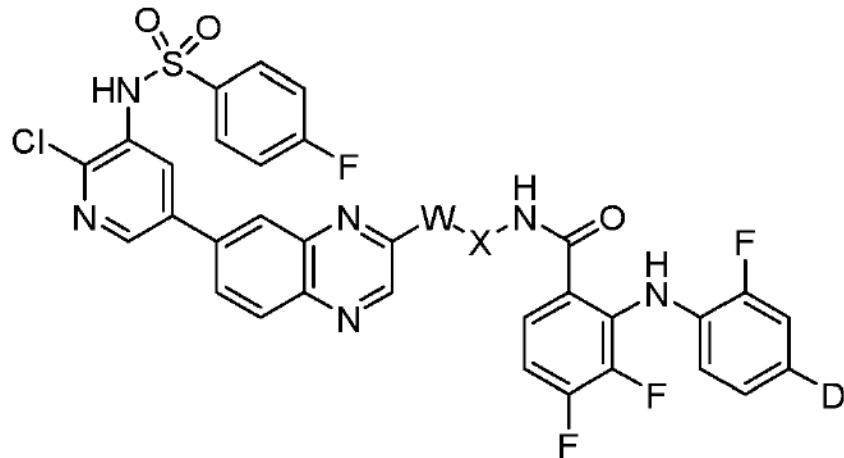
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 1 - 6; n = 2 - 6, y



10

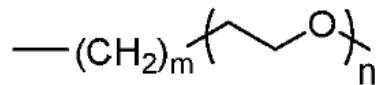
R<sub>1</sub>, independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 1 - 6; o = 2 - 6.

15 (b)



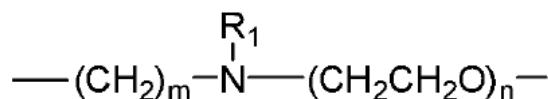
en donde W es y R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1 - 6;

20 D = I, -C≡CH, -C≡C-R, donde R = alquilo o arilo, en donde X se selecciona del grupo que consiste en:

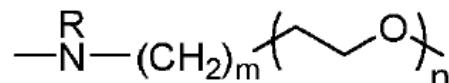


en donde m = 0, 1 - 6; n = 1 - 6; o cualquier combinación de m y n

25

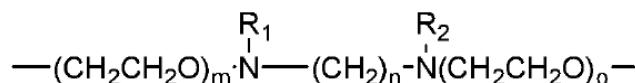


R<sub>1</sub> = H, alquilo o arilo en donde m, n son independientemente 1 - 6



5

en donde R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1 - 6; n = 1 - 6; o cualquier combinación de m y n



10

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son independientemente H, alquilo o arilo y m, n, o son independientemente 1 - 6.

15

La presente invención abarca compuestos bifuncionales o trifuncionales de la estructura definida anteriormente y en la reivindicación 1 que inhiben al menos dos de mTOR, MEK y PI3K, y que son útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones. En particular, los presentes compuestos multifuncionales se usan en el tratamiento de una enfermedad o afección en donde la inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K proporciona un beneficio, por ejemplo, cánceres. El uso comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un presente compuesto multifuncional a un individuo que lo necesite. Los presentes usos también abarcan administrar un segundo agente terapéutico al individuo además del presente compuesto multifuncional. El segundo agente terapéutico se selecciona de fármacos conocidos como útiles en el tratamiento de la enfermedad o afección que afecta al individuo que lo necesita, por ejemplo, un agente quimioterápico y/o radiación conocido como útil en el tratamiento de un cáncer particular.

25

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo C<sub>1-10</sub> saturados de cadena lineal y ramificados que incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo y 2-etilbutilo. El término C<sub>n</sub> significa que el grupo alquilo tiene "n" átomos de carbono. El término C<sub>n-m</sub> significa que los grupos alquilo pueden tener de "n" a "m" átomos de carbono. El término "alquileno" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Un grupo alquilo, por ejemplo, metilo o alquileno, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-, puede estar sustituido con grupos halo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, hidroxilo, alcoxilo, nitro, ciano, alquilamino o amino, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, el término "halo" se define como flúor, cloro, bromo y yodo.

35

El término "hidroxilo" se define como -OH.

El término "alcoxilo" se define como -OR, en donde R es alquilo.

40

El término "amino" se define como -NH<sub>2</sub>, y el término "alquilamino" se define como -R<sub>2</sub>, en donde al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno.

El término "nitro" se define como -NO<sub>2</sub>.

45

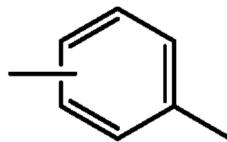
El término "ciano" se define como -CN.

El término "carbamolio" se define como -C(=O)NR<sub>2</sub>.

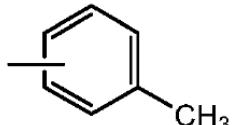
El término "trifluorometilo" se define como -CF<sub>3</sub>.

50

El término "trifluorometoxilo" se define como -OCF<sub>3</sub>.



Como se usa en el presente documento, grupos tales como



es una abreviatura para

5 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferiblemente un grupo aromático monocíclico o bicíclico. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, fluorenilo, azulenilo, antrilo, fenantrilo, pirenilo, bifenilo y terfenilo. Arilo también se refiere a anillos de carbono bicíclicos y tricíclicos, en los que uno de los anillos es aromático y el(s) otro(s) anillo(s) puede(n) estar saturado(s), parcialmente insaturado(s) o ser aromático(s), por ejemplo, dihidronaftilo, indenilo, indanilo o tetrahidronaftilo (tetralinilo).

10 10 El término "heteroarilo" se refiere a estructuras de anillo de 3 a 10 miembros, preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tianreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxanteno, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolona, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, fenantridina, acridina, pirimidina, fenatrolina, y similares.

15 20 Un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido en una o más posiciones con sustituyentes, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, alquistio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclico, un resto arilo o heteroarilo, trifluorometilo, ciano, y similares.

25 30 Adicionalmente, también se incluyen sales, hidratos y solvatos de los presentes compuestos en la presente invención. La invención incluye además todos los posibles estereoisómeros e isómeros geométricos de los presentes compuestos multifuncionales. La presente invención incluye tanto compuestos racémicos como isómeros ópticamente activos. Cuando se desea un presente compuesto multifuncional o compuesto trifuncional como un solo enantiómero, puede obtenerse por resolución del producto final o por síntesis estereoespecífica a partir de material de partida isoméricamente puro o mediante el uso de un reactivo auxiliar quiral, por ejemplo, véase Z. Ma *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(6), páginas 883-888 (1997). La resolución del producto final, un producto intermedio o un material de partida puede lograrse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Adicionalmente, en situaciones en las que son posibles tautómeros de un presente compuesto multifuncional, la invención pretende incluir todas las formas tautóméricas del compuesto.

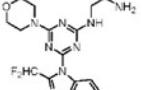
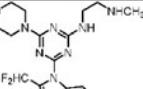
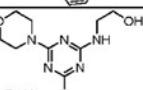
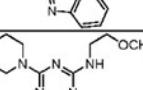
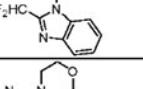
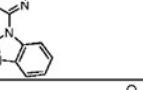
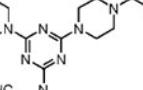
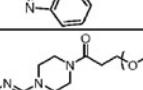
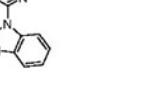
35 40 Los compuestos de la invención pueden existir como sales. A menudo se prefieren sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal o forma zwitteriónica de los presentes compuestos multifuncionales. Pueden prepararse sales de los presentes compuestos multifuncionales durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o por separado haciendo reaccionar el compuesto con un ácido que tiene un catión adecuado. Las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes compuestos multifuncionales pueden ser sales de adición de ácido formadas con ácidos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como nítrico, bórico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico y cítrico. Los ejemplos no limitantes de sales de compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, las sales de clorhidrato, bromhidrato, yodohidrato, sulfato, bisulfato, 2-hidroxietanosulfonato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerolfosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, succinato, fumarato, maleato, ascorbato, isotonato, salicilato, metanosulfonato, mesitilensulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftilensulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, paratoluenosulfonato, undecanoato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, metanosulfonato, etanodisulfonato, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato. Además, los grupos amino disponibles presentes en los compuestos de la invención pueden cuaternizarse con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esterilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. En vista de lo anterior, cualquier referencia a los compuestos de la presente invención que aparezca en el presente documento pretende incluir los presentes compuestos multifuncionales, así como sales, hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo de una molécula precursora de "fármaco" que requiere biotransformación (por ejemplo, o bien espontánea o bien enzimática) dentro del sistema fisiológico diana para liberar, o para convertir (por ejemplo, enzimática, fisiológica, mecánica, electromagnéticamente) el profármaco en el fármaco activo. Los profármacos están diseñados para superar los problemas asociados con la estabilidad, toxicidad, falta de especificidad o biodisponibilidad limitada.

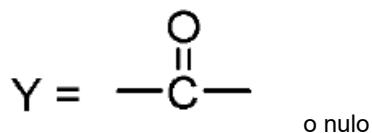
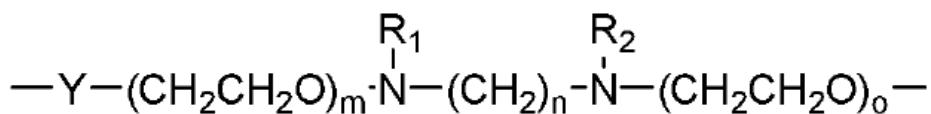
5 Los profármacos, a menudo, ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en el organismo mamífero. (Véase, por ejemplo, Bundgard, "Design of Prodrugs", págs. 7-9, 21-24, Elsevier, Ámsterdam (1985); y Silverman, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", págs. 352-401, Academic Press, San 10 Diego, Calif. (1992)). Los profármacos a modo de ejemplo comprenden una molécula de fármaco activa por sí misma y un grupo de enmascaramiento químico (por ejemplo, un grupo que suprime reversiblemente la actividad del fármaco). Algunos profármacos preferidos son variaciones o derivados de compuestos que tienen grupos escindibles en 15 condiciones metabólicas. Los profármacos a modo de ejemplo se vuelven farmacéuticamente activos *in vivo* o *in vitro* cuando experimentan solvólisis en condiciones fisiológicas o experimentan degradación enzimática u otra transformación bioquímica (por ejemplo, fosforilación, hidrogenación, deshidrogenación, glicosilación). Los profármacos comunes incluyen derivados de ácido tales como ésteres preparados por reacción de ácidos originales con un alcohol adecuado (por ejemplo, un alanol inferior), amidas preparadas por reacción del compuesto de ácido original con una amina, o grupos básicos que reaccionaron para formar un derivado de base acilada (por ejemplo, una 20 alquilamida inferior).

20 Los inhibidores de PI3K adicionales que pueden unirse a un inhibidor de MEK y/o inhibidor de mTOR (no según la invención) incluyen:

$\text{IC}_{50}(\text{nM})$ 

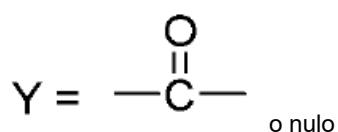
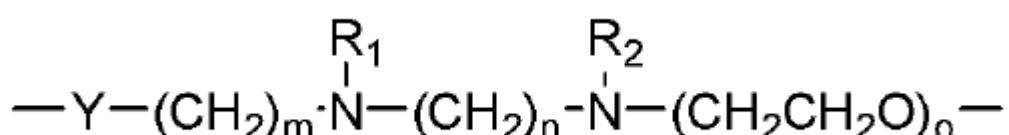
| Compuesto | Estructura  | PI3K $\alpha$ | PI3K $\beta$ | PI3K $\gamma$ | PI3K $\delta$ |
|-----------|---|---------------|--------------|---------------|---------------|
| ST-177    |    | 292 ± 31      | 2117 ± 444   | 771 ± 63      | 291 ± 32      |
| ST-5-02   |    | 248 ± 24      | 2900 ± 375   | 681 ± 90      | 135 ± 19      |
| ST-187    |    | 9,9 ± 1,2     | 71 ± 8       | 54 ± 1        | 8,1 ± 1,7     |
| ST-178    |    | 20 ± 3        | 208 ± 15     | 64 ± 5        | 17 ± 1        |
| ZSTK474   |   | 5,0 ± 0,8     | 15,2 ± 1,4   | 20,8 ± 0,6    | 3,9 ± 0,6     |
| ST-5-03   |  | 8,2 ± 0,7     | 14,3 ± 2,5   | 21 ± 1        | 2,9 ± 0,6     |
| ST-167    |  | 11,5 ± 0,1    | 214 ± 49     | 140 ± 6,6     | 1,3 ± 0,2     |
| ST-5-21   |  | 20 ± 0,4      | 431 ± 83     | 67 ± 2,8      | 26 ± 4,9      |
| ST-5-25   |  | 12,4 ± 0,7    | 787 ± 106    | 22,3 ± 0,7    | 60 ± 3,4      |

Ligadores preferidos para la unión de inhibidores de mTOR, MEK y PI3K para la preparación de sales son:



5 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo;

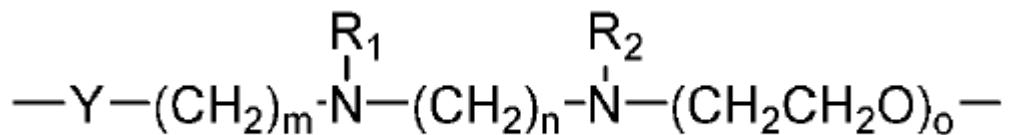
m y n, independientemente, son 1, 2, 3, 4 o 5 y o es 2, 3, 4 o 5;



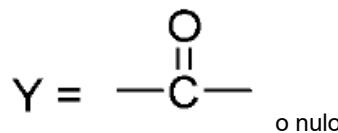
10

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo;

m y n, independientemente, son 1, 2, 3, 4 o 5 y o es 2, 3, 4 o 5;



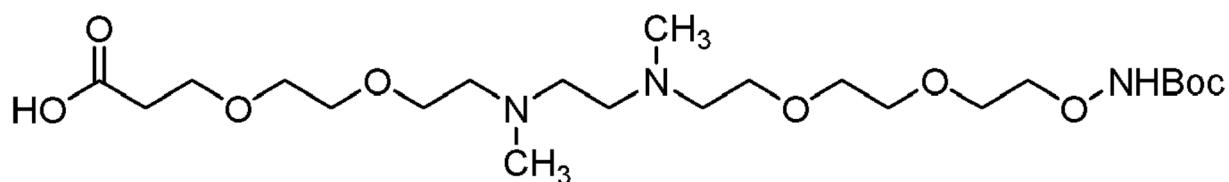
15



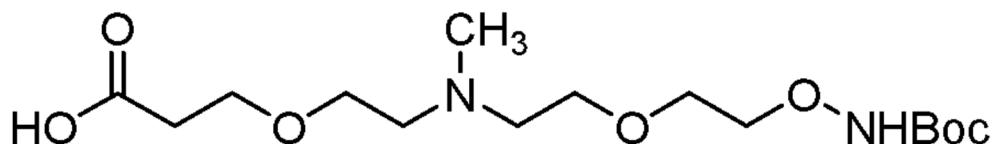
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo;

20 m y n, independientemente, son 1, 2, 3, 4 o 5 y o es 2, 3, 4 o 5.

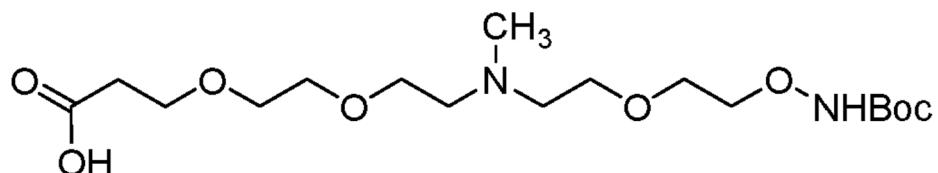
En realizaciones preferidas adicionales, un ligador adecuado para la preparación de una sal es



25 ácido t-Boc-aminoxi-PEG2-N',N''-dimetiletano-1,2-diamina-PEG2 (ST-179)

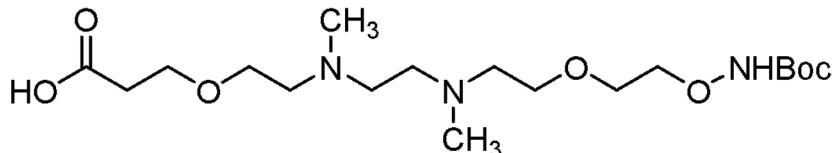


ácido t-Boc-aminoxi-PEG1-N-metilamina-PEG1 (ST-5-09)



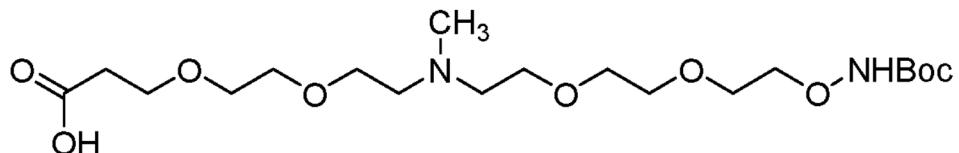
5

ácido t-Boc-aminoxi-PEG1-N-metilamina-PEG2 (ST-5-10)



10

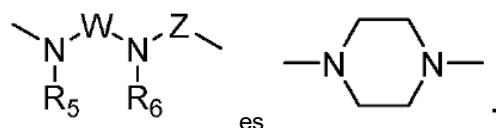
ácido t-Boc-aminoxi-PEG2-N',N''-dimetiletano-1,2-diamina-PEG1 (ST-188)



15

ácido t-Boc-aminoxi-PEG2-N-metilamina-PEG2 (ST-5-11)

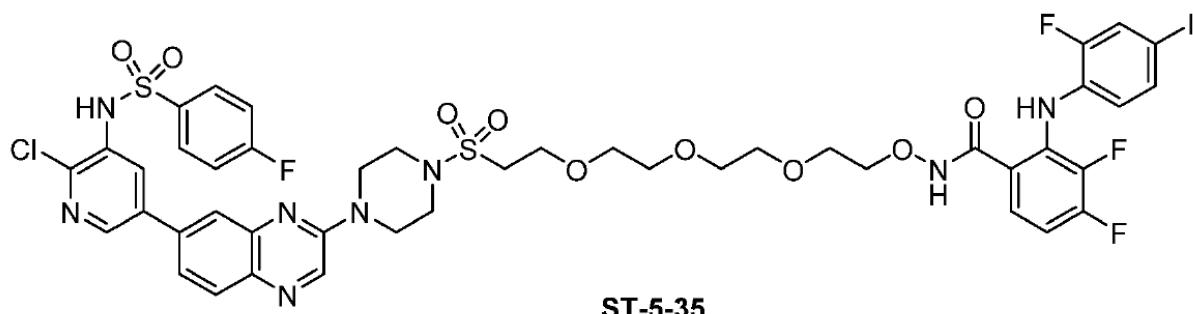
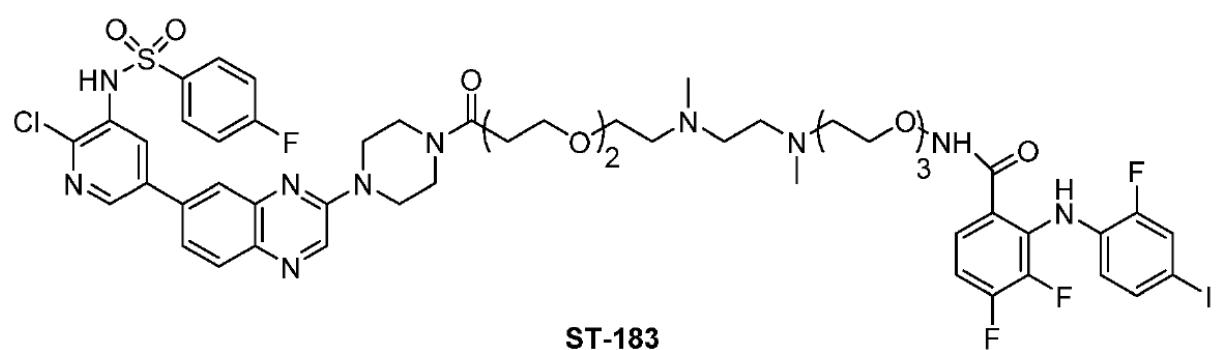
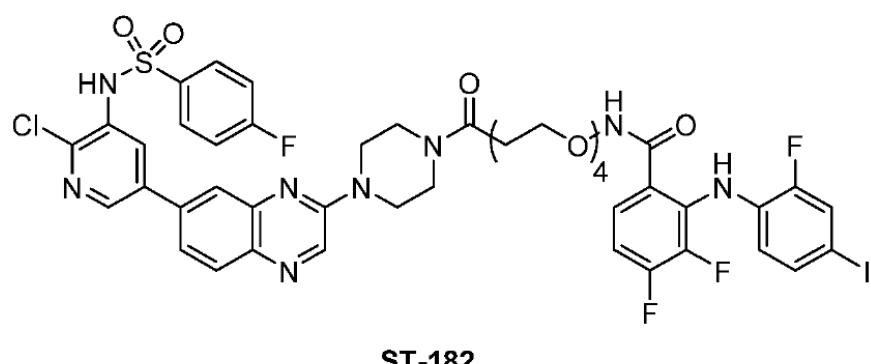
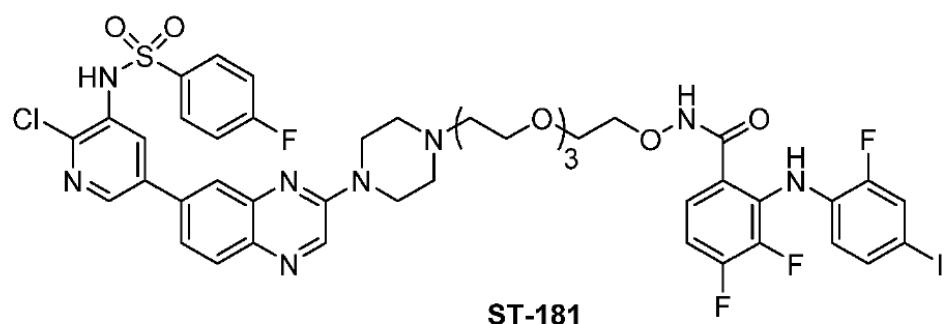
En una realización del compuesto (e), el ligador

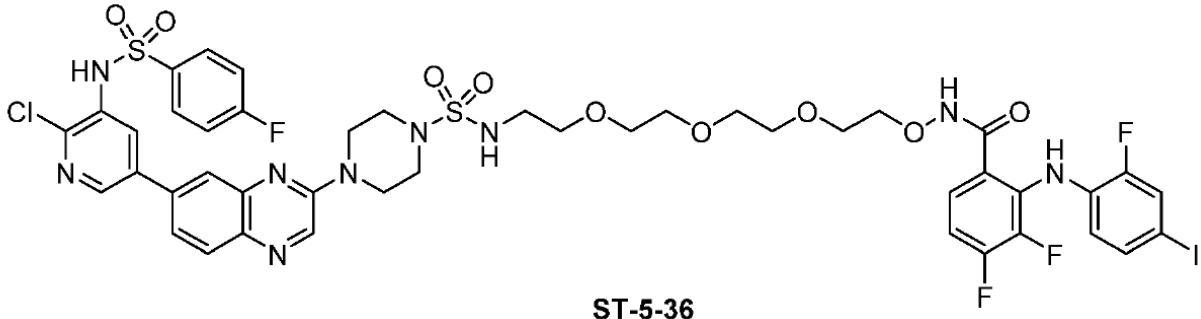


20

Para mejorar adicionalmente la biodisponibilidad del fármaco, el ligador puede ser 2-[2,3-bis(2-hidroxietoxi)propoxi]etanol, un ligador ternario, o pentaeritritol, un ligador cuaternario, para unir los inhibidores de MEK, PI3K y mTOR por medio de enlaces éster.

25 Los compuestos específicos de la presente invención capaces de inhibir mTOR, PI3K y MEK incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen las estructuras expuestas a continuación.





La presente invención incluye (a) el desarrollo de inhibidores de mTOR, PI3K y MEK individuales que se modifican químicamente con ligadores de conjugación para mantener una alta afinidad de unión hacia sus respectivas dianas enzimáticas; y (b) la conjugación de estas entidades químicas en una etapa de síntesis final para proporcionar los compuestos inhibidores multifuncionales de entidad química individual prototipo ST-180 a ST-186, ST-189 y ST5-05, de los cuales solo ST-181, ST-182, ST-183, como se representó anteriormente, son parte de la invención. Esta estrategia también podría usarse para unir inhibidores de MEK alternativos tales como trametinib, selumetinib, pimersertib, SMK-17, por ejemplo. Otros inhibidores de MEK se dan a conocer en el capítulo 8, figuras 8.10 y 8.11: Sebolt-Leopold, *et al.* (2009), Road to PD0325901 and beyond: The MEK Inhibitor Quest, en Kinase Inhibitor Drugs (Eds. R. Li y J. A. Stafford), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, EE. UU.

Los inhibidores de PI3K alternativos incluyen, por ejemplo, GDC 0941, GDC 0980, BKM-120, BEZ235, PIK-90 y Duvelisib.

Los inhibidores de mTOR alternativos incluyen, por ejemplo, rapamicina, AZD8055, KU0063794, Torkinib (PP242) y Votaxalisib.

Por lo tanto, la presente invención proporciona inhibidores multifuncionales de mTOR y/o MEK y/o PI3K, como se exemplifica por los presentes compuestos, para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones en donde la inhibición de al menos uno, y preferiblemente al menos dos, de mTOR, MEK y PI3K tiene un efecto beneficioso. En una realización, la presente invención se refiere a un uso en el tratamiento de un individuo que padece una enfermedad o afección en donde la inhibición de mTOR o MEK o PI3K, y preferiblemente todos, proporciona un beneficio. Se prevé que un presente compuesto multifuncional presente una mayor actividad contra tumores mutantes para KRAS que una monoterapia con inhibidor de mTOR, MEK o PI3K.

El uso de la presente invención puede lograrse administrando un presente compuesto multifuncional como compuesto puro o como una composición farmacéutica. La administración de una composición farmacéutica, o compuesto multifuncional presente puro, puede realizarse durante o después del inicio de la enfermedad o afección de interés. Normalmente, las composiciones farmacéuticas son estériles, y no contienen compuestos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos que provocarían una reacción adversa cuando se administran. Se proporcionan además kits que comprenden un presente compuesto multifuncional y, opcionalmente, un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de enfermedades y afecciones en donde la inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K proporciona un beneficio, envasados por separado o juntos, y un prospecto que tiene instrucciones para usar estos agentes activos.

Un presente compuesto multifuncional puede administrarse junto con un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de una enfermedad o afección en donde la inhibición de uno o más de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio. El segundo agente terapéutico es diferente del presente compuesto multifuncional. Un presente compuesto multifuncional y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultánea o secuencialmente para lograr el efecto deseado. Además, el presente compuesto multifuncional y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a partir de una única composición o dos composiciones separadas.

El segundo agente terapéutico se administra en una cantidad para proporcionar su efecto terapéutico deseado. El intervalo de dosificación eficaz para cada segundo agente terapéutico se conoce en la técnica, y el segundo agente terapéutico se administra a un individuo que lo necesita dentro de tales intervalos establecidos.

Un presente compuesto multifuncional y el segundo agente terapéutico pueden administrarse juntos como una única dosis unitaria o por separado como múltiples dosis unitarias, en donde el presente compuesto multifuncional se administra antes que el segundo agente terapéutico o viceversa. Pueden administrarse una o más dosis del presente compuesto multifuncional y/o una o más dosis del segundo agente terapéutico. Por lo tanto, los presentes compuestos multifuncionales pueden usarse junto con uno o más segundos agentes terapéuticos, por ejemplo, pero sin limitarse a, agentes anticancerígenos.

Las enfermedades y afecciones que pueden tratarse según la invención incluyen, por ejemplo, cánceres. Puede

tratarse una variedad de cánceres incluyendo, pero sin limitarse a: carcinomas, incluyendo de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), 5 esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides, renal y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkitts, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del 10 sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (RCC), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma y glioblastoma.

15 Las formas adicionales de cáncer tratables por los inhibidores dobles de MEK/PI3K de la presente invención incluyen, por ejemplo, cánceres de oncología pediátrica y de adultos, crecimiento de tumores sólidos/tumores malignos, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas humanos de tejidos blandos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma 20 de células escamosas, particularmente de la cabeza y el cuello, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma oral, tumores malignos de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica y tricoleucemia, linfomas de derrame (linfomas basados en la cavidad corporal), linfoma tímico, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de células pequeñas, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de la 25 corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de mama, incluyendo carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal), cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados con neoplasia colorrectal), cáncer pancreático, cáncer de hígado, cánceres urológicos (incluyendo cáncer de vejiga, tales como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células transicionales invasivo de la vejiga y cáncer de vejiga invasivo del músculo), cáncer de próstata, 30 tumores malignos del tracto genital femenino (incluyendo carcinoma de ovario, tumores malignos epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervicouterino, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), tumores malignos del tracto genital masculino (incluyendo cáncer testicular y cáncer de pene), cáncer de riñón (incluido carcinoma de células renales), cáncer cerebral 35 (incluyendo tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas e invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central), cánceres óseos (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, derrame peritoneal, derrame pleural maligno, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, tumor maligno mieloide incluyendo leucemia mielógena aguda (AML), síndrome 40 mielodisplásico (MDS), leucemia mieloide crónica (CML) y sarcoma de Kaposi.

Los presentes compuestos multifuncionales son particularmente útiles en el tratamiento de cánceres pancreáticos y colorrectales, y enfermedad metastásica tumoral.

45 La vía de administración también puede ser mediante inyección intraocular directa de los compuestos para tratamientos de tumores del ojo, por ejemplo, incluyendo melanoma uveal y retinoblastoma. Los presentes inhibidores multifuncionales también pueden administrarse por vía tópica, por vía oral o por vía intravenosa, o por implante intraocular, para mejorar la biodisponibilidad ocular del fármaco. Como las rutas de señalización celular pueden tener “interferencia” significativa y, por lo tanto, muchas interacciones moleculares diferentes con otras rutas biológicas, 50 seleccionar como diana las rutas de PI3K/Akt/mTOR y Raf/MEK/ERK puede ser beneficioso para las enfermedades oculares, incluyendo glaucoma, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, ampliopia y retinopatía diabética.

55 Enfermedades y afecciones adicionales, incluyendo cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias intestinales, vasculitis, síndrome de Behcet, psoriasis, dermatosis inflamatorias, asma, enfermedades alérgicas respiratorias, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injertos, fiebre, trastornos cardiovasculares, trastornos cerebrovasculares, fibrosis, enfermedad del tejido conjuntivo, sarcoidosis, trastornos genitales y reproductivos, trastornos gastrointestinales, trastornos neurológicos, trastornos del sueño, dolor, trastornos renales y enfermedades infecciosas, incluyendo VIH, dolor crónico incluyendo dolor neuropático (dolor provocado por daño o mal funcionamiento de los propios nervios) y dolor nociceptivo (los nociceptores son receptores en el sistema nervioso que se activan durante una lesión) y dolor crónico asociado con el diagnóstico clínico como, por ejemplo, fibromialgia, inflamación, mal funcionamiento musculoesquelético que puede tratarse mediante la administración de un presente inhibidor de mTOR y/o MEK y/o PI3K se dan a conocer en la publicación de patente estadounidense n.º 2011/0053907; patente estadounidense n.º 7.897.792; publicación de patente estadounidense n.º 2011/0009405 y 60 publicación de patente estadounidense n.º 2010/0249099.

- En el presente uso, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de un presente inhibidor multifuncional, normalmente formulado según la práctica farmacéutica, se administra a un ser humano que lo necesite. Si un tratamiento de este tipo está indicado depende del caso individual y está sujeto a evaluación médica (diagnóstico) que tiene en cuenta los signos, síntomas y/o malos funcionamientos que están presentes, los riesgos de desarrollar signos, 5 síntomas y/o malos funcionamientos particulares, y otros factores.
- Un presente compuesto multifuncional puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, bucal, inhalación, sublingual, rectal, vaginal, intracisternal o intratecal a través de punción lumbar, transuretral, nasal, percutánea, es decir, transdérmica, o parenteral (incluyendo inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, 10 intracoronaria, intradérmica, intramamaria, intraperitoneal, intraarticular, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular). La administración parenteral puede lograrse usando una aguja y una jeringa o usando una técnica de alta presión.
- Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas en las que un presente compuesto multifuncional se administra 15 en una cantidad eficaz para lograr su propósito pretendido. La formulación exacta, vía de administración y dosificación la determina un médico individual en vista de la afección o enfermedad diagnosticada. La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles de un presente compuesto multifuncional que sea suficiente para mantener los efectos terapéuticos.
- La toxicidad y la eficacia terapéutica de los presentes compuestos multifuncionales pueden determinarse mediante 20 procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) de un compuesto, que se define como la dosis más alta que no causa toxicidad en animales. La razón de dosis entre la dosis máxima tolerada y los efectos terapéuticos (por ejemplo, inhibición del crecimiento tumoral) es el índice terapéutico. La dosificación puede variar dentro de este intervalo 25 dependiendo de la forma de dosificación empleada, y la vía de administración utilizada. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz de un presente compuesto multifuncional requerido para su uso en terapia varía 30 con la naturaleza de la afección que está tratándose, el período de tiempo que se desea la actividad, y la edad y el estado del paciente y, en última instancia, lo determina el médico asistente. Las cantidades e intervalos de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del inhibidor multifuncional que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una sola dosis, o como múltiples dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como 35 una, dos, tres, cuatro o más subdosis al día. A menudo se desean múltiples dosis, o se requieren. Por ejemplo, un presente inhibidor multifuncional puede administrarse a una frecuencia de: cuatro dosis administradas como una dosis al día a intervalos de cuatro días (q4d x 4); cuatro dosis administradas como una dosis al día a intervalos de tres días (q3d x 4); una dosis administrada al día a intervalos de cinco días (qd x 5); una dosis a la semana durante tres semanas (qwk3); cinco dosis diarias, con dos días de descanso, y otras cinco dosis diarias (5/2/5); o cualquier régimen de dosis 40 que se determina que es apropiado para la circunstancia.
- Un presente compuesto multifuncional usado en la presente invención puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 500 miligramos por dosis, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 45 250 miligramos por dosis o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 miligramos por dosis. Por ejemplo, puede administrarse un presente compuesto multifuncional, por dosis, en una cantidad de aproximadamente 0,005, 0,05, 0,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 miligramos, incluyendo todas las dosis entre 0,005 y 500 miligramos.
- La dosificación de una composición que contiene un presente inhibidor multifuncional, o una composición que contiene 50 el mismo, puede ser de desde aproximadamente 1 ng/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 1 ug/kg a aproximadamente 100 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. La dosificación de una composición puede estar a cualquier dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, aproximadamente 1 ug/kg. La dosificación de una composición puede estar a cualquier dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, 55 aproximadamente 1 ug/kg, 10 ug/kg, 25 ug/kg, 50 ug/kg, 75 ug/kg, 100 ug/kg, 125 ug/kg, 150 ug/kg, 175 ug/kg, 200 ug/kg, 225 ug/kg, 250 ug/kg, 275 ug/kg, 300 ug/kg, 325 ug/kg, 350 ug/kg, 375 ug/kg, 400 ug/kg, 425 ug/kg, 450 ug/kg, 475 ug/kg, 500 ug/kg, 525 ug/kg, 550 ug/kg, 575 ug/kg, 600 ug/kg, 625 ug/kg, 650 ug/kg, 675 ug/kg, 700 ug/kg, 725 ug/kg, 750 ug/kg, 775 ug/kg, 800 ug/kg, 825 ug/kg, 850 ug/kg, 875 ug/kg, 900 ug/kg, 925 ug/kg, 950 ug/kg, 975 ug/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg o 60 200 mg/kg. Las dosificaciones anteriores son a modo de ejemplo del caso promedio, pero puede haber casos individuales en los que se necesitan dosis más altas o más bajas, y tales están dentro del alcance de esta invención. En la práctica, el médico determina el régimen de dosificación real que es más adecuado para un paciente individual, que puede variar con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular.
- En el tratamiento de un cáncer, un presente compuesto multifuncional puede administrarse con un agente 65

quimioterápico y/o radiación.

Las realizaciones de la presente invención emplean radiación electromagnética de: radiación gamma (de  $10^{-20}$  a  $10^{-13}$ ), radiación de rayos X (de  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  m), luz ultravioleta (de 10 nm a 400 nm), luz visible (de 400 nm a 700 nm), radiación infrarroja (de 700 nm a 1 mm) y radiación de microondas (de 1 mm a 30 cm).

Muchos protocolos de tratamiento del cáncer emplean actualmente radiosensibilizadores activados por radiación electromagnética, por ejemplo, rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no se limitan a, metronidazol, misnidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUDR), bromodesoxicitidina, fluorodesoxiuridina (FUDR), hidroxiurea, cisplatino y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como activador de la radiación del agente sensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero sin limitarse a: derivados de hematoporfirina, PHOTOFIRIN®, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de zinc, y análogos terapéuticamente eficaces y derivados de los mismos.

Los radiosensibilizadores pueden administrarse junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos además de un presente inhibidor multifuncional, incluyendo tales compuestos, pero sin limitarse a, compuestos que promueven la incorporación de radiosensibilizadores a las células diana, compuestos que controlan el flujo de agentes terapéuticos, nutrientes y/u oxígeno a las células diana, agentes quimioterápicos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional, u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar el cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse junto con radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, oxígeno, carbógeno, transfusiones de glóbulos rojos, perfluorocarbonos (por ejemplo, FLUOSOLW®-DA), 2,3-DPG, BW12C, bloqueantes de canales de calcio, pentoxifilina, compuestos antiangiogénicos, hidralazina y L-BSO.

El agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente o compuesto farmacológico que induzca apoptosis. El agente o compuesto farmacológico puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico o anticuerpo. Los agentes quimioterápicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas de las mismas, productos naturales y sus derivados, radioisótopos, anticuerpos, así como productos naturales, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un inhibidor multifuncional de la presente invención puede administrarse con antibióticos, tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas nitrogenadas, tales como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxiurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, tales como adenocarcinoma de mama, donde los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto puede administrarse junto con leuprolida o goserelina (análogos de péptidos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto inhibidor con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía o radiación, también denominadas en el presente documento "modalidades antineoplásicas complementarias". Los agentes quimioterápicos adicionales útiles en la invención incluyen hormonas y antagonistas de las mismas, radioisótopos, anticuerpos, productos naturales, y combinaciones de los mismos.

En la siguiente table se enumeran ejemplos de agentes quimioterápicos útiles en combinación con los compuestos de la presente invención.

Tabla 1

|    | <b>Agentes alquilantes</b>  | <b>Productos naturales</b>   |
|----|---|--|
|    | <u>Mostazas de nitrógeno</u>  | <u>Fármacos antimitóticos</u>  |
| 50 | mecloretamina<br>ciclofosfamida<br>ifosfamida<br>melfalán<br>clorambucilo     | Taxanos<br>paclitaxel<br>alcaloides de la vinca<br>vinblastina (VLB)<br>vincristina<br>vinorelbina<br>vindesina<br>Taxotere® (docetaxel) |
|    | mostaza de uracilo<br>temozolomida  | estramustina<br>fosfato de estramustina  |
|    | <u>Nitrosoureas</u>   | <u>Epipodofilotoxinas</u>  |
|    | carmustina (BCNU)<br>lomustina (CCNU)<br>semustina (metil-CCNU)<br>clormetina | etopósido  |

|  |  |
|--|--|
| estreptozocina                                 | tenipósido                                   |
| <u>Etilenimina/metil-melamina</u>              | <u>Antibióticos</u>                          |
| trietenimelamina (TEM)                         | actimomicina D                               |
| trietilenofosforamida                          | daunomicina (rubidomicina)                   |
| (tiotepa)                                      | doxorubicina (adriamicina)                   |
| hexametilmelamina                              | mitoxantrona/darubicina                      |
| (HMM, altretamina)                             | bleomicina                                   |
| <u>Sulfonatos de alquilo</u>                   | esplicamicina (mitramicina)                  |
| busulfano                                      | mitromicina-C                                |
| pipobromo                                      | dactinomicina                                |
| <u>Triazinas</u>                               | afidicolina                                  |
| dacarbazine (DTIC)                             | epirubicina                                  |
| <b>Antimetabolitos</b>                         | idarubicina                                  |
| Análogos de ácido fólico                       | daunorubicina                                |
| metotrexato                                    | mitramicina                                  |
| trimetrexato                                   | desoxi-co-formicina                          |
| pemetrexed                                     |  |
| (antifolato de selección como diana múltiple)  |  |
| <u>Análogos de pirimidina</u>                  | <u>Enzimas</u>                               |
| 5-fluorouracilo                                | L-asparaginasa                               |
| fluorodesoxiuridina                            | L-arginasa                                   |
| gemcitabina                                    |  |
| arabinósido de citosina                        |  |
| (AraC, citarabina)                             |  |
| 5-azacitidina                                  |  |
| 2,2'-difluorodesoxi-citidina                   |  |
| floxuridina                                    |  |
| pentostatina                                   |  |
| <u>Análogos de purina</u>                      | <u>Radiosensibilizadores</u>                 |
| 6-mercaptopurina                               | metronidazol                                 |
| 6-tioguanina                                   | misonidazol                                  |
| azatioprina                                    | desmetilmisonidazol                          |
| 2'-desoxicofomicina                            | pimonidazol                                  |
| (pentostatina)                                 | etanidazol                                   |
| eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)              | nimorazol                                    |
| fosfato de fludarabina                         | RSU 1069                                     |
| 2-clorodesoxiadenosina                         | EO9  |
| (cladribina, 2-CdA)                            | RB 6145                                      |
| <b>Inhibidores de topoisomerasa de tipo I</b>  |  |
| camptotecina                                   | <u>Antiandrógenos no esteroideos</u>         |
| topotecán                                      | SR4233                                       |
| irinotecán                                     | flutamida                                    |
| <b>Modificadores de la respuesta biológica</b> | nicotinamida                                 |
| G-CSF  | 5-bromodesoxiuridina                         |
| GM-CSF   | 5-yododesoxiuridina                          |
| <b>Agentes de diferenciación</b>               | bromodeoxicitidina                           |
| derivados de ácido retinoico                   |  |
| <b>Hormonas y antagonistas</b>                 |  |
| Adrenocorticosteroides/antagonistas            | <b>Agentes misceláneos</b>                   |
| prednisona y equivalentes                      | <u>Complejos de coordinación de platino</u>  |
| dexametasona                                   | cisplatino                                   |
| aminoglutetimida                               | carboplatino                                 |
| <b>Progestinas</b>                             | oxaliplatinio                                |
| caproato de hidroxiprogesterona                | antracenodiona                               |
|  | mitoxantrona                                 |
|  |  |
|  | <u>Urea sustituida</u>                       |
|  | hidroxiurea                                  |
|  |  |
|  | <u>Derivados de metilhidrazina</u>           |
|  | N-metilhidrazina (MIH)                       |
|  | procabarzina                                 |
|  |  |
|  | <u>Supresor suprarrenal</u>                  |
|  | mitotano ( <i>o,p'</i> -DDD)                 |
|  | aminoglutetimida                             |
|  |  |
|  | <b>Citocinas</b>                             |
|  | interferón ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) |
|  | interleucina-2                               |
|  |  |
|  | <b>Fotosensibilizadores</b>                  |

|  |   |
|--|---|
| acetato de medroxiprogesterona<br>acetato de megestrol   | derivados de hematoporfirina<br>PHOTOFRIN®<br>derivados de benzoporfirina<br>Npe6     |
| <b>Estrógenos</b><br>diestilestilbestrol<br>etinilestradiol/equivalentes                               | etioporfirina de estaño (SnET2)<br>feoborida-a<br>bacteriorofila-a<br>naftalocianinas |
| <b>Antiestrógeno</b><br>tamoxifeno   | ftalocianinas<br>ftalocianinas de zinc  |
| <b>Andrógenos</b><br>propionato de testosterona<br>fluoximesterona/equivalentes                        | <b>Radiación</b><br>rayos X<br>luz ultravioleta<br>radiación gamma                    |
| <b>Antiandrógenos</b><br>flutamida<br>análogos de hormona<br>liberadora de gonadotropina<br>leuprolida | luz visible<br>radiación infrarroja<br>radiación de microondas                        |

Los agentes que afectan a los microtúbulos interfieren con la mitosis celular y se conocen bien en la técnica por su actividad citotóxica. Los agentes que afectan a los microtúbulos útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, alocolchicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicinas (NSC 757), derivados de colchicinas (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (NSC 125973), Dderivados de TAXOL® (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina (NSC 361792), tritilcisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas que incluyen, pero no se limitan a, epotilona A, epotilona B y discodermolida (véase Service, (1996) Science, 274:2009)

- 5 estramustina, nocodazol, MAP4 y similares. También se describen ejemplos de tales agentes en Bulinski (1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou (1997) Nature 397:268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985; y Panda (1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812.

- 10 Los agentes citostáticos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17- $\alpha$ -etinilestadiol, diestilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, zoladex.

- 15 20 Otros agentes citostáticos son antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, y otros inhibidores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU668. También pueden utilizarse anticuerpos anti-Her2. Un inhibidor de EGFR es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También se incluyen anticuerpos C225 inmunoespecíficos para los inhibidores de EGFR y Src.

- 25 30 También es adecuado para su uso como agente citostático CASODEX® (bicalutamida, Astra Zeneca) que hace que los carcinomas dependientes de andrógenos no sean proliferativos. Otro ejemplo más de un agente citostático es el antiestrógeno TAMOXIFEN® que inhibe la proliferación o el crecimiento de cáncer de mama dependiente de estrógenos. Inhibidores de la transducción de señales proliferativas celulares son agentes citostáticos. Los ejemplos representativos incluyen inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de PI3, inhibidores de Src quinasa e inhibidores de PDGF.

- 35 Los compuestos también podrían administrarse en combinación con opioides o cannabinoides, AINE, esteroides para el alivio crónico del dolor. Los segundos agentes terapéuticos adicionales que pueden administrarse con un presente inhibidor multifuncional de la presente invención se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se da a conocer en la publicación de patente estadounidense 2011/0053907; y la publicación de patente estadounidense n.º 2011/0009405, y la publicación de patente estadounidense n.º 2010/0249099.

- 40 45 Los compuestos de la presente invención se administran normalmente en mezcla con un portador farmacéutico seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención se formulan de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los presentes compuestos multifuncionales.

- Estas composiciones farmacéuticas pueden fabricarse, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o de liofilización convencionales. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto multifuncional se administra por vía oral, la composición está normalmente en forma de un

comprimido, cápsula, polvo, disolución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición puede contener adicionalmente un portador sólido, tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contiene de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 95%, y preferiblemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 %, de un presente compuesto multifuncional. Cuando se administra en forma líquida, puede

5 añadirse un portador líquido, tal como agua, petróleo o aceites de origen animal o vegetal. La forma líquida de la composición puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otras disoluciones de sacárido, o glicoles. Cuando se administra en forma líquida, la composición contiene de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 90 %, y preferiblemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 %, en peso, de un presente compuesto multifuncional.

10 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un presente compuesto multifuncional se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la composición está en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos. La preparación de tales disoluciones parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad, y similares, está dentro de la habilidad en la técnica. Una composición preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene, normalmente, un vehículo isotónico.

15 Los presentes compuestos multifuncionales pueden combinarse fácilmente con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los agentes activos se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un paciente que va a tratarse. Pueden obtenerse preparaciones farmacéuticas para uso oral añadiendo un presente inhibidor multifuncional a un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesar la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, cargas y preparaciones de celulosa. Si se desea, pueden añadirse agentes desgregantes.

20 25 Un presente inhibidor multifuncional puede formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Pueden presentarse formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

30 35 40 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas del agente activo en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de un presente inhibidor multifuncional como suspensiones para inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos o ésteres de ácidos grasos sintéticos. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos y permiten la preparación de disoluciones altamente concentradas. Alternativamente, una presente composición puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

45 50 Un presente inhibidor multifuncional también puede formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contiene bases de supositorios convencionales. Además de las formulaciones descritas anteriormente, el presente inhibidor multifuncional también puede formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los presentes inhibidores multifuncionales pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico.

55 60 65 En particular, los presentes inhibidores multifuncionales pueden administrarse por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, o bien solos o bien mezclados con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión. Los presentes compuestos multifuncionales también pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intracoronaria. Para administración parenteral, los inhibidores multifuncionales se usan mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o monosacáridos, tales como manitol o glucosa, para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Los compuestos también podrían administrarse usando un inhalador como un aerosol para alcanzar el tejido pulmonar o mediante administración como un aerosol nasal.

Un presente inhibidor multifuncional y el segundo agente terapéutico pueden administrarse juntos como una única dosis unitaria o por separado como múltiples dosis unitarias, en donde el inhibidor multifuncional se administra antes que el segundo agente terapéutico o viceversa. Se prevé que puedan administrarse una o más dosis de un presente inhibidor multifuncional y/o una o más dosis de un segundo agente terapéutico.

En una realización, un presente inhibidor multifuncional y un segundo agente terapéutico se administran

simultáneamente. En realizaciones relacionadas, un presente inhibidor multifuncional y un segundo agente terapéutico se administran a partir de una única composición o a partir de composiciones separadas. En una realización adicional, un presente inhibidor multifuncional y un segundo agente terapéutico se administran secuencialmente.

- 5 Los inhibidores de mTOR, MEK y PI3K anteriores tenían propiedades que dificultaban su desarrollo como agentes terapéuticos. Según una característica importante de la invención, los presentes compuestos multifuncionales se sintetizaron y evaluaron como inhibidores dobles para mTOR y/o MEK y/o PI3K. Se prevé que los presentes compuestos multifuncionales sean más eficaces y menos tóxicos que una terapia de combinación que usa un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K y un inhibidor de mTOR.

## 10 Síntesis de compuestos

Los presentes compuestos son el resultado de la conjugación, o unión, de un inhibidor de MEK con un inhibidor de mTOR/PI3K o un inhibidor de PI3K para llegar a los inhibidores multifuncionales de la presente invención. Se sintetizan inhibidores de MEK de tipo benzhidroxamato, por ejemplo, como se da a conocer en el documento WO 2002/006213. Se sintetizan inhibidores de MEK de tipo SMK-17, por ejemplo, como se da a conocer en el documento WO 2004/083167. Los inhibidores de PI3K basados en triazina se sintetizan como se da a conocer en las publicaciones de patente estadounidense n.<sup>o</sup>s 2011/0053907, 2011/0009405 y 2010/0249099. Se sintetizan inhibidores de mTOR como se da a conocer en AM Venketasan *et al.*, J. Med. Chem. 53: 2636, 2010; N. Nishimur *et al.*, J. Med. Chem. 54: 20 4735-51, 2011; y el documento WO 2008/032162.

## Materiales y métodos

25 Las síntesis químicas que implican reactivos y disolventes sensibles al aire o a la humedad se realizaron a una presión positiva de nitrógeno en material de cristal secado en horno. Todos los demás reactivos químicos y disolventes anhidros se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, y se usan sin purificación adicional. Se sintetizaron compuestos intermedios clave de análogos de 1,3,5-triazina (2a, 2b) (7) y éster pentafluorofenílico de ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico (21) (compuesto 3) tal como se notificó anteriormente. Se adquirieron 4-metilbencenosulfonato de 16,16-dimetil-15-oxo-3,6,9,12,14-pentaoxa-13-azaheptadecilo (tosilato de t-Boc-aminoxy 30 PEG4) y cloruro de 4-clorobutano-1-sulfonilo de Broadpharm, San Diego, CA, y Enamine Ltd., Monmouth Jct., NJ, respectivamente. Todos los demás reactivos químicos y disolventes anhidros se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, y se usan sin purificación adicional.

35 Se realizó cromatografía en columna en gel de sílice 60 (ASTM de 230-400 de malla) adquirido de EMD Millipore, Billerica, MA. Se realizó cromatografía de capa fina (CCF) usando Uniplates GF de gel de sílice Analtech (250 µm). Las placas de CCF se visualizaron después del desarrollo con luz ultravioleta (UV) o mediante pulverización con reactivo de ácido fosfomolibdico con calentamiento posterior. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se registraron en instrumentos Varian a 400 y 700 MHz, respectivamente, en CDCl<sub>3</sub> o CD<sub>3</sub>OD como disolvente con tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se indican en partes por millón (ppm) 40 y en hercios (Hz), respectivamente. Los análisis espectrales de masas de alta resolución se realizaron usando o bien un espectrómetro de masas VG-70-250-S para los modos de impacto de electrones (EI) e ionización química (DCI), un instrumento Waters Autospec Ultima con una interfaz de electrospray para el modo de ionización por electrospray (ESI), o una ejecución con Waters Tofspec-2E en modo reflectrón. La HPLC se realizó usando un sistema de HPLC 45 Waters Breeze (Waters Corporation, Milford, MA) equipado con un detector de absorbancia de longitud de onda dual Waters 2487. El análisis por HPLC se realizó a temperatura ambiental en una columna Waters XSELECT CSH C-18 (4,6 mm x 250 mm), partícula de 5 µm, con TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (A) y TFA al 0,1 % en mezclas de disolventes de CH<sub>3</sub>CN (B) a un caudal de 1 ml/min con absorbancia UV monitorizada a 254 y 280 nm. Las ejecuciones de HPLC se realizaron usando un gradiente de disolvente de 25 min de bien el 30 % de B al 90 % de B (método I), del 60 % de B 50 al 90 % de B (método II) o bien del 10% de B al 90% de B (método III). Se demostró que todos los compuestos sometidos a prueba biológicamente tenían >95 % de pureza química mediante análisis por HPLC en gradiente de fase inversa.

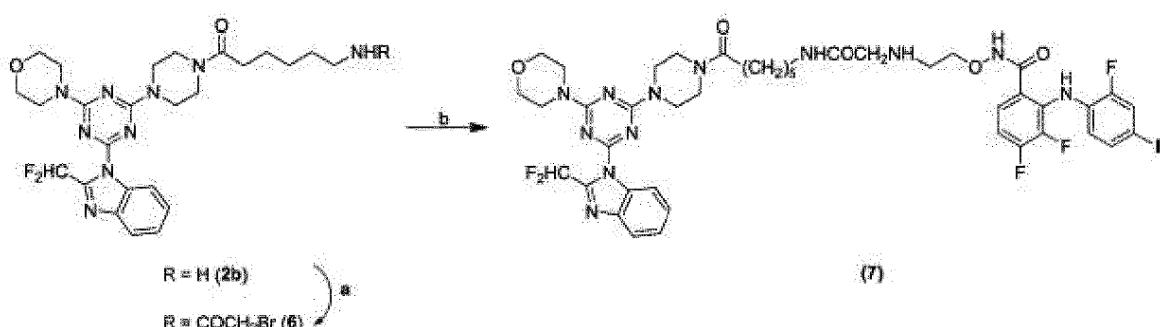
## Abreviaturas usadas

|    |       |   |
|----|-------|---|
| 55 | Akt   | proteína quinasa B                                |
|    | MEK   | proteína quinasa activada por mitógeno alostérica |
| 60 | PI3K  | fosfatidilinositol 3-quinasa                      |
|    | mTOR  | diana de rapamicina de mamífero                   |
|    | sa    | señal ancha                                       |
| 65 | cLogP | log P calculado                                   |

|    |                        |  |
|----|------------------------|--|
|    | CH <sub>3</sub> CN     | acetonitrilo   |
|    | DCM                    | diclorometano  |
| 5  | DMF                    | N,N-dimetilformamida   |
|    | DIEA                   | N,N-diisopropiletilamina   |
| 10 | DMSO                   | dimetilsulfóxido   |
|    | Et <sub>3</sub> N      | trimetilamina  |
|    | HPBCD                  | (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina                          |
| 15 | MEK                    | metil etil cetona  |
|    | ta                     | temperatura ambiente   |
| 20 | TFA                    | ácido trifluoroacético   |
|    | THF                    | tetrahidrofurano   |
|    | PdCl <sub>2</sub> dppf | dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II)       |
| 25 | HAc                    | ácido acético  |
|    | EDCI                   | 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida                        |
| 30 | HOBT                   | 1-hidroxibenzotriazol  |
|    | P(Ph) <sub>3</sub>     | trifenilfosfina  |
|    | DEAD                   | azodicarboxilato de dietilo  |
| 35 | LHMDS                  | hexametildisilazida de litio                                       |
|    | TBAF                   | fluoruro de tetra-n-butilamonio                                    |
| 40 | PyBOP                  | (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio) |

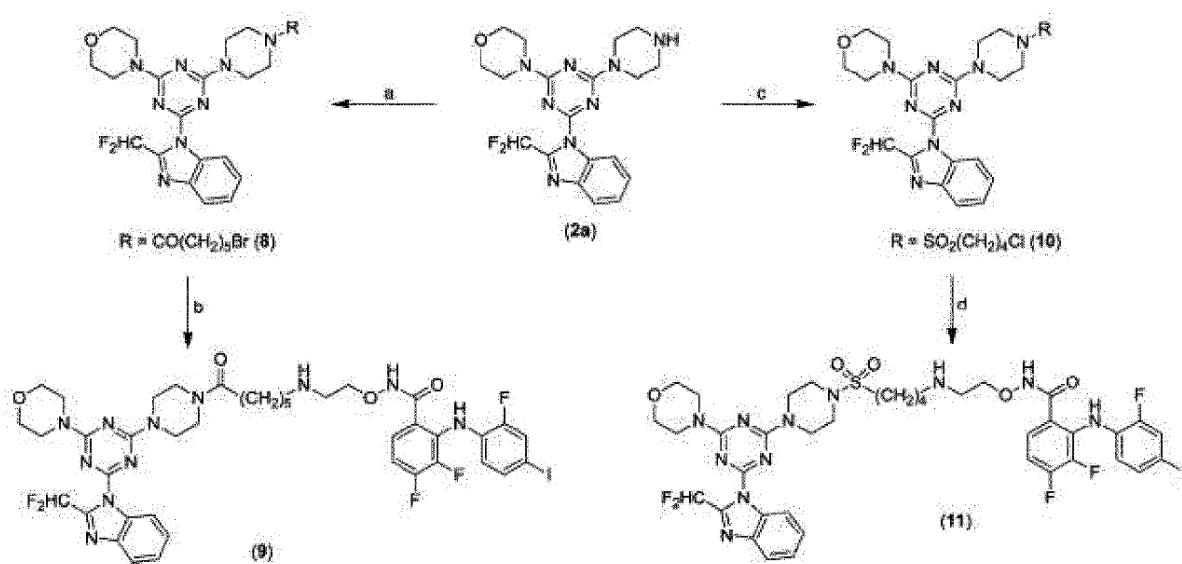
40 Los inhibidores de MEK y PI3K pueden conjugarse usando los enfoques no limitativos establecidos en el esquema 1 al esquema 4 (dirigidos a compuestos no incluidos en la invención). A continuación, no se entenderá que los compuestos forman parte de la invención a menos que se indique que forman parte de la invención.

45 **Esquema 1**



50 **Reactivos y condiciones:** (a) BrCH<sub>2</sub>COBr, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, de 0 °C a t.a., 3 h, 80 % (b) 5, NaI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, t.a., 4 h, 24 %.

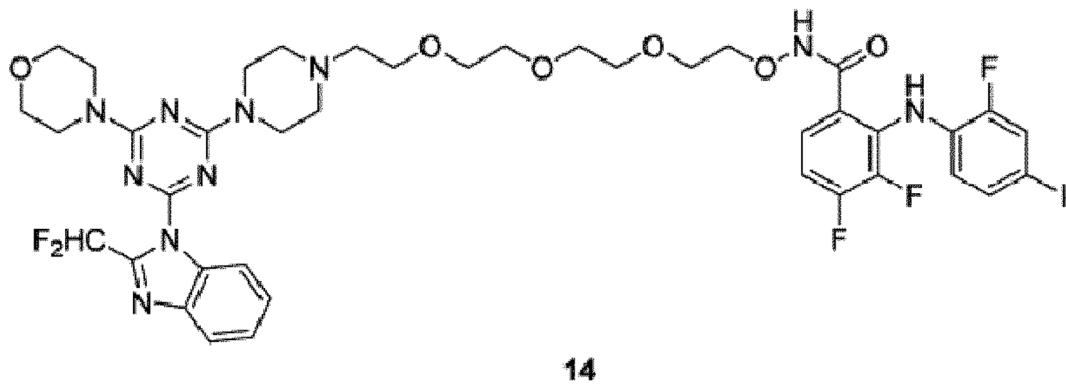
## Esquema 2



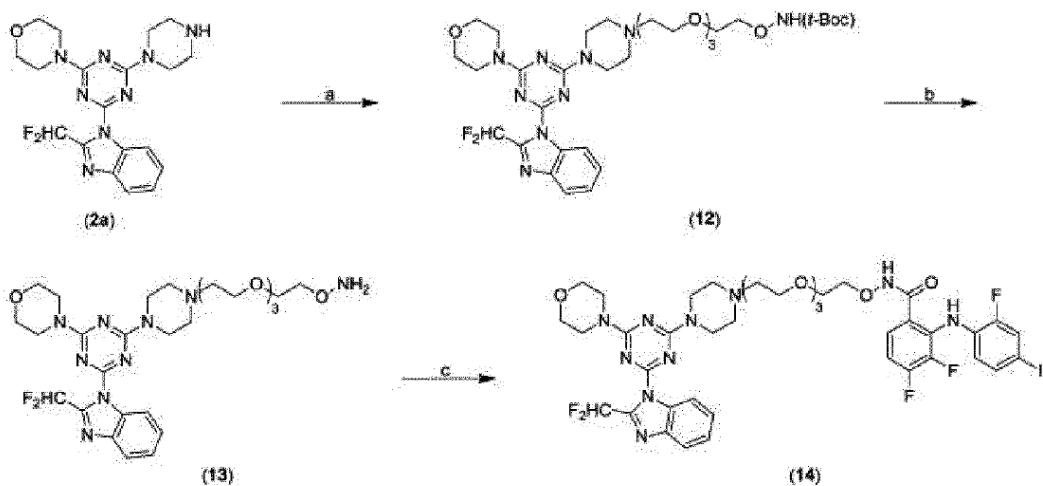
**Reactivos y condiciones:** (a) Br(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MEK, 0 °C a t.a., 3 h, 96 %; (b) 5, NaI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, refluxo, 4 h, 37 %; (c) Cl(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C a t.a., 18 h, 92 %; (d) 5, NaI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, refluxo 18 h, 30 %.

5

## Esquema 3: Síntesis de 14 (ST-162)



10

IC<sub>50</sub> de MEK1: 0,015 nMIC<sub>50</sub> de PI3K: 191 nM

**Reactivos y condiciones:** (a)  $\text{TosO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{NH}(\text{t-Boc})$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , tolueno, refluxo, 24 h, 71 %; (b) TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0-5 °C, 2 h, 82 % (c) 2, DIEA, DMF, t.a., 18 h, 55 %.

**Química de síntesis.** Se sintetizaron los productos intermedios clave 2a, 2b y 3 (figura 3) usados en la preparación de los compuestos inhibidores bifuncionales diana como se notificó previamente (7, 21). El inhibidor de MEK1 5 se sintetizó por tratamiento de 3 con éster terc-butílico del ácido (2-aminoxietil)carbámico<sup>22</sup> en DMF en presencia de DIEA para dar el producto intermedio 4 seguido de escisión catalizada por ácido trifluoroacético del grupo protector Boc (figura 3). La síntesis del derivado de inhibidor 7 se realizó como se muestra en el esquema 1. Inicialmente, se trató 2b con bromuro de bromoacetilo en presencia de trietilamina para dar el correspondiente derivado de 2-bromoacetamida 6 que se hizo reaccionar con 5 para dar análogo de inhibidor 7 con un rendimiento global del 18,5 %. Los análogos de inhibidores 9 y 11 se obtuvieron del producto intermedio de 1,3,5-triazina sustituida con piperazina común 2a como se muestra en el esquema 2. La triazina 2a se trató inicialmente con cloruro de 6-bromohexanoilo en presencia de carbonato de potasio para proporcionar el análogo de 6-bromohexanamida 8 correspondiente que proporcionó el análogo de inhibidor 9 con un rendimiento del 37 % después de la reacción con el inhibidor de MEK 5 en acetonitrilo a refluxo. El análogo de inhibidor 11 se preparó a partir de 2a con un rendimiento global del 27,5 % mediante un enfoque similar por medio del producto intermedio de 4-clorobutanosulfonamida 10. La preparación del inhibidor bifuncional unido pegilado 14 (ST-162) se llevó a cabo como se muestra en el esquema 3. Inicialmente, el producto intermedio de 1,3,5-triazina sustituida con piperazina sustituida 2a se calentó a refluxo con el derivado de tosilato de PEG4 aminoxyprotegido y carbonato de potasio en tolueno para dar el producto intermedio 12 seguido de la eliminación catalizada por TFA del grupo Boc para dar el derivado de aminoxylo 13. La reacción posterior de 13 con el derivado de éster activado 3 como se describió anteriormente proporcionó 14 con un rendimiento del 55 %.

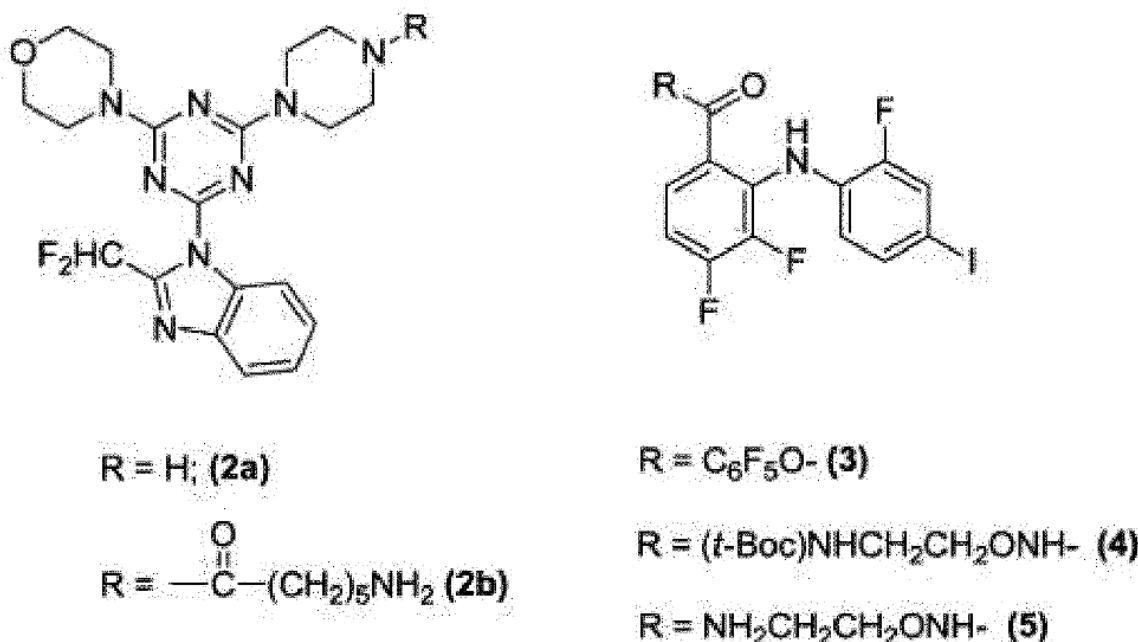


Figura 3. Productos intermedios clave usados en la síntesis de inhibidores bifuncionales de MEK/PI3K.

**3,4-Difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-{2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxy}benzamida (4).**

Una disolución de éster terc-butílico del ácido (2-aminoxietil)carbámico<sup>22</sup> (0,945 g, 5,36 mmol) en DMF (6 ml) se añadió en porciones a una disolución de éster pentafluorofenílico del ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico<sup>21</sup> (3) (3,0 g, 5,36 mmol) en DMF (6 ml) seguido de DIEA (1,38 g, 1,87 ml, 10,7 mmol) y se agitó a t.a durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad a presión reducida, se diluyó con EtOAc (100 ml) y se extrajo con salmuera (2 x 50 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 30-55 % de EtOAc en hexanos para proporcionar 2,77 g (94%) del compuesto del título 4 como una espuma blanca.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): δ 10,31 (sa, 1H), 8,59 (sa, 1H), 7,41-7,38 (m, 2H), 7,31 (d, 1H,  $J$  = 8,5 Hz), 6,91-6,84 (m, 1H), 6,61-6,55 (m, 1H), 5,05 (sa, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,43-3,39 (m, 2H), 1,45 (s, 9H). EMAR (ESI+): m/z calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{F}_3\text{IO}_4$  [M+ H $^+$ ], 552,0602. Encontrado: 552,0594.

**3,4-Difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-(2-aminoetoxi)benzamida (5).** Se añadió ácido trifluoroacético (17,1 g, 11,5 ml, 150 mmol) a una disolución fría (0-5 °C) de 4 (2,77 g, 5,0 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) bajo una atmósfera

de nitrógeno y se agitó a esta temperatura durante 3 h. Tras la finalización de la reacción, la mezcla se diluyó con Et<sub>2</sub>O (250 ml) y hielo picado (100 g). El pH de la disolución acuosa se ajustó a pH 8 mediante la adición lenta de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y la fase orgánica se separó, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 5-30 % de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 1,72 g (76 %) del compuesto del título 5 como un sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD): δ 7,55-7,51 (m, 1H), 7,41 (dd, 1H, J = 10,9, 1,9 Hz), 7,32 (dd, 1H, J = 8,6, 1,0 Hz), 6,99-6,92 (m, 1H), 6,57-6,51 (m, 1H), 4,05 (t, 2H, J = 5,0 Hz), 3,10 (t, 2H, J = 5,0 Hz). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>F<sub>3</sub>IO<sub>2</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 452,0077. Encontrado: 452,0079. HPLC (método 1): t<sub>R</sub> = 9,72 min.

5 **2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(6-(Nbromoacetilamino)hexanoil)}piperazino]-1,3,5-triazin-2-il]-1H-bencimidazol (6).** Una disolución del análogo de 1,3,5-triazina 2b (0,265 g, 0,50 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,102 g, 142 μl, 1,0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (38 ml) se enfrió hasta 0 °C usando un baño de hielo y se trató gota a gota bajo una atmósfera de nitrógeno con una disolución de bromuro de bromoacetilo (0,122 g, 53 μl, 0,60 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml). Se retiró el baño de hielo, y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta ta y se agitó durante 3 h adicionales. La mezcla se diluyó con EtOAC (100 ml), la fase orgánica se lavó con HCl 1 N acuoso (50 ml), NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, (50 ml), salmuera (2 x 50 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 2-8 % de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar 0,26 g (80 %) del compuesto del título 6 como un sólido amorpho beis. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,33 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,47-7,39 (m, 2H), 6,62 (sa, 1H), 3,88-3,74 (m, 16H), 3,60 (m, 2H), 3,35-3,30 (m, 2H), 2,42-2,39 (m, 2H), 1,75-1,68 (m, 2H), 1,62-1,57 (m, 2H), 1,46-1,38 (m, 2H). EMAR (ESI): m/z calculado para C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>9</sub>BrF<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 650,2009. Encontrado: 650,1985.

10 **N-(2-((6-(4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)-6-oxohexil)amino)-2-oxoetil)amino)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)benzamida (compuesto 7).** Una disolución del análogo de benzidroxamato 5 (0,18 g, 0,40 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (0,061 g, 0,44 mmol) y yoduro de sodio (0,066 g, 0,44 mmol) en DMF (3 ml) se trató gota a gota con una disolución de 6 (0,26 g, 0,40 mmol) en DMF (2 ml) y se agitó a ta durante 18 h. La mezcla se diluyó con EtOAC (50 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 25 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente de 5-20% de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía NH<sub>4</sub>OH al 1% para dar 0,098 g (24 %) del compuesto del título 7 como un sólido amorpho de color crema. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub> + 1 gota de CD<sub>3</sub>OD): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,9 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,47-7,40 (m, 3H), 7,35-7,25 (m, 2H), 6,79-6,76 (m, 1H), 6,52-6,50 (m, 1H), 4,09 (m, 2H), 3,90-3,71 (m, 16H), 3,58 (m, 2H), 3,34 (s, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,93 (m, 2H), 2,37-2,16 (m, 4H), 1,61 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,33-1,26 (m, 2H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>N<sub>12</sub>F<sub>5</sub>IO<sub>5</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 1021,2752 Encontrado: 1021,2754. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 15,34 min (95,3% de pureza química).

15 **2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(6-bromohexanoil)}piperazino]-1,3,5-triazin-2-il]-1H-bencimidazol (8).** Una suspensión agitada del análogo de 1,3,5-triazina 2a (0,208 g, 0,5 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (0,208 g, 1,5 mmol) en metil etil cetona (3,5 ml) se enfrió hasta 0-5 °C usando un baño de hielo y se trató gota a gota bajo una atmósfera de nitrógeno con una disolución de cloruro de 6-bromohexanoilo (0,112 g, 81 μl, 0,525 mmol) en MEK (1,5 ml). Se retiró el baño de hielo, y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 3 h adicionales. El residuo obtenido después de la concentración a presión reducida se repartió entre NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (100 ml) y EtOAC (100 ml). La fase orgánica se retiró, se lavó sucesivamente con salmuera (50 ml), H<sub>2</sub>O (50 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 3-10 % de acetona en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar 0,28 g (96%) del compuesto del título 8 como un aceite incoloro. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,47-7,39 (m, 2H), 3,89-3,60 (m, 16H), 3,44 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 2,41 (m, 2H), 1,95-1,88 (m, 2H), 1,76-1,68 (m, 2H), 1,57-1,49 (m, 2H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>BrF<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 593,1794. Encontrado: 593,1795. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 20,38 min.

20 **N-(2-((6-(4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)-6-oxohexil)amino)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)benzamida (compuesto 9).** Una mezcla de 8 (0,158 g, 0,27 mmol), análogo de benzidroxamato 5 (0,24 g, 0,53 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (0,042 g, 0,30 mmol) y NaI (0,045 g, 0,30 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (5 ml) se agitó a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAC (100 ml), se extrajo con salmuera (100 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 3-20 % de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,096 g (37 %) del compuesto del título 9 como un polvo amorpho blanco. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,32 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,63 (m, 1H), 7,54 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,46-7,38 (m, 2H), 7,33-7,25 (m, 2H), 6,78 (m, 1H), 6,51 (m, 1H), 4,27 (m, 2H), 3,88-3,41 (m, 16H), 3,14 (m, 2H), 2,88 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,31 (m, 2H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>N<sub>11</sub>F<sub>5</sub>IO<sub>4</sub> [M H<sup>+</sup>], 964,2537. Encontrado: 964,2550. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 15,71 min (96,7 % de pureza química).

25 **2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(4-clorobutano-1-sulfonil)}piperazino]-1,3,5-triazin-2-il]-1H-bencimidazol (10).** Una disolución del análogo de 1,3,5-triazina 2a (0,208 g, 0,5 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,061 g, 84 μl, 0,6 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se enfrió hasta 0-5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno usando un baño de hielo. Una disolución de cloruro de 4-clorobutano-1-sulfonilo (0,096 g, 70 μl, 0,5 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) gota a gota, se retiró el baño de hielo, y se agitó la mezcla de reacción a ta durante 18 h. La mezcla de reacción se trató con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y se lavó sucesivamente con salmuera (2 x 50 ml), H<sub>2</sub>O (50 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó

por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 1-5 % de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,264 g (92 %) del compuesto del título 10 como una espuma blanca. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,31 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,53 (t, 1H, J = 53,3 Hz), 7,47-7,39 (m, 2H), 4,00 (m, 4H), 3,89 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 3,58 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 3,40 (m, 4H), 3,00-2,96 (m, 2H), 2,05-1,93 (m solapante, 4H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>ClF<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S [M+ H<sup>+</sup>], 571,1812. Encontrado: 571,1812.

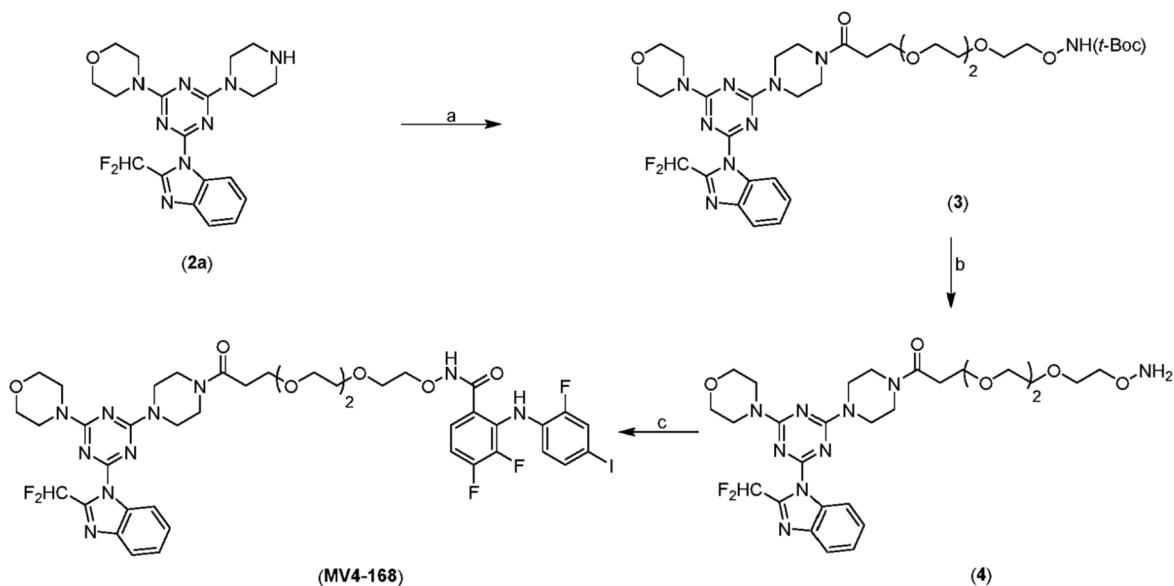
**N-(2-((4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)sulfonil)-butil)amino)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)-amino)benzamida (compuesto 11).** Una mezcla del análogo de 4-clorobutilsulfonamida 10 (0,156 g, 0,273 mmol), análogo de benzhidroxamato 5 (0,248 g, 0,55 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhídrico (0,042 g, 0,30 mmol) y NaI (0,045 g, 0,30 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (5 ml) se agitó a reflujo durante 18 h. La mezcla se diluyó con CHCl<sub>3</sub> (100 ml), se extrajo con salmuera (2 x 50 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 5-15 % de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,080 g (30 %) del compuesto del título 11 como un polvo amorfo blanco. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub> + 1 gota de CD<sub>3</sub>OD): δ 8,30 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 7,89 (d, 1H, J = 7,4 Hz), 7,53 (t, 1H, J = 53,3 Hz), 7,47-7,26 (m, 5H), 6,81-6,79 (m, 1H), 6,52-6,51 (m, 1H), 4,15 (m, 2H), 3,96-3,79 (m, 12H), 3,32 (m, 4H), 3,00 (m, 2H), 2,88 (m, 2H), 2,77 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,72 (m, 2H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>11</sub>F<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S [M H<sup>+</sup>], 986,2050. Encontrado: 986,2043. HPLC (método III): t<sub>R</sub> = 20,09 min (97,9 % de pureza química).

**2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(2-(2-(terc-butilcarbonilaminoxi)etoxi)etoxi)etoxi}etil]-piperazino-1,3,5-triazin-2-il]-1H-bencimidazol (12).** Una mezcla del análogo de 1,3,5-triazina 2a (0,52 g, 1,25 mmol), tosilato de t-Boc-aminoxy PEG4 (0,58 g, 1,25 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhídrico (0,345 g, 2,5 mmol) en tolueno (8 ml) se agitó a reflujo durante 24 h. La mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml), se extrajo con salmuera (100 ml), H<sub>2</sub>O (100 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 2-5 % de CH<sub>3</sub>OH en CHCl<sub>3</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,63 g (71 %) del compuesto del título 12 como una goma viscosa de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,34 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,99 (s, 1H), 7,88 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,43-7,37 (m, 2H), 4,03-4,01 (m, 2H), 3,91-3,86 (m, 8H), 3,80-3,78 (m, 4H), 3,73-3,63 (m, 12H), 2,66 (t, 2H, J = 5,6 Hz), 2,61 (m, 4H), 1,47-1,48 (m, 9H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>9</sub>F<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 708,3639. Encontrado: 708,3636. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 9,76 min.

**2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(2-(2-(2-aminoxi)etoxi)etoxi)etoxi}etil]piperazino-1,3,5-triazin-2-il]-1H-bencimidazol (13).** Una disolución agitada de 12 (0,255 g, 0,36 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se enfrió hasta 0 °C con un baño de hielo y se trató gota a gota con una disolución de TFA (2,5 ml) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml). La reacción se agitó a 0-5 °C durante 2 h adicionales, después se trató con agua enfriada con hielo (100 ml), y el pH de la fase acuosa se ajustó a pH 8 con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado. La mezcla se extrajo dos veces con EtOAc (100 ml) y el extracto orgánico se lavó sucesivamente con salmuera (100 ml), H<sub>2</sub>O (100 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 2-4% de CH<sub>3</sub>OH en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contenía el 1% de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,18 g (82%) del compuesto del título 13 como un aceite viscoso incoloro. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,34 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,89 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,45-7,37 (m, 2H), 5,52 (sa, 2H), 3,89-3,69 (m, 14H), 3,67 (m, 12H), 2,66 (t, 2H, J = 5,5 Hz), 2,60 (m, 4H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>9</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 608,3115. Encontrado: 608,3114. HPLC (método III): t<sub>R</sub> = 10,75 min.

**N-(2-(2-(2-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)-amino)benzamida (ST-162; 14).** Una mezcla de 13 (0,10 g, 1,64 mmol), análogo de éster pentafluorofenílico 3 (0,092 g, 1,64 mmol) y DIEA (0,042 g, 0,58 μl, 0,33 mmol) en DMF (1 ml) se agitó a ta durante 24 h. La mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml), se extrajo con salmuera (2 x 100 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 2-5 % de CH<sub>3</sub>OH en CHCl<sub>3</sub> que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 0,088 g (55%) del compuesto del título 14 como un sólido cristalino de color rosa pálido. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub> + 1 gota de CD<sub>3</sub>OD): δ 8,33 (dd, 1H, J = 7,8, 1,4 Hz), 7,86 (dd, 1H, J = 7,0, 1,5 Hz), 7,58 (t, 1H, J = 53,6 Hz), 7,46-7,26 (m, 5H), 6,86-6,79 (m, 1H), 6,58-6,52 (m, 1H), 4,13-4,11 (m, 2H), 3,87-3,74 (m, 14H), 3,67-3,60 (m, 10H), 2,86 (sa, 1H), 2,64 (t, 2H, J = 5,5 Hz), 2,59-2,52 (m, 4H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>40</sub>H<sub>45</sub>N<sub>10</sub>F<sub>5</sub>O<sub>6</sub> [M+ H<sup>+</sup>], 983,2483. Encontrado: 983,2477. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 14,56 min.

#### **Esquema 4 Síntesis de MV4-168 (ST-168)**



**Reactivos y condiciones:** (a) (t-Boc)NHO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, PyBOP, DIEA, THF:DCM, 4 h, 73 %; (b) TFA, DCM, 0-5 °C, 2 h, 82 % (c) 2, DIEA, PyBop, THF:DCM, 18 h, 54 %.

5 Nota: La síntesis del compuesto intermedio 2 se notifica en el documento WO2002/006213A2.

## Detalles experimentales para la síntesis de MV4-168 (ST-168)

Los compuestos intermedios análogo de 1,3,5-triazina (2a) (2) y ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-benzoico (2) (3) se sintetizaron como se notificó previamente. Se adquirió ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxa-5-azaoctadecan-18-oico (ácido t-Boc-aminoxy-PEG3) de Broadpharm, San Diego, CA. Se demostró que todos los compuestos sometidos a prueba biológicamente tenían >98 % de pureza química mediante análisis por HPLC en gradiente de fase inversa.

15 2-(2-(2-(3-(4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxicarbamato de terc-butilo (3)

Una disolución del análogo de ácido t-Boc-aminoxi PEG3 (170 mg, 0,50 mmol) en 12 ml de THF:DCM (1:1) se trató con análogo de 1,3,5-triazina 2a (208 mg, 0,50 mmol), DIEA (142 mg, 192 µl, 1,1 mmol) y PyBop (261 mg, 0,50 mmol) y se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 4 h. El análisis por HPLC (método 1) y el análisis por CCF (placas de sílice Analtech; DCM:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH (95:5:1)) mostró la finalización de la reacción en este punto. La mezcla se concentró a presión reducida, se diluyó con DCM (50 ml) se extrajo con salmuera (25 ml), H<sub>2</sub>O (25 ml) y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 1 % - 4 % de CH<sub>3</sub>OH en DCM que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 269 mg (73%) del compuesto del título 3 como un aceite viscoso. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,72 (sa, 1H), 7,56 (t, 1H, J = 53,6 Hz), 7,47 - 7,39 (m, 2H), 4,00 - 3,65 (m, 30H), 2,71 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 1,47 (s, 9H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>9</sub>F<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+ H<sup>+</sup>]: 736,3588. Encontrado: 736,3588; calculado para [M+ Na<sup>+</sup>]: 758,3408. Encontrado: 758,3407 (100%). HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 15,8 min.

30 **3-(2-(2-(Aminooxi)etoxi)etoxi)etoxi-1-(4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)propan-1-ona (4).** Una disolución agitada de 3 (0,184 g, 0,25 mmol) en DCM (4 ml) se enfrió hasta 0 °C con un baño de hielo y se trató con una disolución de TFA (2 ml) en DCM (2 ml). La reacción se agitó a 0-5 °C durante 2 h adicionales, después se trató con agua helada (25 ml), y el pH de la fase acuosa se ajustó a pH 8 con solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se extrajo dos veces con EtOAc (25 ml), y los extractos orgánicos se lavaron sucesivamente con salmuera y H<sub>2</sub>O, después se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La concentración a presión reducida proporcionó el producto 4 (130 mg; 82 %) como un aceite amarillo pálido que se usó directamente en la siguiente etapa. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,96 (t, 1H, J = 53,6 Hz), 7,47 - 7,39 (m, 2H), 3,52 (s. a., 1H), 3,93 - 3,65 (m, 30H), 2,70 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 1,68 (s. a., 2H). EMAR (ESI+): m/z calculado para C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>9</sub>F<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+ H<sup>+</sup>]: 636,3064. Encontrado: 636,3068 (100%). Calculado para [M+ Na<sup>+</sup>]: 658,2884. Encontrado: 658,2885. HPLC (método I): t<sub>R</sub> = 7,7 min.

**N-(2-(2-(3-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)benzamida (ST-168).** Una mezcla de 4 (127 mg, 0,20 mmol), ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-benzoico 2 (79 mg, 0,20 mmol) y DIET (57 mg, 77  $\mu$ L, 0,44 mmol) en una mezcla de 4 ml de THF:DCM (1:1) se trató con PyBop (105 mg, 0,20 mmol) y se agitó a ta

durante 18 h. El análisis por HPLC (método 1) y el análisis por CCF (sílice Analtech; DCM:CH<sub>3</sub>OH:NH<sub>4</sub>OH; 95:5:1; Rf del producto ST-168 = 0,20) mostró la finalización de la reacción. La mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se disolvió en EtOAc (50 ml), se lavó con HCl 0,1 N acuoso, NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, salmuera y se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

5 El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con un gradiente del 1 % - 6 % de CH<sub>3</sub>OH en DCM que contenía el 1 % de NH<sub>4</sub>OH para dar 110 mg (54 %) del compuesto del título como un sólido amorfó blanco. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (s. a., 1H), 8,32 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 7,55 (t, 1H, J = 53,5 Hz), 7,44 - 7,28 (m, 5H), 6,83 - 6,77 (m, 1H), 6,58 - 6,52 (m, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,88 - 3,50 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 1,89 (sa, 2H). EMAR (ESI<sup>+</sup>): m/z calculado para C<sub>41</sub>H<sub>45</sub>N<sub>10</sub>F<sub>5</sub>IO<sub>7</sub> [M + H<sup>+</sup>]: 1011,2432. Encontrado: 1011,2431. Calculado para [M<sup>+</sup> Na<sup>+</sup>]: 1033,2251. Encontrado: 1033,2247 (100%). HPLC (método II): t<sub>R</sub> = 17,7 min.

10 *Método de análisis por HPLC I.* El análisis por HPLC se realizó a temperatura ambiental en una columna Waters XSELECT CSH C-18 (4,6 x 250 mm), partícula de 5 μ, con TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O (A) y TFA al 0,1 % en mezclas de disolvente de CH<sub>3</sub>CN (B) a un caudal de 1 ml/min. El análisis se realizó con un gradiente de disolvente de desde el 30 % de B (inicial) hasta el 90 % de B a lo largo de un tiempo de ejecución de 25 min con monitorización de la absorbancia UV a 254 y 280 nm.

15 *Método de análisis por HPLC II;* el análisis por HPLC se realizó como anteriormente con un gradiente de disolvente de desde el 50 % de B (inicial) hasta el 90 % de B a lo largo de un tiempo de ejecución de 25 min.

## 20 Datos biológicos

Se describe la síntesis de una serie de entidades individuales, inhibidores de MEK1/PI3K bifuncionales lograda mediante la unión covalente de análogos estructurales del inhibidor de PI3K competitivo con ATP ZSTK474 y el inhibidor de MEK no competitivo con ATP PD0325901. Los inhibidores biofuncionales mostraron una potente inhibición 25 *in vitro* de MEK1 (0,015 < IC<sub>50</sub> (nM) < 500) y PI3K (54 < IC<sub>50</sub> (nM) < 341) en ensayos de inhibición enzimática. La inhibición concurrente de MEK1 y PI3K se demostró con el compuesto 14 en dos líneas de células tumorales (A549, D54). Los inhibidores produjeron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis similar a la administración combinada de dosis equivalentes de ZSTK474 y PD0325901. La eficacia *in vivo* del compuesto 14 30 después de la administración oral se demostró en ratones portadores de glioma D54 y tumor pulmonar A549. El compuesto 14 mostró una inhibición del 95% y el 67% de la fosforilación de ERK1/2 y Akt en el tumor, respectivamente, a las 2 h después de la administración mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, confirmando la biodisponibilidad y eficacia de esta estrategia de inhibidor bifuncional hacia la inhibición combinada de MEK1/PI3K.

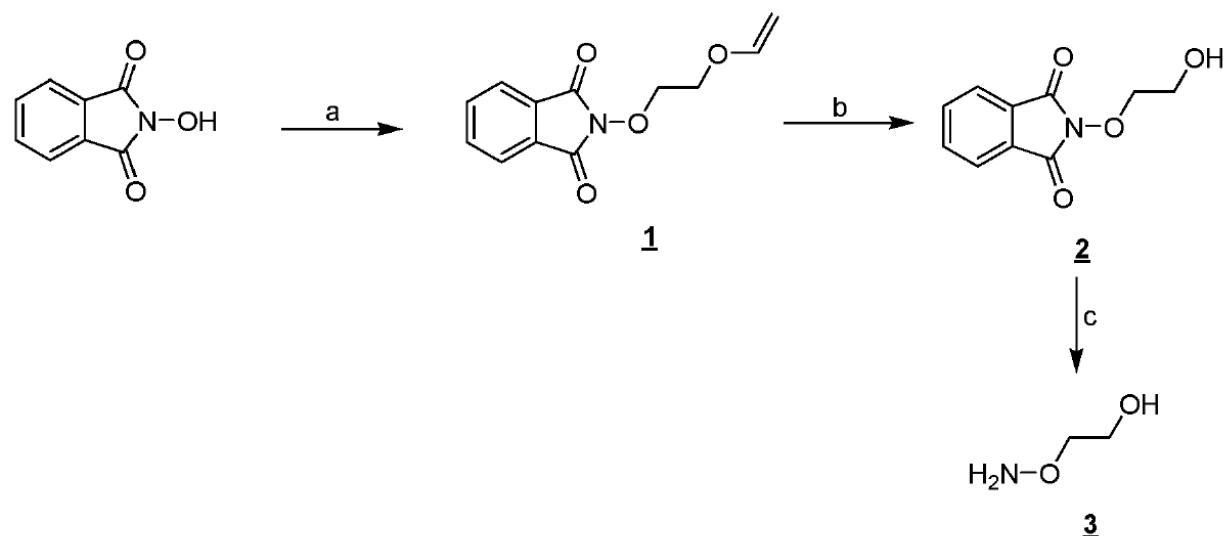
35 **Acoplamiento virtual del compuesto 14 en bolsillos de unión de MEK1 y PI3K.** Se predice que ST-162 retiene muchas de las interacciones de unión presentadas por el potente inhibidor de MEK1 PD318088 dentro de la región de unión alóstérica de MEK1, incluyendo interacciones clave de ambos oxígenos de hidroxamato con Lys97, el átomo de 4-fluor en el anillo A con NH de la estructura principal de Val211 y Ser212, y el anillo B que contiene yodo dentro del bolsillo hidrófobo (figura 4A). De manera similar, también se predice que ST-162 sirve como inhibidor de PI3K, ya que retiene la interacción de enlaces de hidrógeno del oxígeno del grupo morfolina con el grupo NH de la amida de la estructura principal de la valina (Val828) y la interacción de nitrógeno de imidazol con el grupo amina de la cadena lateral de Lys779 (figura 4B).

## 40 Síntesis de análogo de éster de ácido graso de PD0316684

45 Los compuestos 4 y 9 en los esquemas a continuación se conocen en la bibliografía y se sintetizan como se notifica en Nishimura, N. et al. J. Med Chem. 54, 4735 - 4751, 2011.

El compuesto intermedio 25 en los esquemas a continuación se sintetiza usando los procedimientos generales 50 notificados en Venkatesan, AM. et al. J. Med Chem. 53, 2636 - 2645, 2010.

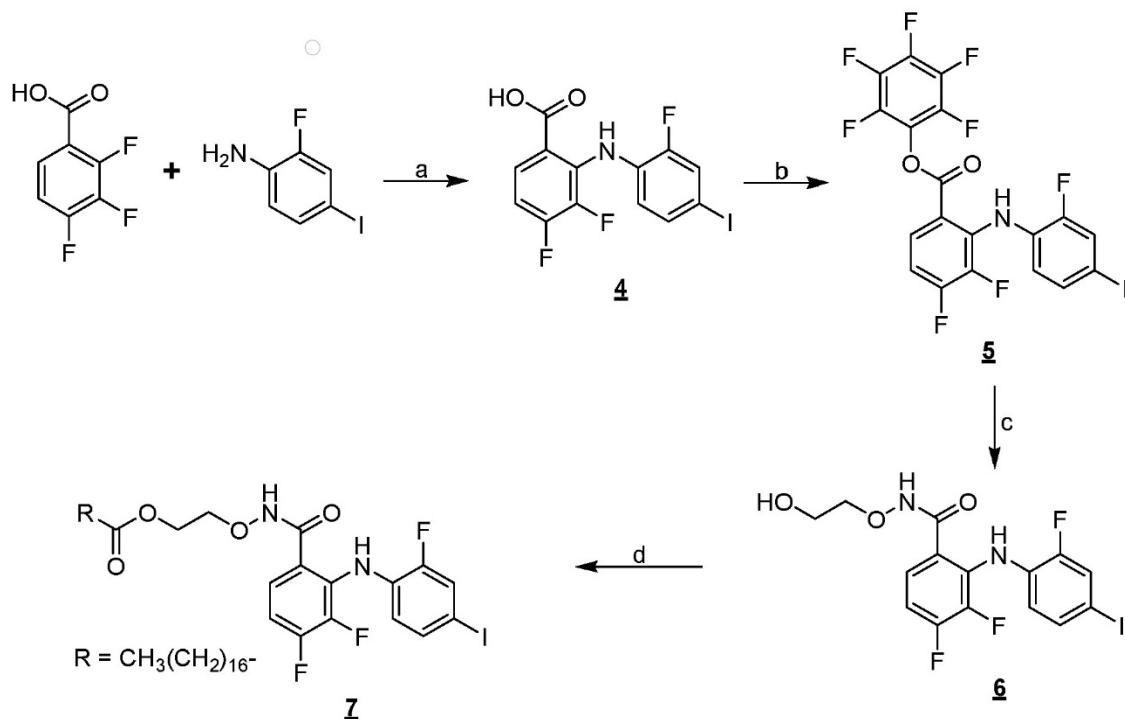
## **Etapa 1**



**Reactivos y condiciones** : (a) vinil éter de etilenglicol, P(Ph)<sub>3</sub>, DEAD, THF, 0 °C; (b) HCl 0,3 N, dioxano, t.a.; (c) CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, DCM.

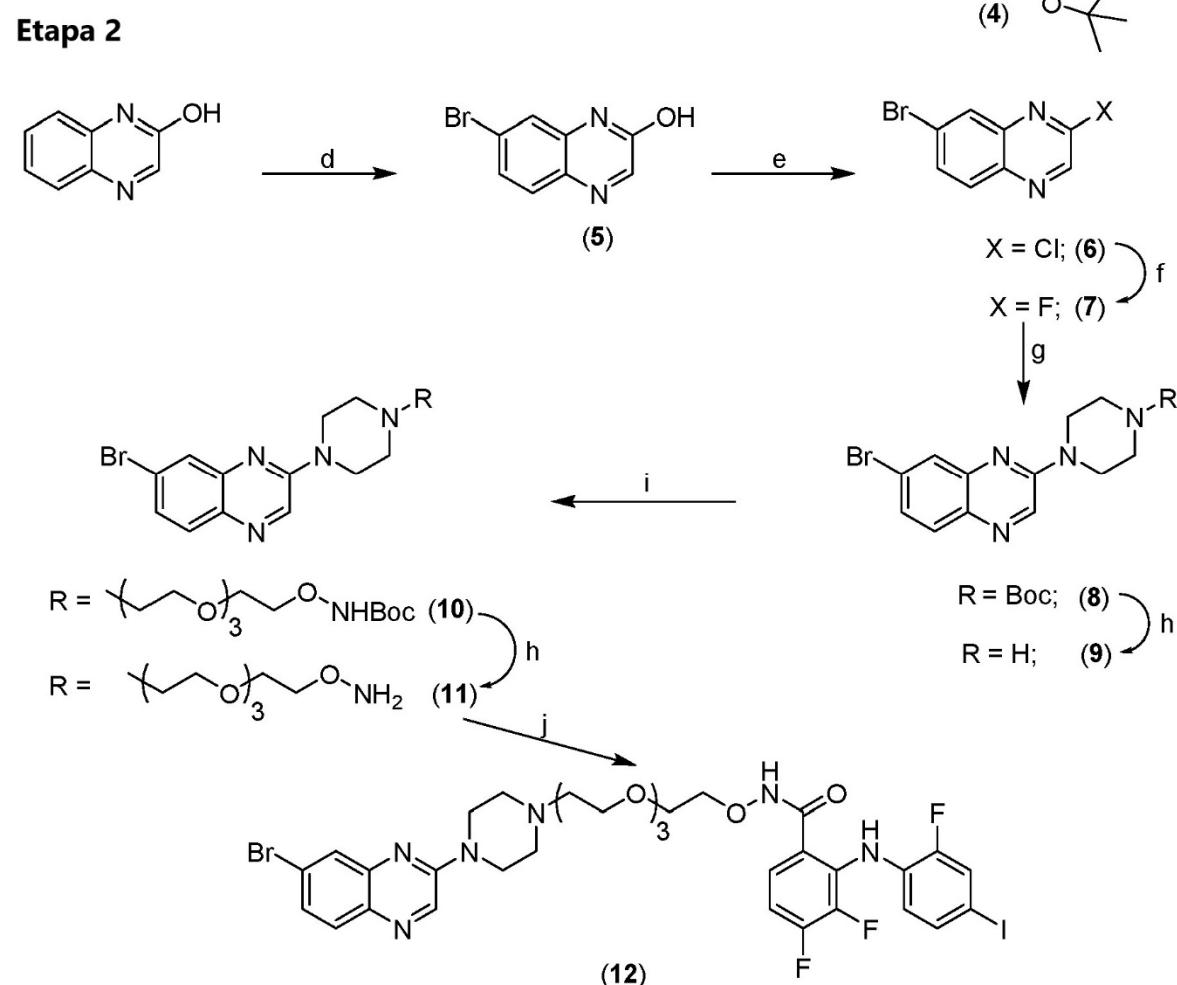
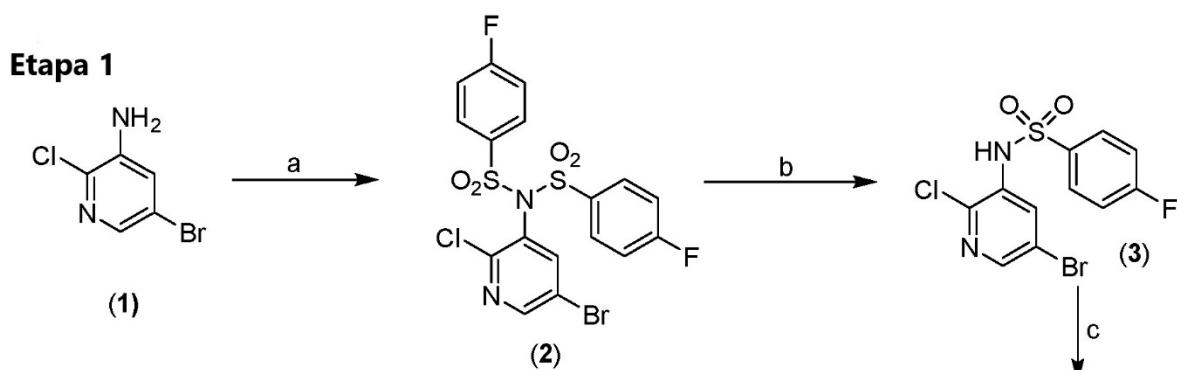
5

## **Etapa 2**



**10 Reactivos y condiciones:** (a) LHMDS, THF, - 65 °C; (b) trifluoroacetato de pentafluorofenilo, piridina, DMF; (c) 3, DIEA, DMF, t.a.; (d) cloruro de ácido, Et<sub>3</sub>N, DMF.

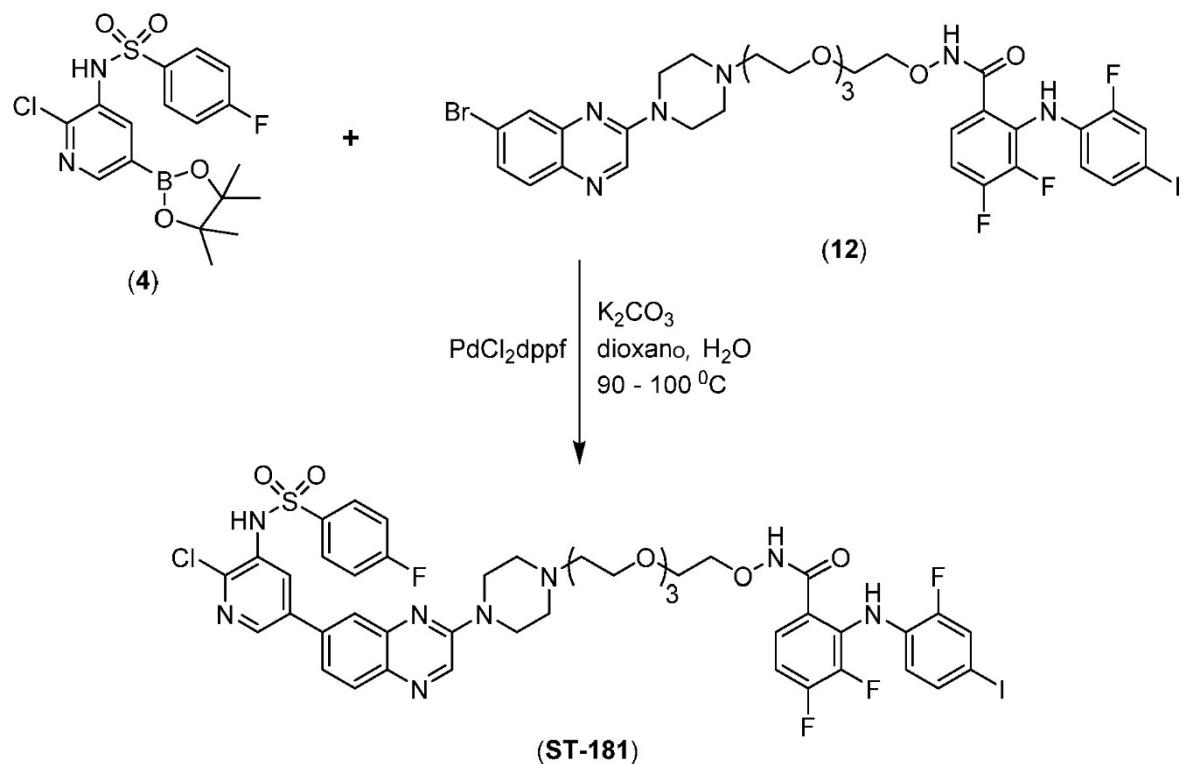
## Síntesis de ST-181 (parte de la invención)



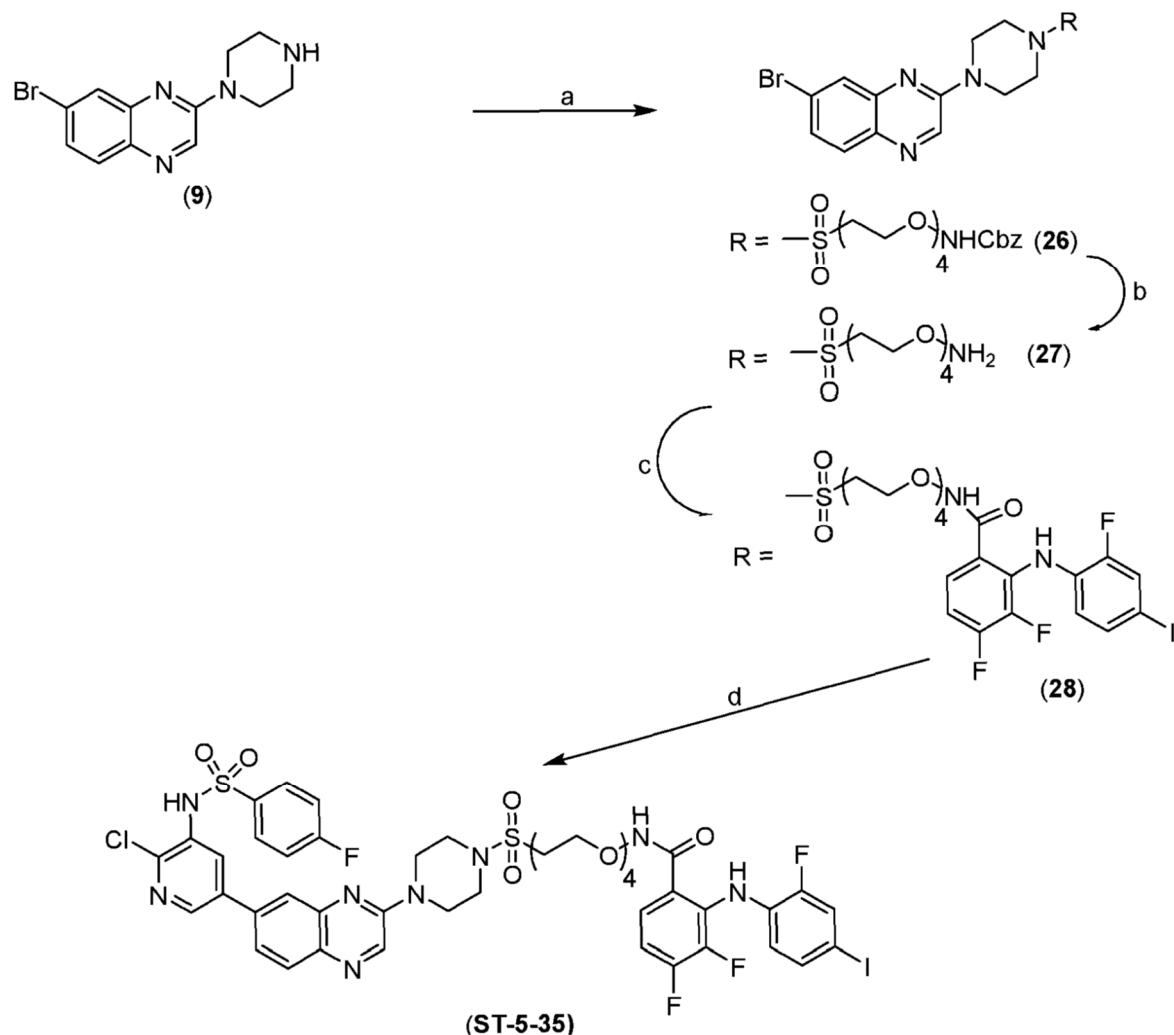
5 **Reactivos y condiciones:** (d) Br<sub>2</sub>, HAc, ta; (e) POCl<sub>3</sub>, tolueno, ta; (f) TBAF, DMSO, ta; (g) NBoc-piperazina; (h) TFA, DCM, 0 - 5 °C; (i) TosO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>NH(Boc), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tolueno, refluxo; (j) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM.

## Síntesis de ST-181 (continuación)

## Etapa 3

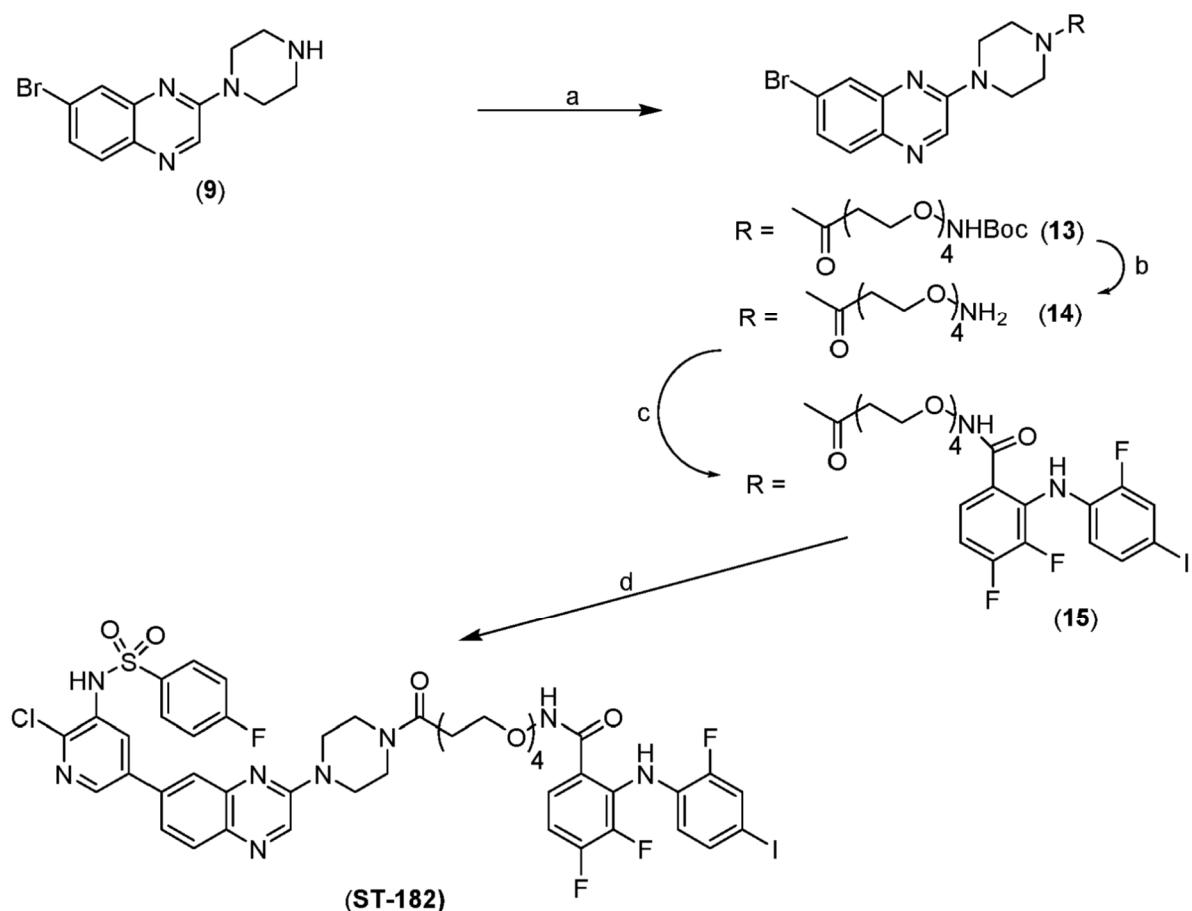


## Síntesis de ST-5-35 (parte de la invención)



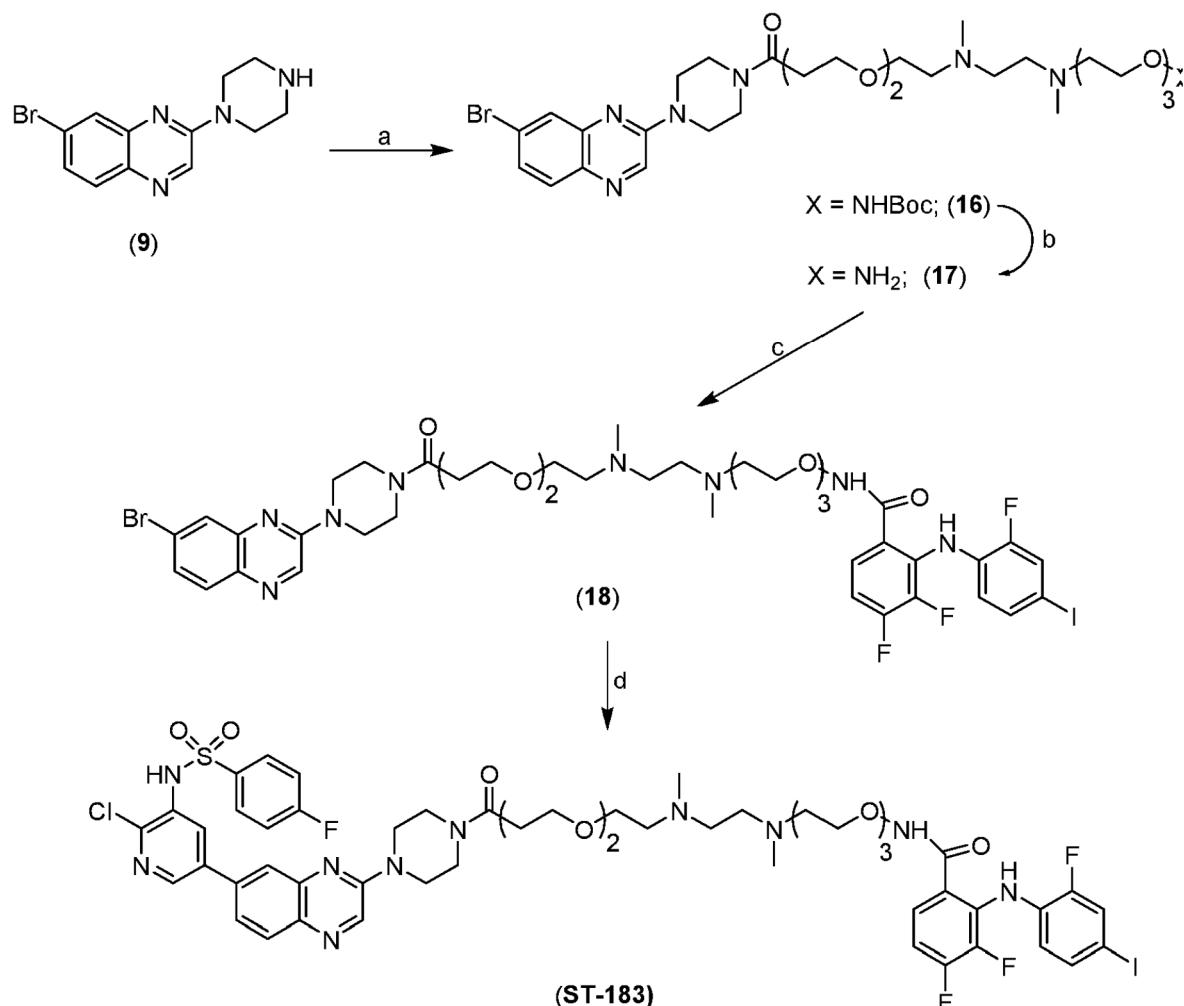
**Reactivos y condiciones:** (a) CbzNH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>Cl, DIEA, DCM; (b) (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Sil, CH<sub>3</sub>CN, 25 °C; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl<sub>2</sub>dppf, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxano, H<sub>2</sub>O, 90 - 100 °C.

## Síntesis de ST-182 (parte de la invención)



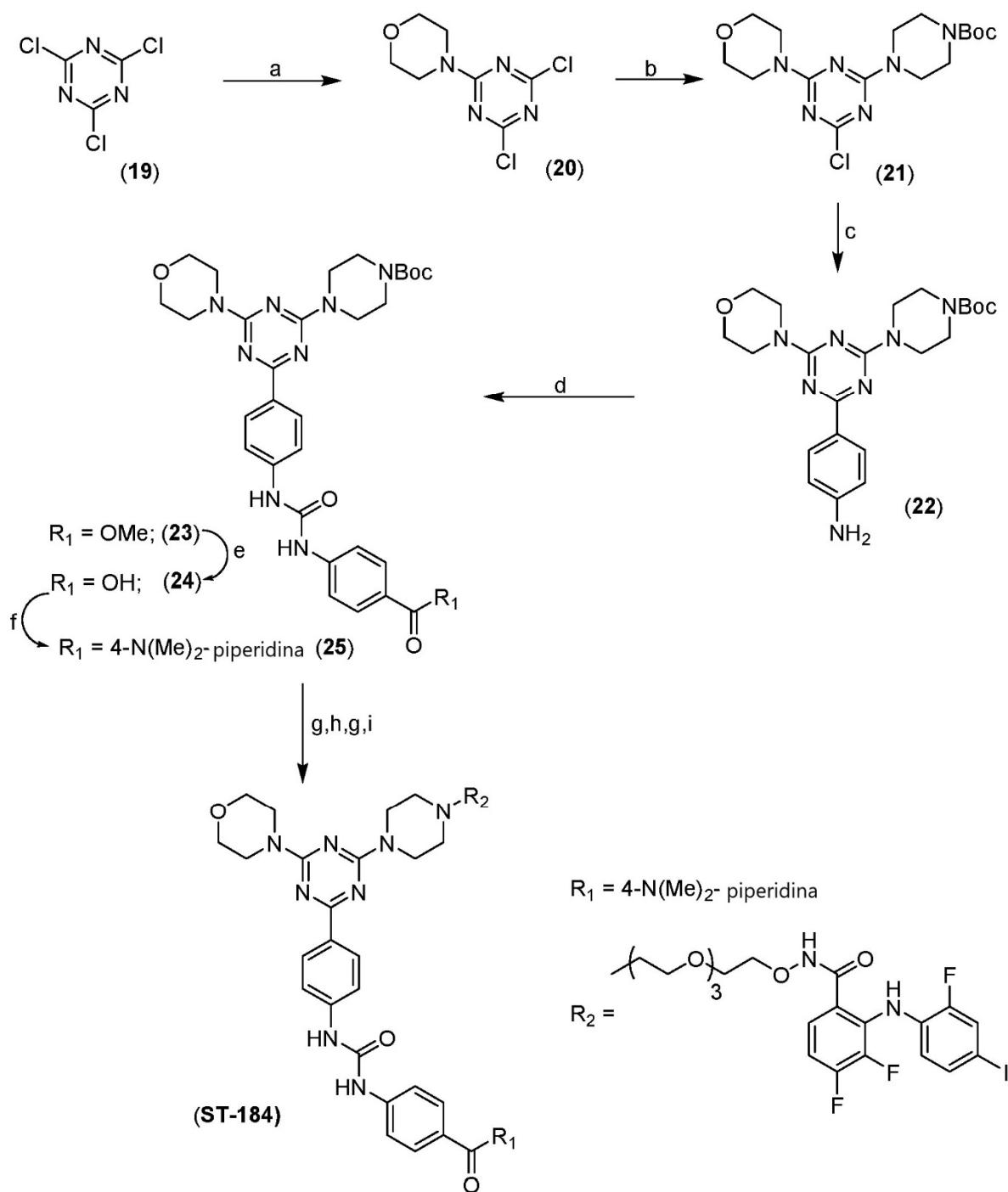
**Reactivos y condiciones:** (a) BocNH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM; (b) TFA, DCM, 0-5 °C; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl<sub>2</sub>dppf, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dioxano, H<sub>2</sub>O, 90 - 100 °C.

## Síntesis de ST-183 (parte de la invención)



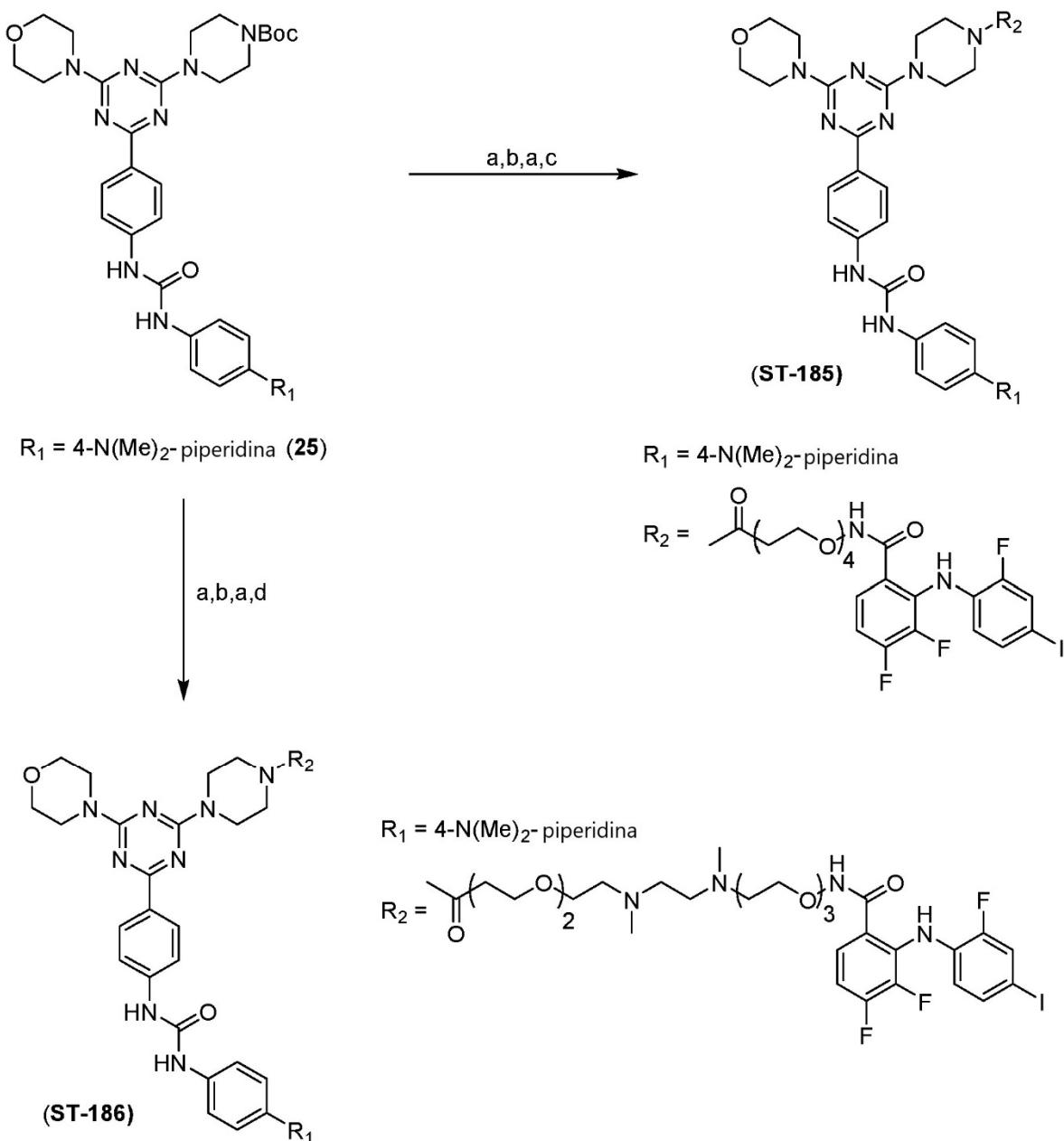
**Reactivos y condiciones:** (a) BocNH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, PyBop, DIEA, THF:DCM; (b) TFA, DCM, 0 - 5 °C; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl<sub>2</sub>dppf, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dioxano:H<sub>2</sub>O, 90 - 100 °C.

## Síntesis de ST-184



**Reactivos y condiciones:** (a) morfolina, DIEA, DCM, - 78 °C; (b) N-Boc-piperazina, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, ta; (c) éster de pinacol del ácido 4-aminofenilborónico, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DME, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 N, refluxo; (d) 4-isocianatobenzoato de metilo, DCM, ta; (e) NaOH 5 N, MeOH:THF, 70 °C; (f) 4-(N,N-dimethylamino)piperidina, HOBr, EDCI, Et<sub>3</sub>N, THF, ta; (g) TFA, DCM, 0 - 5 °C; (h) Tos-PEG<sub>4</sub>NH(t-Boc), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tolueno, refluxo; (i) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM.

## Síntesis de ST-185 y ST-186



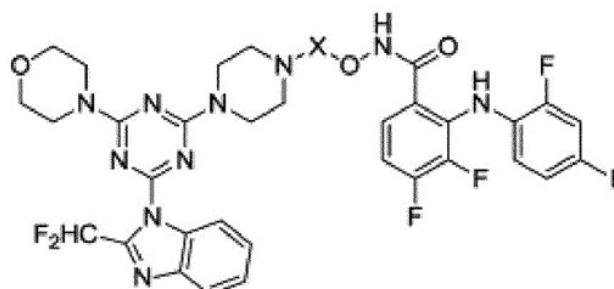
**Reactivos y condiciones:** (a) TFA, DCM, 0 - 5 °C; (b) BocNH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) BocNH(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM.

**Datos biológicos**

La figura 1 muestra las estructuras acopladas del compuesto 14 en el bolsillo alostérico de MEK1 y PI3K $\alpha$ . La figura 1A muestra el modo de unión del compuesto 14 dentro del sitio catalítico alostérico de MEK1 (código de PDB 8WIG). La porción PI3K del compuesto 14 está fuera del disolvente (izquierda). La figura 1B muestra el modo de unión del compuesto 14 al sitio catalítico de PI3K (código de PDB 2WXK). La porción de unión de MEK1 está fuera del disolvente (izquierda). Las interacciones de apilamiento de orbitales  $\pi$  se muestran como líneas discontinuas, los enlaces de hidrógeno también se muestran como líneas discontinuas.

**SAR de la inhibición de MEK1 y PI3K para análogos de inhibidores bifuncionales.** Los datos de inhibición de MEK1 y PI3K *in vitro* para análogos de inhibidores se presentan en la tabla 1. Todos los análogos de la serie demostraron una inhibición significativamente alta de MEK1 en el intervalo nanomolar bajo a subnanomolar (0,015 nM < IC<sub>50</sub> < 56,7 nM). El alto grado de inhibición de MEK observado como se ejemplifica por los análogos 9 y 14 podría

deberse a la retención de los elementos estructurales clave de la cadena lateral de hidroxamato de los potentes inhibidores de MEK1 PD0316684 y 5 en la porción de ligador de las estructuras de inhibidor. La actividad inhibidora de PI3K correspondiente para estas series de inhibidores fue menos pronunciada ( $54 \text{ nM} < \text{IC}_{50} < 341 \text{ nM}$ ) mostrando el compuesto 7 la mayor inhibición de PI3K ( $\text{IC}_{50} = 54 \text{ nM}$ ) de la serie. La inhibición mejorada de PI3K de 7 en comparación con 9 podría deberse a su longitud de cadena de ligador extendida, aunque interacciones electrónicas adicionales atribuidas al enlace amida en el ligador también podrían desempeñar un papel. La potencia de PI3K similar ( $191 \text{ nM} < \text{IC}_{50} < 341 \text{ nM}$ ) presentada por los análogos 9, 11 y 14 también sugiere que la naturaleza de la unión del ligador al nitrógeno de piperazina desempeña un papel menor en la influencia de la inhibición de PI3K. Las lipofilicidades calculadas (cLogP) para los inhibidores bifuncionales estaban en el intervalo de 4,84-5,71 (tabla 1) acercándose al umbral aceptable (cLogP < 5) para la biodisponibilidad oral.

Tabla 1. Datos de inhibición enzimática de MEK1 y PI3K *in vitro*<sup>a</sup>

| Compuesto | Ligador (X)  | cLogP | $\text{IC}_{50} (\text{nM})^{\#}$ |              |
|-----------|--|-------|-----------------------------------|--------------|
|           |  |       | MEK1                              | PI3K         |
| 7         | $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{(CH}_2)_5\text{NHCOCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ | 4,84  | $0,50 \pm 1,2$                    | $54 \pm 25$  |
| 9         | $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{(CH}_2)_5\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$                | 5,58  | $0,019 \pm 3,09$                  | $341 \pm 56$ |
| 11        | $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}-\text{(CH}_2)_4\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$                | 5,48  | $56,7 \pm 1,3$                    | $285 \pm 36$ |
| 14        | $-\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$                                     | 5,71  | $0,015 \pm 1,57$                  | $191 \pm 64$ |
| 5         | n.a.   | 3,75  | $0,00715 \pm 1,40$                | n.d.         |
| PD0316684 | n.a.   | 3,68  | $13,0 \pm 1,6$                    | n.d.         |
| PD0325901 | n.a.   | 2,85  | $15,0 \pm 1,3$                    | n.d.         |

<sup>a</sup>Las notas al pie son las siguientes. #Los datos de unión son el promedio de tres experimentos realizados cada uno por duplicado. †Los datos de cLogP se obtuvieron usando ChemDraw Professional (versión 15.0.0.106).

Estudios de eficacia y viabilidad celular. La actividad inhibidora *in vitro* de MEK1 y PI3K de estas series de compuestos también se evaluó en células tumorales cultivadas (D54, A549). La eficacia celular de la inhibición de MEK1 y PI3K por los compuestos inhibidores se midió mediante cambios en la fosforilación de pErk1/2 y pAkt, respectivamente. La figura 2 muestra la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11 y 14, es decir, la actividad de los

compuestos para la selección como diana *in vitro* de las rutas de MAPK/ERK y PI3K/AKT mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados de proteínas obtenidos de células de tumor de pulmón A549 (figura 2A) y células de glioma D54 (figura 2B) cultivadas. Las células se incubaron en presencia de los compuestos indicados durante 1 hora y los lisados se estudiaron con sonda con anticuerpos específicos contra pAKT y pERK 1/2 y se compararon con control de vehículo (DMSO). Las células A549 (figura 2A) y D54 (figura 2B) se trataron con inhibidores a las concentraciones indicadas durante 1 hora y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como se muestra en la figura 2A, en células A549 cultivadas, todos los compuestos de esta serie mostraron una disminución de la fosforilación de pERK1/2, demostrando la potente eficacia de estos compuestos en la inhibición de la actividad enzimática de la quinasa MEK1. De manera similar, los compuestos 7, 9 y 14 también mostraron alta potencia en la inhibición de la actividad de PI3K, como se indica por el bajo nivel de pAKT en muestras de células tratadas. De manera notable, todos los análogos de inhibidores también demuestran una inhibición significativa de la actividad de MEK en ambas líneas celulares que se correlaciona bien con los datos de inhibición *in vitro* (tabla 1). Tanto la inhibición de MEK como la de PI3K fue más pronunciada en las líneas celulares tratadas con los compuestos 9 y 14 en comparación con los compuestos 7 y 11.

El efecto de la serie de compuestos novedosos sobre la viabilidad celular se determinó usando el ensayo AlamarBlue. Las células tumorales A549 y D54 se trataron con análogos de inhibidores bifuncionales (compuestos 7, 9, 11 y 14), inhibidor de MEK1 (PD0325901), inhibidor de PI3K (ZSTK474) y una combinación de ZSTK474 y PD0325901 a las 48 horas antes del análisis del ensayo. La figura 3 muestra la cuantificación de la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11, 14 y el inhibidor de PI3K ZSTK474 y el inhibidor de MEK PD0325901 a las concentraciones indicadas en (A) células tumorales pulmonares A549 y (B) células de glioma D54. El porcentaje de células tumorales viables se determinó a las 24 horas después de la exposición.

Como se muestra en la figura 3A y la figura 3B, todos los inhibidores produjeron una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad celular en ambas líneas celulares tumorales A549 (figura 3A) y D54 (figura 3B). En particular, los compuestos 9 y 14 fueron similares o en algunos casos superaron los efectos terapéuticos de monoterapias individuales (por ejemplo, PD0325901) por viabilidad celular comprometida en ambas líneas celulares. Curiosamente, se encontró que los compuestos 9 y 14 eran tan eficaces como la combinación de ZSTK474 y PD0325901 en cuanto a la pérdida de viabilidad celular en ambas líneas celulares (figura 3A, figura 3B). De manera significativa, se encontró que los compuestos 9 y 14 tenían una actividad antitumoral significativa que era similar a la de la terapia de combinación que consiste en la coincubación con ZSTK474 y PD0325901 (figura 3A, figura 3B).

**Actividad de inhibición *in vivo* de MEK1 y PI3K en ratones portadores de tumores.** Basándose en la combinación de los datos de inhibición *in vitro* y estudios de eficacia/viabilidad celular, el compuesto 14 se usó para una evaluación *in vivo* adicional. Se usaron cuatro ratones Foxn1nu desnudos atípicos para evaluar la actividad de modulación de la diana oncogénica *in vivo*. Se trataron ratones que portaban tumores D54 ( $n = 2$ ) y A549 ( $n = 2$ ) en el costado con o bien vehículo o bien 375 mg/kg de compuesto 14 por sonda oral a las 2 h antes del sacrificio. La figura 4A y la figura 4B muestran la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones portadores de tumores. Se trataron ratones que portaban tumores subcutáneos D54 y A549 con o bien vehículo o bien 375 mg/kg de compuesto 14 por sonda oral a las 2 horas antes del sacrificio. En la figura 4A, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejido tumoral extirpado mostró que el compuesto 14 moduló con éxito las actividades tanto de MEK1 como de PI3K en un tumor D54 en relación con el control de vehículo. En la figura 4B, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western del tejido tumoral A549 extirpado mostró que el compuesto 14 moduló con éxito las actividades tanto de MEK1 como de PI3K en el tumor A549 en relación con el control del vehículo. Estos datos demuestran la biodisponibilidad *in vivo* y eficacia del compuesto 14 para la supresión de las actividades de quinasa MEK1/PI3K *in vivo* en tumores sólidos, confirmando que podría lograrse la inhibición *in vivo* simultánea de las rutas de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química individual (compuesto 14). El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejido tumoral extirpado reveló que el compuesto 14 inhibía la fosforilación de ERK1/2 y Akt en ambos tipos de tumores (figura 4A y figura 4B). Además, en otro experimento preliminar usando el compuesto 9, también se logró la modulación de los niveles de ERK1/2 y pAkt en tumores de ratón para ambos tumores A549 y D54 (datos no mostrados). Globalmente, tomados juntos, estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad de MEK1/PI3K puede lograrse tanto *in vitro* como *in vivo* mediante los compuestos inhibidores bifuncionales 9 y 14.

La regulación por incremento de las cascadas de señalización de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento se ha demostrado en muchos cánceres humanos. Estudios también han demostrado que la inhibición de MEK promueve una activación compensatoria de la actividad de PI3K/Akt quinasa. En consecuencia, la selección como diana conjunta de estas dos rutas de señalización se ha reconocido como una estrategia quimioterápica prometedora en el tratamiento eficaz del cáncer. Para abordar este objetivo, se desarrolló una serie de inhibidores de MEK/PI3K bifuncionales prototipo mediante la unión covalente de análogos estructurales del inhibidor competitivo de ATP ZSTK474 con la clase no competitiva con ATP de inhibidores de MEK como se representa por PD0325901 usando una variedad de grupos espaciadores. Todos los inhibidores demostraron inhibición de nanomolar a submicromolar de MEK1, así como actividad de PI3K quinasa en ensayos de inhibición enzimática *in vitro* y una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad celular en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y glioma D54. Adicionalmente, todos los inhibidores demostraron una inhibición

significativa de la actividad de MEK1 en estas dos líneas celulares en correlación con la demostración de actividad anticancerígena *in vitro*. Estudios preliminares *in vivo* realizados en ratones portadores de tumores D54 y A549 con el compuesto 14 después de la administración oral revelaron una inhibición significativa de la actividad de MEK1 y PI3K a las 2 horas después de la administración, confirmando la eficacia *in vivo* hacia la modulación de la diana. Hasta donde se sabe, este trabajo representa la primera demostración de la inhibición *in vivo* simultánea de las rutas de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química individual.

La figura 5 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones que portan glioma D54 intracerebral. Se trataron ratones que portan tumores D54 i.c. con o bien vehículo o bien 400 mg/kg de ST-162 o ST-168 por sonda oral a las 2 horas antes del sacrificio. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejido tumoral extirpado mostró que ambos compuestos modulaban con éxito las actividades tanto de MEK1 como de PI3K en el tumor D54 intracerebral en relación con el control de vehículo. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* de ST-162 y ST-168 para la supresión de las actividades de quinasas MEK1/PI3K *in vivo* en tumores sólidos, confirmando que podría lograrse la inhibición *in vivo* simultánea de las rutas de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química individual (compuestos ST-162 y ST-168).

La figura 6 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en líneas tumorales de melanoma de crecimiento subcutáneo A357 y A2058 en ratones. Se trataron ratones que llevan tumores de melanoma s.q. con o bien vehículo o bien 400 mg/kg de ST-162 o ST-168 por sonda oral a las 2 horas antes del sacrificio. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejido tumoral extirpado mostró que ambos compuestos modulaban con éxito las actividades tanto de MEK1 como de PI3K en estos tumores de melanoma humano en relación con el control de vehículo. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* de ST-162 y ST-168 para la supresión de las actividades de quinasa MEK1/PI3K *in vivo* en tumores sólidos, confirmando que podría lograrse la inhibición *in vivo* simultánea de las rutas de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química individual (compuestos ST-162 y ST-168).

La figura 7 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en la línea tumoral de cáncer de colon de crecimiento subcutáneo CT26 en ratones. Se trataron ratones que portaban tumores de colon subcutáneos con o bien vehículo o bien 400 mg/kg de ST-162 o ST-168 por sonda oral a las 2 horas antes del sacrificio. El inhibidor de MEK conocido 901 y los inhibidores de PI3K también se evaluaron en este estudio. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejido tumoral extirpado mostró que ST-162 y ST-168 modulaban con éxito las actividades de MEK1 y PI3K en este modelo de tumor de colon humano en relación con el control de vehículo. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* de ST-162 y ST-168 para la supresión de las actividades de quinasa MEK1/PI3K *in vivo* en tumores de colon sólidos, confirmando que podría lograrse la inhibición *in vivo* simultánea de las rutas de Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química individual (ST-162 y ST-168).

En estudios preliminares, se sometieron a prueba varios modelos de ratón para determinar la eficacia terapéutica usando la administración oral de ST-162. Se usaron ratones Foxn1nu desnudos atípicos para evaluar la actividad de modulación de la diana oncogénica *in vivo*. Se trataron ratones que portan tumores D54 intracerebrales, tumores de colon subcutáneos (CT26) y melanoma subcutáneo (A375 y A2058) con o bien control de vehículo o bien 400 mg/kg de compuesto ST-162 por sonda oral durante 14-30+ días. Todos los estudios revelaron que podían lograrse retrasos significativos en el crecimiento tumoral (CT26, A375 y A2058) o supervivencia animal mejorada (D54).

La figura 8 es un estudio que usa el compuesto ST-162 administrado que comienza cuando los tumores intracerebrales alcanzaron un volumen de aproximadamente 20 microlitros (medido por MRI), se encontró una mejora significativa ( $P=0,0054$ ) en la supervivencia general en comparación con los animales de control de vehículo. Estos datos demuestran claramente que puede lograrse la supresión simultánea de la actividad de MEK1/PI3K *in vivo* mediante el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de glioma D54 humanos intracerebrales.

En la figura 9, el compuesto ST-162 se administró durante 14 días comenzando cuando los tumores de melanoma subcutáneo A2058 y A357 fueron medibles por calibre y MRI y los volúmenes tumorales se midieron a lo largo del tiempo y se compararon con los controles de vehículo. Se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral para ambos modelos de tumor de melanoma en animales tratados con ST-162 en comparación con los animales de control de vehículo. Estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad de MEK1/PI3K puede tener un impacto sobre las tasas de crecimiento *in vivo* debido al tratamiento con el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de melanoma humano.

En la figura 10, el compuesto ST-162 se administró durante 14 días comenzando cuando los tumores de colon subcutáneos CT-26 fueron medibles por calibre y MRI y los volúmenes tumorales se midieron a lo largo del tiempo y se compararon con los controles de vehículo. Se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral para tumores CT-26 en animales tratados con MV4-162 (compuesto 14) en comparación con animales de control de vehículo. Estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad de MEK1/PI3K puede tener un impacto sobre las tasas de crecimiento *in vivo* debido al tratamiento con el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de colon humanos.

En la figura 11, se administró ST-162 durante 14 días comenzando cuando los tumores de colon subcutáneos CT-26

fueron medibles por calibre y MRI y se midieron los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo y se compararon con los controles de vehículo. El día 14, se extirparon dos tumores y se compararon su tamaño y peso. Como se muestra, los tumores de control de vehículo fueron significativamente más grandes que los recogidos de ratones tratados con ST-162 durante 14 días. Estos datos demuestran que la supresión simultánea de la actividad de MEK1/PI3K puede tener un impacto sobre los volúmenes tumorales *in vivo* debido al tratamiento con el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de colon humanos, ya que los tumores tratados tenían un volumen menor que los tumores tratados con control de vehículo.

**Ensayos de inhibición *in vitro* de MEK1.** La actividad de inhibición de MEK1 *in vitro* de análogos de inhibidor se determinó usando kits de ensayo de quinasa luminiscente Kinase-Glo de Promega (WI, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se adquirieron MEK1 purificada y Erk2 inactiva de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) y Carna Biosciences (Kobe, Japón), respectivamente. En resumen, se añadieron series de diluciones de compuestos en placas de 96 pocillos, seguido de disoluciones de MEK1, Erk2 y ATP. Las reacciones de quinasas se realizaron a 30 °C durante 30 minutos. Luego se añadieron volúmenes iguales de disolución de Kinase-Glo, y se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 30 minutos más. Las señales de bioluminiscencia se adquirieron con un lector multietiqueta Envision de PerkinElmer. Los ensayos se realizaron por triplicado con diversas concentraciones de inhibidor, cada una ejecutada por duplicado. Los datos de  $\text{IC}_{50}$  se calcularon usando el software GraphPad Prism (versión 5.0, La Jolla, CA).

**Ensayos de inhibición de PI3K *in vitro*.** La cuantificación de la actividad lípido quinasa de PI3K se llevó a cabo por Life Technologies (Madison, WI) con enzima purificada usando el protocolo de ensayo de TR-FRET de Adapta basado en fluorescencia. Los ensayos se realizaron por triplicado con diversas concentraciones de inhibidor (de 0,1 nM a 10  $\mu\text{M}$ ).

**Modelos de acoplamiento virtual de análogos de inhibidores bifuncionales.** Se obtuvieron modelos de acoplamiento de análogos de inhibidores bifuncionales usando software de Schrödinger Inc. Se prepararon estructuras cristalinas de rayos X de MEK1 (código de PDB 3WIG) y PI3K (código de PDB 2WXk) usando el instrumento Protein Preparation Wizard en Maestro (Protein Preparation Wizard, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY). La estructura proteica se usó luego para generar las rejillas receptoras para el acoplamiento usando OPLS2005 con el sitio de unión definido por el ligando nativo. Los ligandos de inhibidores bifuncionales se construyeron y prepararon para el acoplamiento en Maestro usando LigPrep 3.4 (LigPrep, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY). Los procedimientos de acoplamiento se realizaron usando Glide 6.7 en modo de precisión convencional con parámetros por defecto y sin restricciones (23).

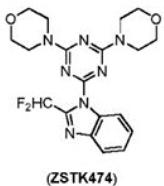
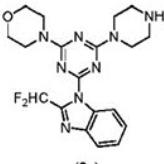
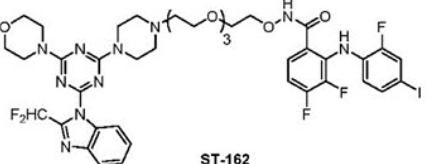
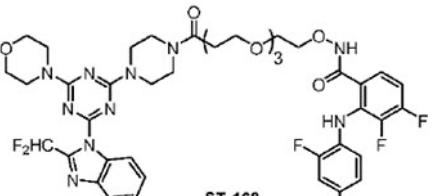
**Ensayos de cultivo celular y muerte celular.** Se hicieron crecer una línea celular epitelial de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y una línea celular de glioma D54 en RPMI complementado con suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) al 10% y penicilina/estreptomicina/glutamina al 1% (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se hicieron crecer en una incubadora humidificada a 37 °C con un suministro del 5% de CO<sub>2</sub>. La prueba inicial de los efectos terapéuticos de los compuestos inhibidores se realizó usando ensayos de viabilidad celular. Se prepararon disoluciones madre de compuestos inhibidores (10 mM), ZSTK474 (inhibidor de PI3K representativo), PD0325901 (inhibidor de MEK representativo) en DMSO y se usaron para preparar disoluciones finales por dilución en serie en medio RPMI. Los pocillos de control se dosificaron con medios que contenían el 1% de disolvente portador DMSO. La viabilidad celular se determinó 48 horas después usando un ensayo de AlamarBlue (Life Technologies, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Las señales de fluorescencia se determinaron con un lector multietiqueta EnVision Xcite de PerkinElmer (PerkinElmer, Waltham, MA).

**Análisis de inmunotransferencia de tipo Western.** Se sembraron células en placas de seis pocillos 24 horas antes del tratamiento y se incubaron con las disoluciones de compuesto inhibidor respectivas durante 1 h. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron con tampón de lisis NP-40 (NP<sub>40</sub> al 1 %, NaCl 150 mM y Tris 25 mM, pH 8,0) complementado con inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa Complete, Roche, Basilea, Suiza) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Roche, Basilea, Suiza). La concentración de proteína se determinó usando ensayos de Lowry (Bio-Rad, Hercules, CA), y se cargaron cantidades iguales de lisado proteico de células completas en cada cajón y se resolvieron usando gel Bis-Tris con un gradiente del 4-12 % (Invitrogen, CA). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  (Invitrogen, CA). Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios después del bloqueo, seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) apropiado a temperatura ambiente durante 1 hora. Se usó ECL-Plus para detectar la actividad de la peroxidasa según el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se adquirieron anticuerpos generados contra MAPK fosfo-p44/42 (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), pAKT(S473), fosfo-p70 S6K\* y anticuerpos frente a ERK, AKT total de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU.), y se adquirió anticuerpo anti-actina  $\beta$  (conjugado con HRP) de Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.). Se adquirieron anticuerpos secundarios frente a HRP de Jackson ImmunoResearch (St. Louis, MO, EE.UU.).

**Evaluación *in vivo* de la eficacia de los inhibidores.** Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Universitario para el Uso y Cuidado de Animales (UCUCA) de la Universidad de Michigan. A ratones Foxn1nu desnudos atípicos de cinco semanas de edad se les inocularon  $1 \times 10^6$  células D54 completamente suspendidas en los costados de dos ratones, y de manera similar, a dos ratones adicionales se les inocularon células A549 en el

costado. Cada inyectado contenía un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de suspensión celular en el 50 % de medio RPMI mezclado con el 50 % de matriz de membrana basal BD Matrigel (Becton, Dickinson and Company, East Rutherford, NJ). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 150  $\text{mm}^3$  por medición con calibre, los ratones se privaron de alimentos durante 2-4 horas seguido de la administración con cualquier vehículo (200  $\mu\text{l}$  de DMSO:HPBCD (3:2)) o análogo de inhibidor ST-162 (375 mg/kg en 200  $\mu\text{l}$  de DMSO/HPBCD (3:2)) por vía oral a las 2 horas antes del sacrificio. Se recogieron tejidos tumorales de ambos grupos tratados con vehículo y fármaco y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western como se describió anteriormente.

Actividad de inhibición del subtipo de PI3K (nM)<sup>+</sup>

| Inhibidor   | PI3K $\alpha$ | PI3K $\beta$ | PI3K $\gamma$ | PI3K $\delta$ |
|---|---------------|--------------|---------------|---------------|
|    | 5,0 ± 0,8     | 15,2 ± 1,4   | 20,8 ± 0,6    | 3,9 ± 0,6     |
|   | 180 ± 25      | 1093 ± 168   | 1873 ± 283    | 142 ± 7,5     |
|  | 467 ± 9,0     | 4073 ± 290   | 5803 ± 511    | 942 ± 120     |
|  | 69,2 ± 2,2    | 1482 ± 377   | 2293 ± 241    | 41,7 ± 2,1    |

<sup>+</sup>Datos notificados como media ± error estándar de la media (EEM)

Se da a conocer también la síntesis de otra serie de inhibidores multifuncionales de entidad individual logrados por unión covalente de análogos estructurales de un inhibidor de PI3K, inhibidor de mTOR y un inhibidor de MEK. Los inhibidores multifuncionales mostraron una potente inhibición *in vitro* de MEK1 (182 < IC<sub>50</sub> (nM) < 398), PI3K (39 < IC<sub>50</sub> (nM) < 191 y mTOR (50,4 < IC<sub>50</sub> (nM) < 53,1) en ensayos de inhibición enzimática. Se demostró inhibición concurrente por los compuestos ST-162, ST-168 y ST-180 en líneas celulares tumorales (A375 (melanoma), D54 (glioma), CT26 (cáncer colorrectal), A2058 (melanoma)). Los inhibidores produjeron una disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis similar a la administración combinada de ZSTK474 (inhibición de PI3K) y PD0325901 (inhibidor de MEK). Los datos obtenidos de tejido tumoral A375 recogido de un ratón que alberga un tumor sólido en el costado mostraron, mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, que a las 2 horas después de la administración de ST-168 por vía oral, se logró una inhibición combinada de mTOR/MEK1/PI3K, confirmando la biodisponibilidad y eficacia de la estrategia de inhibidor multifuncional ST-168. Se demostró eficacia *in vivo* del

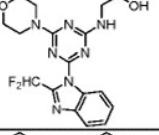
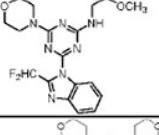
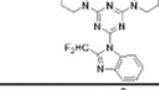
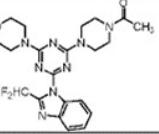
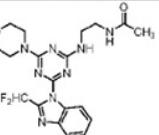
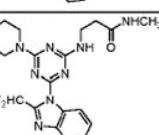
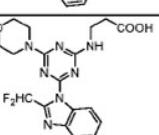
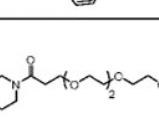
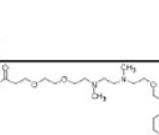
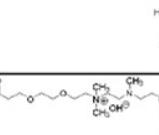
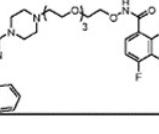
compuesto ST-168 después de 40 dosis orales diarias de ST-168 (400 mg/kg) en ratones portadores de tumor de melanoma A375. En este estudio, ST-168 mostró una reducción significativa >6 veces en el tamaño tumoral con respecto a los animales dosificados con control de vehículo a los 35 días después del inicio del tratamiento. También se observó un aumento significativo de la esperanza de vida en estos ratones portadores de tumor A375 tratados con ST-168 sin efectos secundarios detectables (como pérdida de peso corporal) debido a la dosificación del fármaco a largo plazo.

5

Datos de inhibición enzimática del subtipo de PI3K (en las siguientes tablas solo ST-182 es parte de la invención).

10

| <b>Compuesto</b> | <b>Estructura</b> | <b><math>\text{IC}_{50}</math> (nM)</b> |                               |                                |                                |
|------------------|-------------------|---|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                  |                   | <b>PI3K<math>\alpha</math></b>          | <b>PI3K<math>\beta</math></b> | <b>PI3K<math>\gamma</math></b> | <b>PI3K<math>\delta</math></b> |
| <b>ST-177</b>    |                   | 292 ± 31                                | 2117 ± 444                    | 771 ± 63                       | 291 ± 32                       |
| <b>ST-5-02</b>   |                   | 248 ± 24                                | 2900 ± 375                    | 681 ± 90                       | 135 ± 19                       |

|                |   |                |                |                |                |
|----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>ST-187</b>  |    | $9,9 \pm 1,2$  | $71 \pm 8$     | $54 \pm 1$     | $8,1 \pm 1,7$  |
| <b>ST-178</b>  |    | $20 \pm 3$     | $208 \pm 15$   | $64 \pm 5$     | $17 \pm 1$     |
| <b>ZSTK474</b> |    | $5,0 \pm 0,8$  | $15,2 \pm 1,4$ | $20,8 \pm 0,6$ | $3,9 \pm 0,6$  |
| <b>ST-5-03</b> |    | $8,2 \pm 0,7$  | $14,3 \pm 2,5$ | $21 \pm 1$     | $2,9 \pm 0,6$  |
| <b>ST-5-22</b> |    | $16,6 \pm 1,4$ | $199 \pm 12$   | $54 \pm 1,5$   | $9,5 \pm 2,4$  |
| <b>ST-5-21</b> |   | $20 \pm 0,4$   | $431 \pm 83$   | $67 \pm 2,8$   | $26 \pm 4,9$   |
| <b>ST-5-25</b> |  | $12,4 \pm 0,7$ | $787 \pm 106$  | $22,3 \pm 0,7$ | $60 \pm 3,4$   |
| <b>ST-167</b>  |  | $11,5 \pm 0,1$ | $214 \pm 49$   | $140 \pm 6,6$  | $1,3 \pm 0,2$  |
| <b>ST-180</b>  |  | $39 \pm 9$     | $2215 \pm 425$ | $717 \pm 136$  | $52 \pm 1,4$   |
| <b>ST-5-05</b> |  | $39 \pm 2$     | $2517 \pm 557$ | $2590 \pm 660$ | $56 \pm 13$    |
| <b>ST-162</b>  |  | $191 \pm 64$   | $4073 \pm 290$ | $5803 \pm 511$ | $942 \pm 120$  |
| <b>ST-168</b>  |  | $69,2 \pm 2,2$ | $1482 \pm 377$ | $2293 \pm 241$ | $41,7 \pm 2,1$ |

Datos de inhibición del subtipo de mTor y PI3K para ST-182 y productos intermedios

| Compuesto | Estructura | mTOR                    | PI3K $\alpha$     | PI3K $\beta$        | PI3K $\gamma$        | PI3K $\delta$     | <u>C<sub>150</sub> (nM)</u> |
|-----------|------------|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------|
| GSK 458   |            | 4,2 ± 0,1<br>(0,18/0,3) | < 0,495<br>(0,02) | 1,2 ± 0,2<br>(0,13) | 0,83 ± 0,1<br>(0,06) | < 0,495<br>(0,02) |                             |
| ST-182    |            | 53,1 ± 2,5              | 2,0 ± 0,3         | 467 ± 44            | 34,1 ± 3,0           | 4,22 ± 0,64       |                             |
| ST-5-27   |            | 5,97 ± 0,27             | < 0,495           | 4,77 ± 0,92         | 5,14 ± 0,23          | 0,83 ± 0,06       |                             |
| ST-5-28   |            | 3,13 ± 0,14             | < 0,495           | 5,36 ± 1,10         | 0,71 ± 0,20          | < 0,495           |                             |
| ST-5-29   |            | 6,77 ± 0,43             | < 0,495           | 30,2 ± 0,59         | 1,33 ± 0,14          | < 0,495           |                             |

**Evaluación *in vivo* de la eficacia de los inhibidores.** A ratones Foxn1nu desnudos atípicos de cinco semanas de edad se les inocularon  $1 \times 10^6$  células D54 completamente suspendidas en los costados de dos ratones, y de manera similar, a dos ratones adicionales se les inocularon células A549 en el costado. Cada inyectado contenía un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de suspensión celular en el 50 % de medio RPMI mezclado con el 50 % de matriz de membrana basal BD Matrigel (Becton, Dickinson and Company, East Rutherford, NJ). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 150  $\text{mm}^3$  por medición con calibre, los ratones se privaron de alimentos durante 2-4 horas seguido de la administración con cualquier vehículo (200  $\mu\text{l}$  de DMSO:HPBCD (3:2)) o análogo de inhibidor (14) (375 mg/kg en 200  $\mu\text{l}$  de DMSO:HPBCD (3:2)) por vía oral a las 2 horas antes del sacrificio. Se recogieron tejidos tumorales de ambos grupos tratados con vehículo y fármaco y se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western como se describió anteriormente.

### Bibliografía

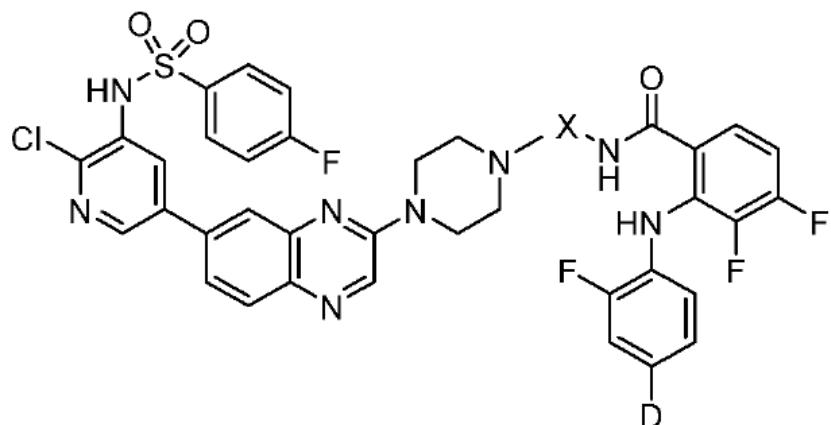
1. AT Baines *et al.*, Future Med Chem. 2011; 3(14):1787-808.
2. A Jemal *et al.*, CA Cancer J Clin. 2010; 60(5):277-300.
3. JS Sebolt-Leopold *et al.*, Nat Rev Cancer. 2004; 4(12):937-47.
4. E Castellano *et al.*, Genes Cancer. 2011; 2(3):261-74.
5. JS Sebolt-Leopold Clin Cancer Res. 2008; 14(12):3651-6.
6. C Montagut *et al.*, Cancer Lett. 2009; 283(2):125-34.
7. JA McCubrey *et al.*, Expert Opin Emerg Drugs. 2009; 14(4):633-48.
8. FA Karreth *et al.* Mol Cell. 2009; 36(3):477-86.
9. PI Poulikakos *et al.* Nature. 2010; 464(7287):427-30.
10. G Hatzivassiliou *et al.*, Nature. 2010; 464(7287):431-5.
11. S Wee *et al.*, Cancer Res. 2009; 69(10):4286-93.
12. PM Lorusso *et al.*, J Clin Oncol. 2005; 23(23):5281-93.
13. JR Infante *et al.*, Lancet Oncol. 2012; 13(8):773-81.
14. JA Engelman *et al.*, Nat Med. 2008; 14(12):1351-6.
15. K Yu *et al.*, Cancer Biol Ther. 2008; 7(2):307-15.
16. OK Mirzoeva *et al.*, Cancer Res. 2009; 69(2):565-72.
17. A Carracedo *et al.*, J Clin Invest. 2008; 118(9):3065-74.
18. ML Sos *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(43):18351-6.
19. T Shimizu *et al.*, Clin Cancer Res. 2012; 18(8):2316-25.
20. CL Sawyers, J Clin Oncol. 2002; 20(17):3568-9.
21. KB Kim *et al.*, 2013. J Clin Oncol. 2012; 31(4):482-9.
22. GS Falchook, *et al.*, Lancet Oncol. 2012; 13(8):782-9.
23. S Bagrodia *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 2012; 25(6):819-31.
24. ME Van Dort *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 2015; 23:1386-1394.
25. Documento WO 2002/006213A2.
26. Documento EP0629617A1.

27. S Singh *et al.*, FASEB J. 2014;28(1):85-93.
28. L Rand *et al.*, J. Immunol. 2009; 182:5865-5872.
29. JA Engelman *et al.*, Nat. Rev. Genet. 2006; 7:606-619.
30. P Liu *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 2009; 8:627-644.
31. Y Liu *et al.*, Cell Mol Immunol. 2015;58.
32. JE Cho *et al.*, Mol. Cells 2010; 29, 35-39.
33. RA Fratti *et al.*, J. Cell Biol. 2001; 154, 631-644.
34. C Kuijl *et al.*, Nature 2007; 450,725-730.
35. G Huang *et al.*, J. Biol. Chem. 2012; 287,23196-2202.
36. H Matsuoka *et al.*, Exp Cell Res. 2009; 315(12):2022-32.
37. SS Liau *et al.*, Cancer Res., 2006; 66:1613-11622.
38. GW Cole Jr *et al.*, Anticancer Res., 2006; 26:809-821.
39. MR Girotti *et al.*, Cancer Discov 2013; 3:158-67.
40. Y Shao *et al.*, Cell Death Differ 2012; 19:2029-39.
41. EB Pasquale *et al.*, Nat Rev Cancer 2010; 10:165-80.
42. KS Smalley, Mol Cell Oncol. 2015; 2(4):e1008291.

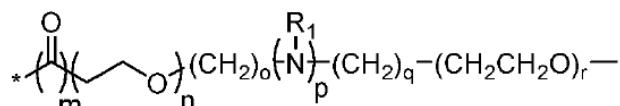
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura

5 (a)



en donde D es I, -C≡CH o -C≡C-R, R = alquilo o arilo, y X se selecciona del grupo que consiste en:



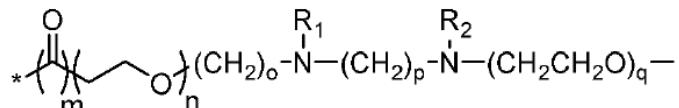
10

R<sub>1</sub>, independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0 - 6; o = 0 - 6; p = 0, 1; q = 0 - 6; r = 2 - 6,



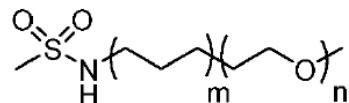
15

en donde, independientemente, m = 0 - 6; n = 2 - 6,



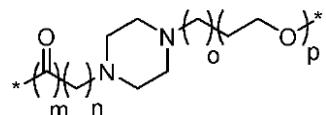
20

en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0 - 6; o = 0 - 6; p = 1 - 6; q = 2 - 6 y R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo,

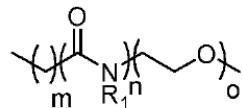


25

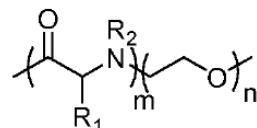
en donde, independientemente, m = 0 - 6; n = 2 - 6,



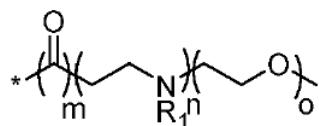
en donde, independientemente,  $m = 0, 1$ ;  $n = 0 - 6$ ;  $o = 0 - 6$ ;  $p = 2 - 6$ ,



5 R<sub>1</sub>, independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 0 - 6; n = 1 - 6; o = 2 - 6,

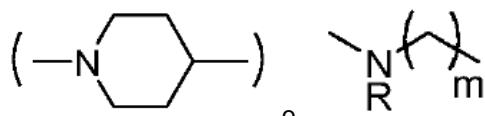
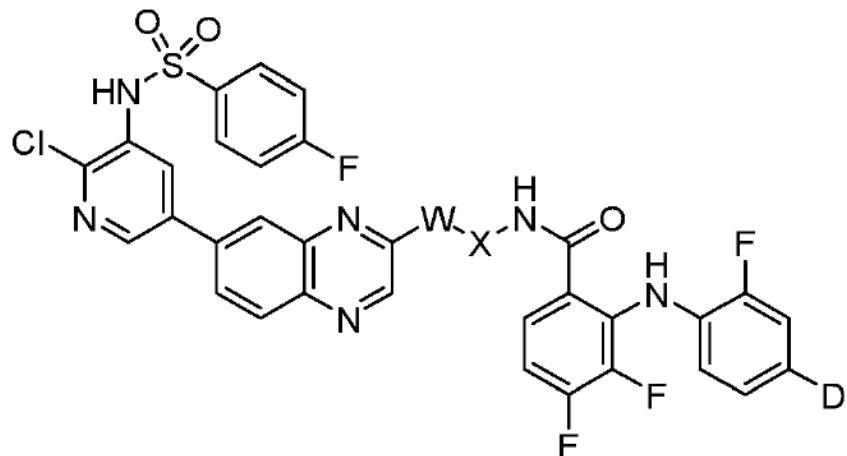


R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, independientemente, son H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 1 - 6; n = 2 - 6, y



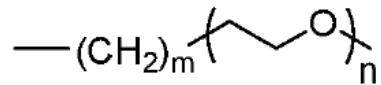
R<sub>1</sub>, independientemente, es H, alquilo o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 1 - 6; o = 2 - 6,

15 (b)

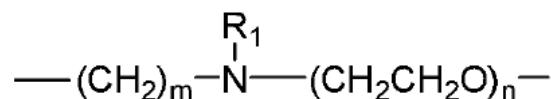


y R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1 - 6;

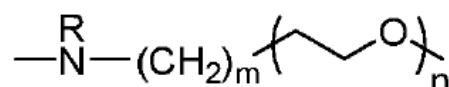
D = I, -C≡CH o -C≡C-R, en donde R = alquilo o arilo, en donde X se selecciona del grupo que consiste en:



en donde  $m = 0, 1 - 6$ ;  $n = 1 - 6$ ; o cualquier combinación de  $m$  y  $n$

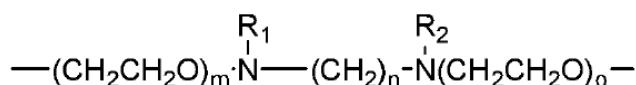


$\text{R}_1 = \text{H, alquilo o arilo en donde } m, n \text{ son independientemente } 1 - 6$



5

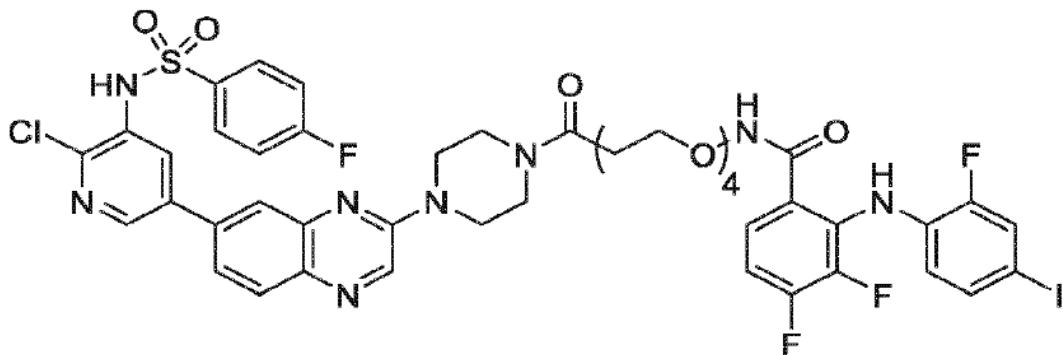
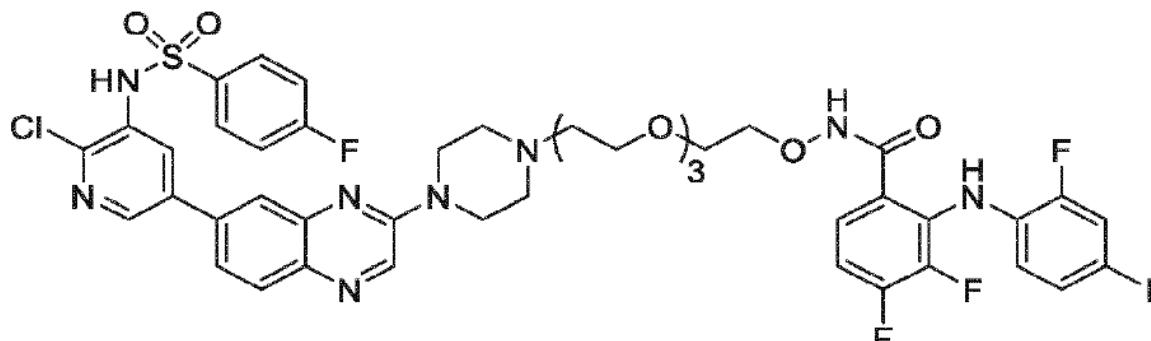
en donde R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1 - 6; n = 1 - 6; o cualquier combinación de m y n



10

$\text{R}_1, \text{R}_2$  son independientemente H, alquilo o arilo y m, n, o son independientemente 1 - 6.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en



15

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o 2 y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2 o una composición según la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en donde la inhibición de al menos uno de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio.
- 25 5. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 4, en donde la enfermedad o afección se selecciona de cánceres, tales como carcinomas, incluyendo de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino),

esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides, renal y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkitts, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (RCC), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma, cánceres de oncología pediátrica y de adultos, crecimiento de tumores sólidos/tumores malignos, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas humanos de tejidos blandos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, particularmente de la cabeza y el cuello, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma oral, tumores malignos de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica y tricoleucemia, linfomas de derrame (linfomas basados en la cavidad corporal), linfoma tímico, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de células pequeñas, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de mama, incluyendo carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal), cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados con neoplasia colorrectal), cáncer pancreático, cáncer de hígado, cánceres urológicos (incluyendo cáncer de vejiga, tales como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células transicionales invasivo de la vejiga y cáncer de vejiga invasivo del músculo), cáncer de próstata, tumores malignos del tracto genital femenino (incluyendo carcinoma de ovario, tumores malignos epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervicouterino, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), tumores malignos del tracto genital masculino (incluyendo cáncer testicular y cáncer de pene), cáncer de riñón (incluyendo carcinoma de células renales), cáncer cerebral (incluyendo tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas e invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central), cánceres óseos (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, derrame peritoneal, derrame pleural maligno, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, tumor maligno mieloide incluyendo leucemia mielógena aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mieloide crónica (CML), sarcoma de Kaposi, cánceres pancreáticos y colorrectales, y enfermedad metastásica tumoral, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias intestinales, vasculitis, síndrome de Behcet, psoriasis, dermatosis inflamatorias, asma, enfermedades alérgicas respiratorias, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injertos, fiebre, trastornos cardiovasculares, trastornos cerebrovasculares, fibrosis, enfermedad del tejido conjuntivo, sarcoidosis, trastornos genitales y reproductivos, trastornos gastrointestinales, trastornos neurológicos, trastornos del sueño, dolor, trastornos renales y enfermedades infecciosas, incluyendo VIH, dolor crónico incluyendo dolor neuropático (dolor provocado por daño a o mal funcionamiento de los propios nervios) y dolor nociceptivo (los nociceptores son receptores en el sistema nervioso que se activan durante una lesión) y dolor crónico asociado con diagnóstico clínico como, por ejemplo, fibromialgia, inflamación, mal funcionamiento musculoesquelético).

6. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad o afección es un cáncer.

50 7. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona de carcinomas, incluyendo vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides, renal y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkitts, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (RCC), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma, oncología pediátrica y de adultos, crecimiento de tumores sólidos/tumores malignos, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas humanos de tejidos blandos, incluyendo

5 sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, particularmente de la cabeza y el cuello, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma oral, tumores malignos de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica y tricoleucemia, linfomas de derrame (linfomas basados en la cavidad corporal), linfoma tímico, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de células pequeñas, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres de células no pequeñas, cáncer de mama, incluyendo carcinoma de células pequeñas y carcinoma ductal), cánceres gastrointestinales (incluyendo cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal y pólipos asociados con neoplasia colorrectal), cáncer pancreático, cáncer de hígado, cánceres urológicos (incluyendo cáncer de vejiga, tales como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células transicionales invasivo de la vejiga y cáncer de vejiga invasivo del músculo), cáncer de próstata, tumores malignos del tracto genital femenino (incluyendo carcinoma de ovario, tumores malignos epiteliales peritoneales primarios, carcinoma cervicouterino, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), tumores malignos del tracto genital masculino (incluyendo cáncer testicular y cáncer de pene), cáncer de riñón (incluyendo carcinoma de células renales), cáncer cerebral (incluyendo tumores cerebrales intrínsecos, neuroblastoma, tumores cerebrales astrocíticos, gliomas e invasión de células tumorales metastásicas en el sistema nervioso central), cánceres óseos (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, progresión tumoral de queratinocitos cutáneos humanos y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, derrame peritoneal, derrame pleural maligno, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, tumor maligno mieloide incluyendo leucemia mielógena aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia mieloide crónica (CML), sarcoma de Kaposi, cánceres pancreáticos y colorrectales, y enfermedad metastásica tumoral.

10

15

20

25

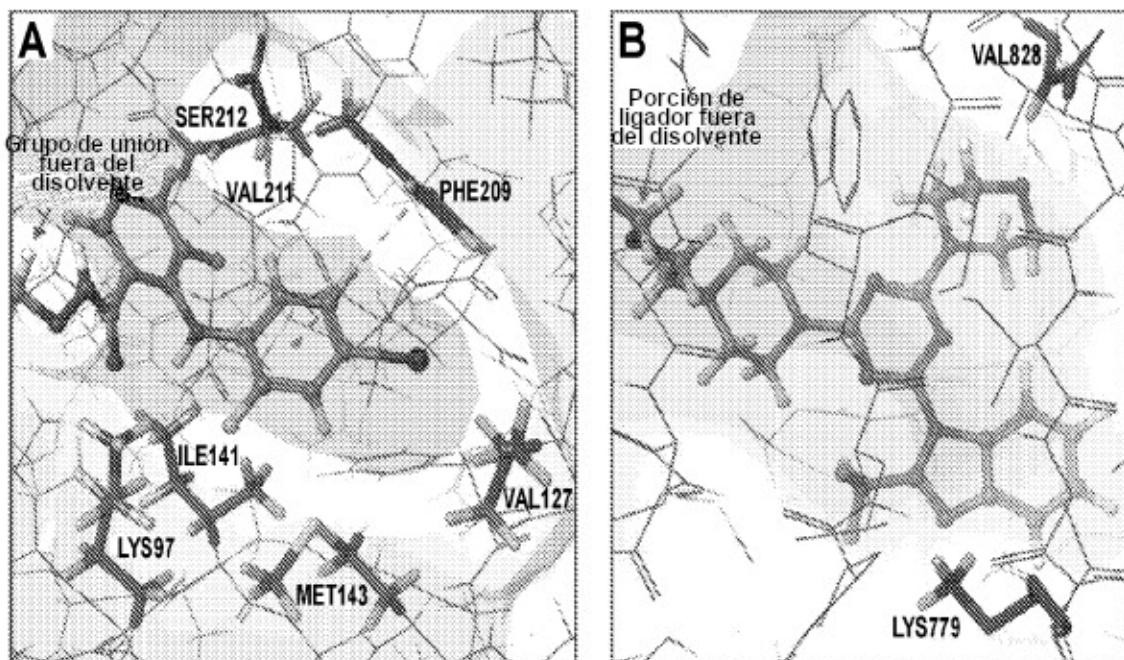


FIG 1

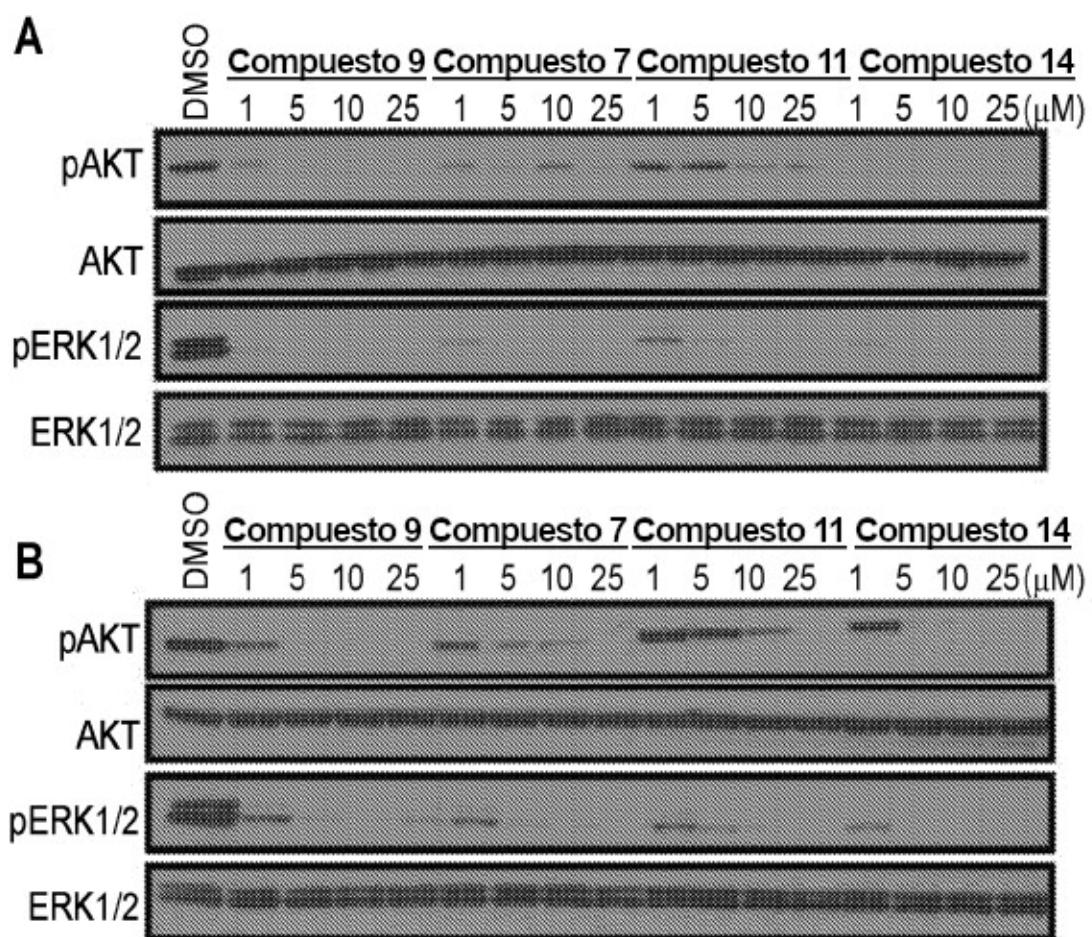
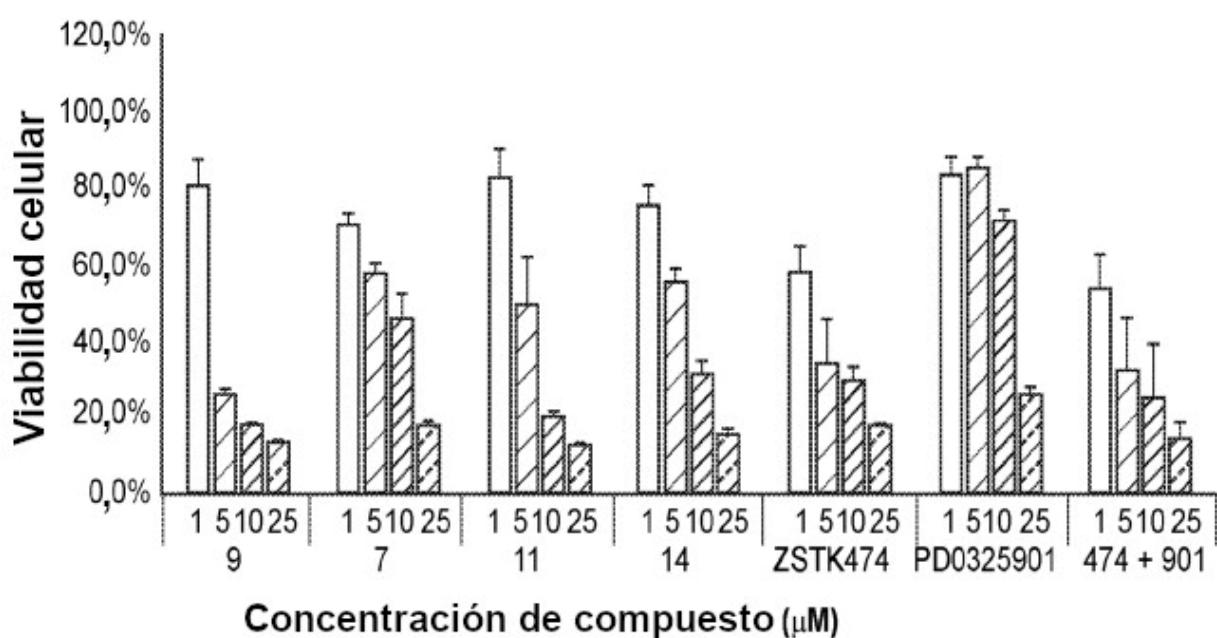
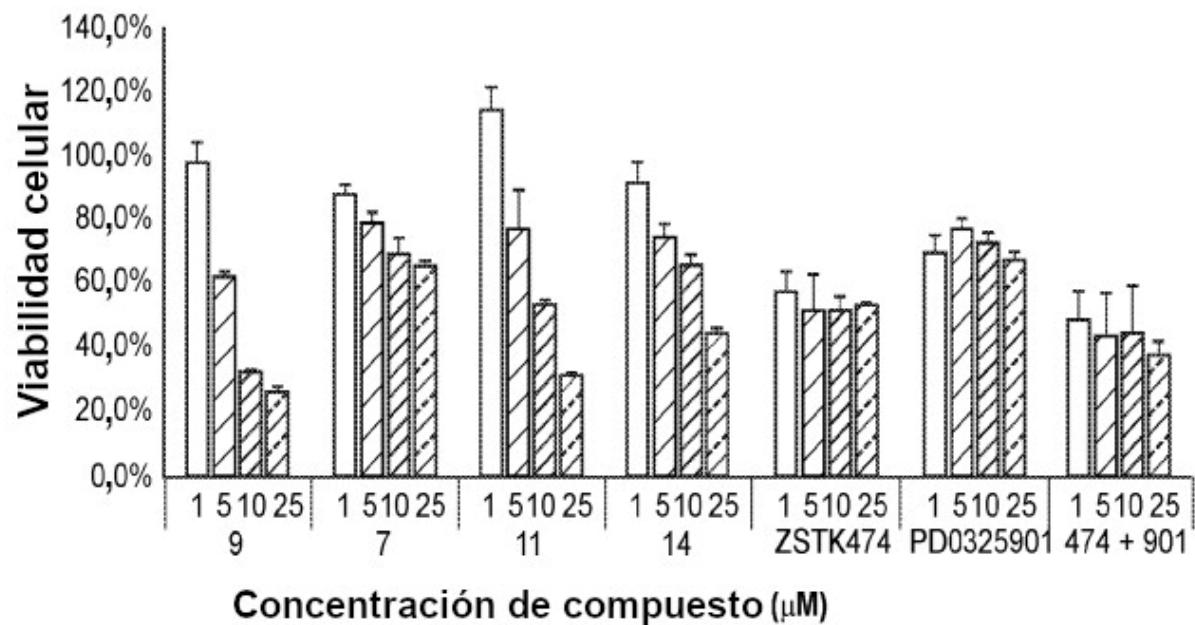


FIG 2



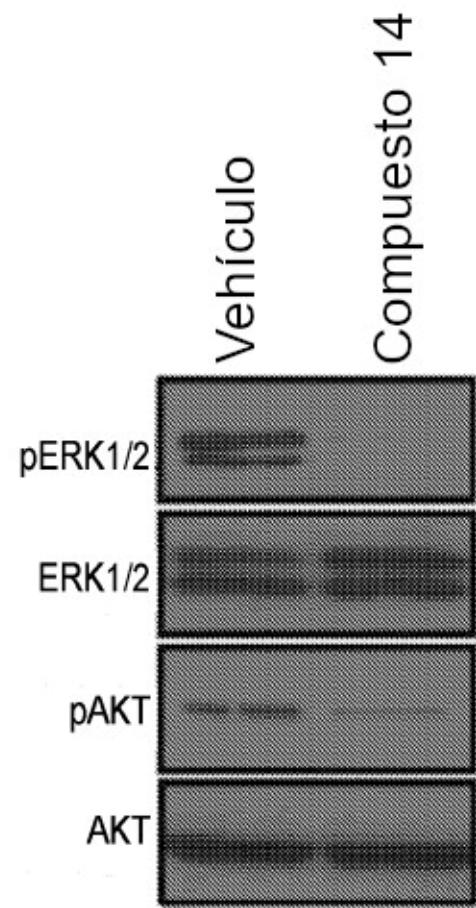
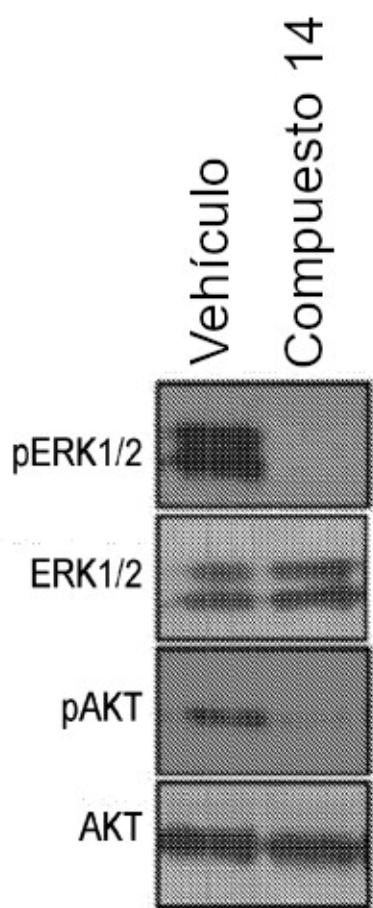
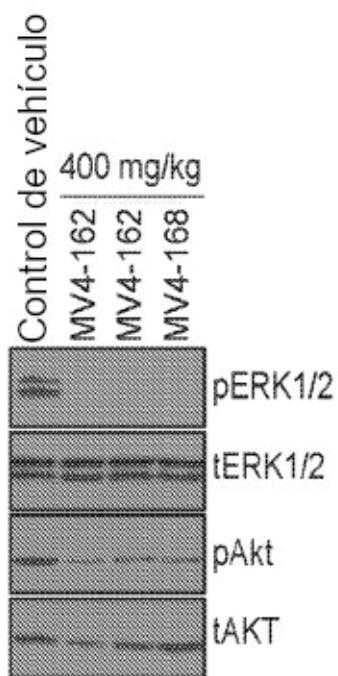


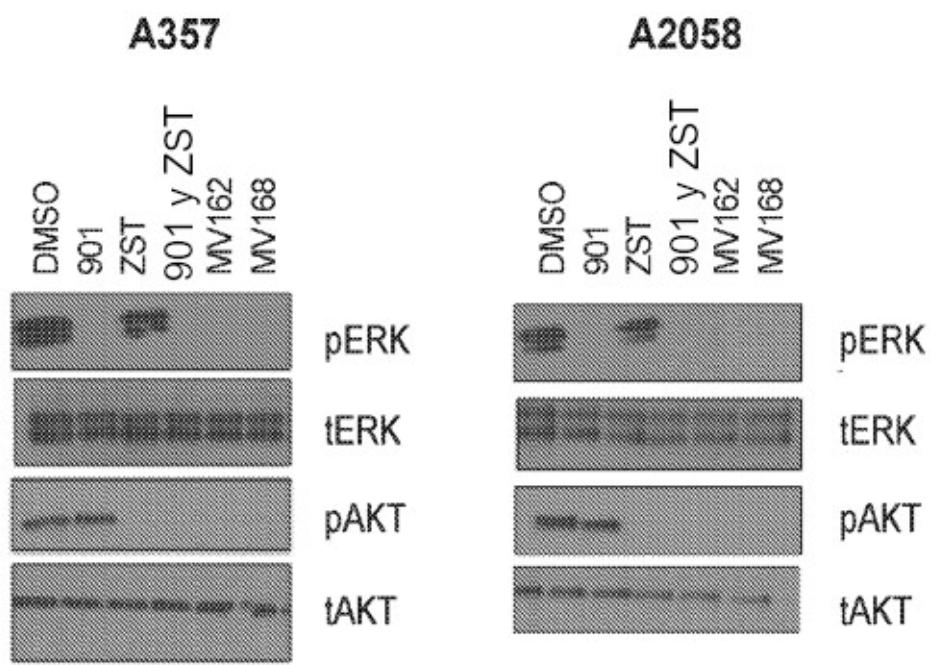
FIG. 4A



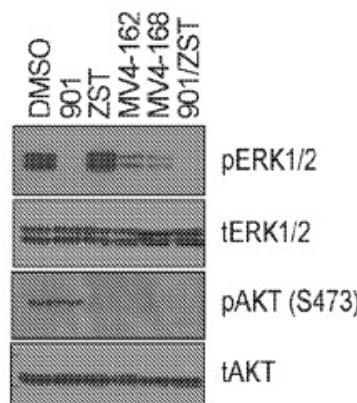
**FIG. 4B**



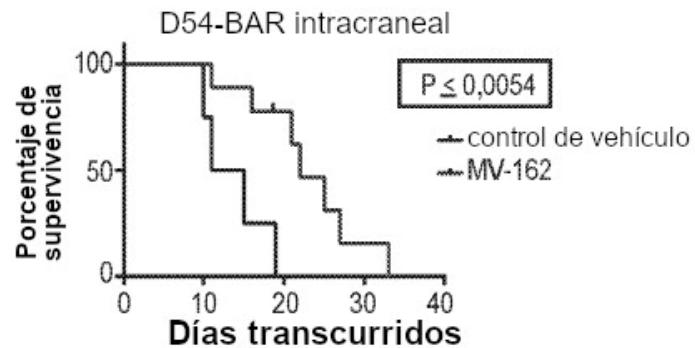
**FIG. 5**



**FIG. 6**

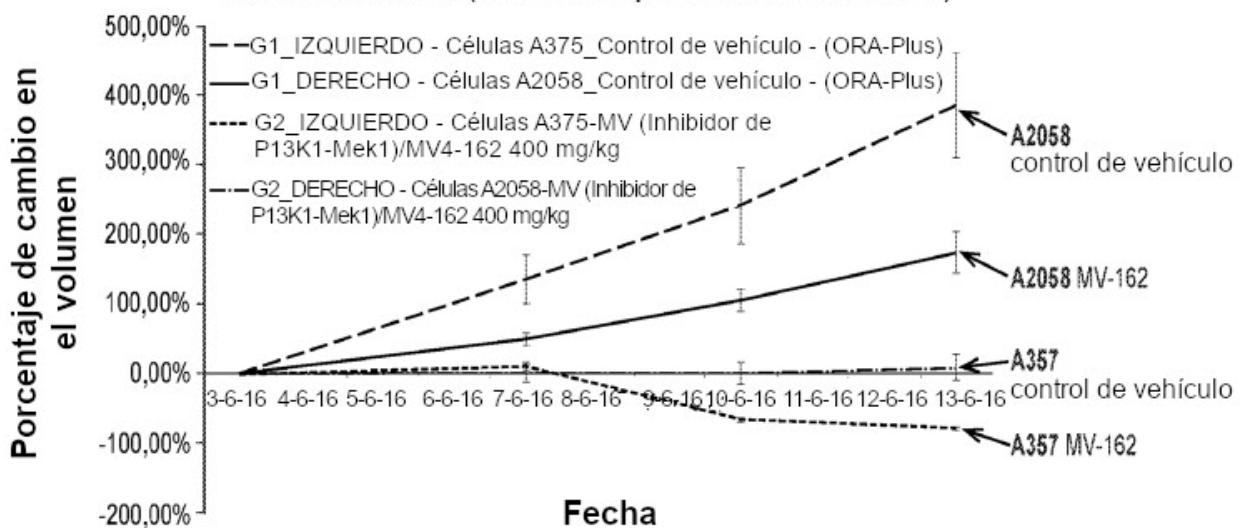


**FIG. 7**



**FIG. 8**

**Melanoma FL7 (costado): Porcentaje de cambio en el volumen tumoral (tratamiento que comienza el 3-6-2016)**



**FIG. 9**

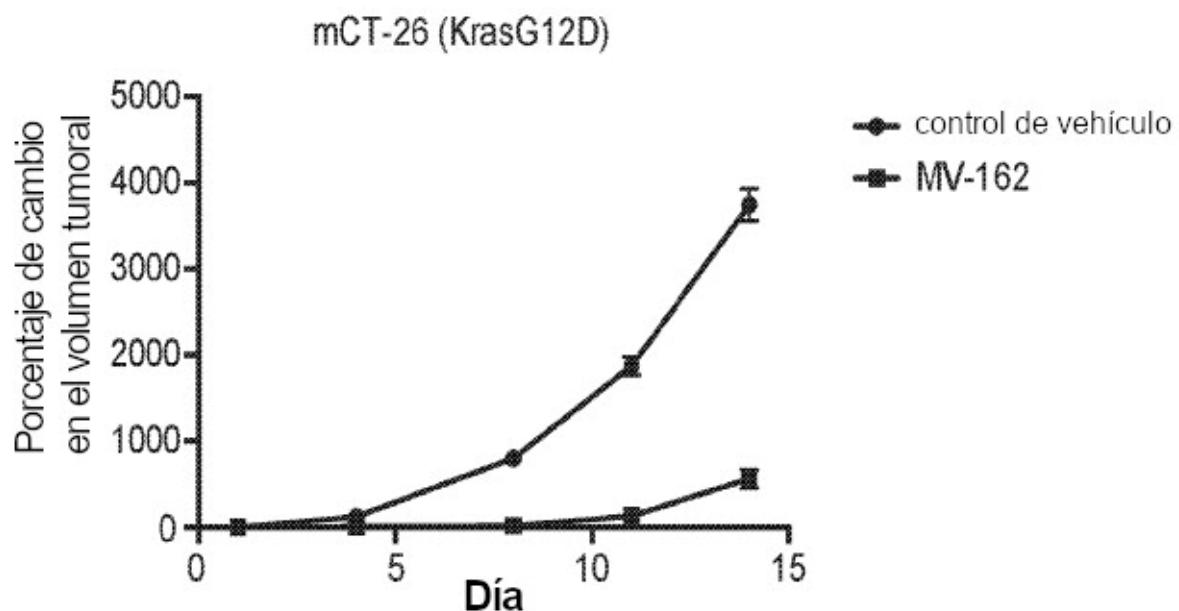


FIG. 10

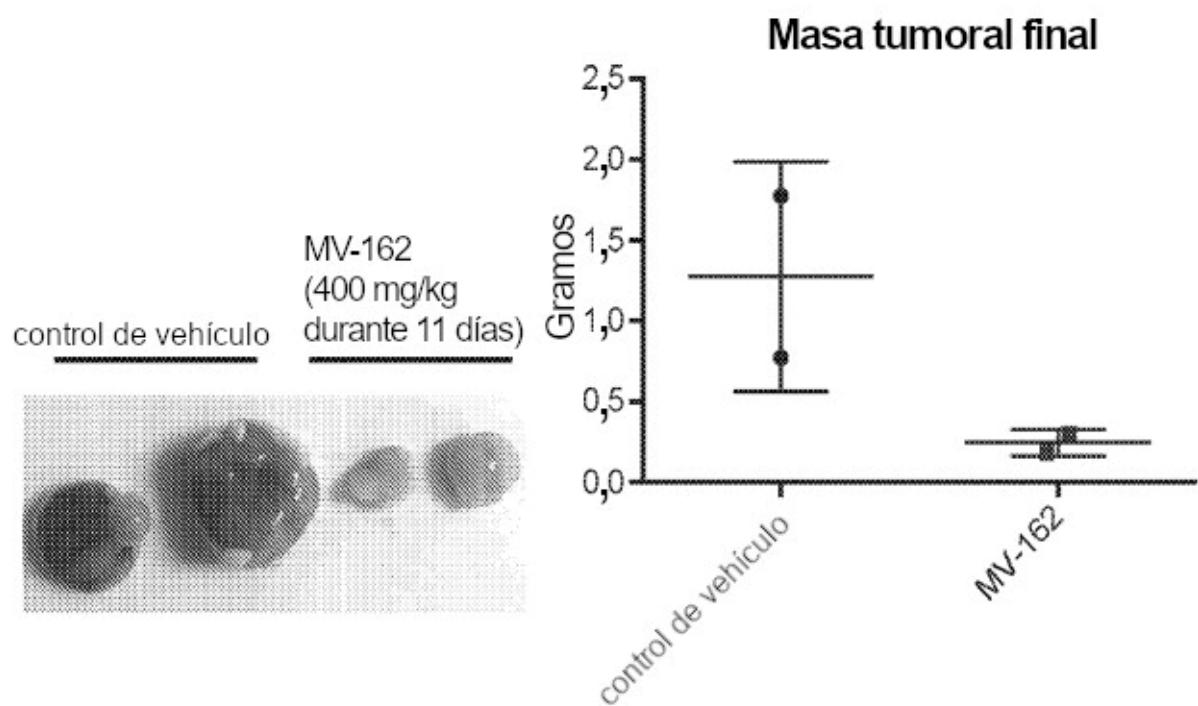


FIG. 11