

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 745**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61K 31/5355 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2017** **E 22179630 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 4086250**

54 Título: **Inhibidores multifuncionales de las rutas biológicas 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:
07.03.2025

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.00%)
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 3 002 745 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 MEK/PI3K y mTOR/MEK/PI3K y métodos terapéuticos que usan los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores multifuncionales, incluyendo inhibidores bifuncionales, inhibidores trifuncionales, e inhibidores tetrafuncionales de mTOR, MEK y PI3K, y a composiciones y usos en el tratamiento de 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 terapia contra el cáncer, ya sea solos o en combinación con radiación y/o agentes quimioterapéuticos.

Antecedentes de la invención

La hiperactivación anómala de KRAS desempeña un papel prominente en la iniciación y evolución de 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 mayor frecuencia, aproximadamente el 22%, de todas las neoplasias malignas humanas (1). La incidencia de mutaciones de KRAS es especialmente alta en neoplasias malignas pancreáticas y colorrectales, donde se produce a una frecuencia de más del 90% y más del 40%, respectivamente. Los cánceres pancreáticos y colorrectales están entre los más letales de todos los cánceres y son la cuarta y tercera causas principales de muertes por cáncer en los Estados Unidos (2). Aproximadamente el 80% de todos los casos de cáncer pancreático se presenta con enfermedad localmente avanzada o metastásica, que excluye la intervención quirúrgica. Actualmente, no hay opciones curativas para el tratamiento de cánceres con KRAS activado. Las opciones de tratamiento para pacientes mutantes de KRAS con cáncer colorrectal metastásico en los que ha fallado la quimioterapia de primera línea con una fluoropirimidina y oxaliplatino también son limitadas.

La invasión, motilidad y metástasis de células tumorales es una causa significativa de mortalidad en pacientes de cáncer. El proceso de metástasis tumoral resulta debido a una serie compleja de procesos (36). Estudios han descritos que la ruta PI3K/Akt está significativamente implicada en evolución tumoral y metástasis (37). Además, se ha descrito que inhibidores de MEK, así como de PI3K son eficaces en disminuir fenotipos prometástasis en células tumorales (38). Los inhibidores que median el bloqueo de MAPK quinasa (MEK), que es posterior a BRAF en la ruta de MAPK y se ha asociado con supervivencia sin evolución y global mejorada en pacientes de melanoma BRAF V600 (que comprende las mutaciones tanto V600E como V600K) (39, 40). En conjunto la inhibición de las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (Ras/Raf/MEK/ERK) y fosfoinosítido-3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) se ha establecido con capacidades de motilidad e invasivas (metastásicas) reducidas (41, 42). Por tanto, agentes molecularmente dirigidos contra las rutas de señalización Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt son importantes para la inhibición de crecimiento y metástasis de células tumorales. Se anticipa que la inhibición de migración, invasión y metástasis de células tumorales mediante la supresión dual de las rutas Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt desempeñe un papel clave en mejorar las pautas de terapia contra el cáncer. Los compuestos que simultáneamente se dirigen a las rutas Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt deben proporcionar inhibición mejorada de fenotipos invasivos y procesos prometastásicos para el tratamiento de enfermedad primaria y metastásica que produce mortalidad de pacientes disminuida.

Los esfuerzos para desarrollar fármacos que se dirijan directamente a KRAS mutante permanecen desafiantes porque las cuestiones de especificidad son problemáticas. Por consiguiente, los esfuerzos en la intervención farmacológica de la señalización de KRAS se han enfocado intensamente en los últimos años en dianas posteriores en las dos rutas efectoras de RAS centrales, RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR (3,4). RAF y MEK han generado un número de programas de descubrimiento de fármacos que han producido candidatos clínicos atractivos (5-7). La actividad clínica de inhibidores de BRAF probablemente estará restringida a pacientes con tumores mutados en BRAF porque la ausencia de una mutación de BRAF se asocia con inducción, más que inhibición, de la señalización de MAPK en respuesta a este enfoque dirigido (8-10). Por el contrario, se ha mostrado que los inhibidores de MEK ejercen efectos antiproliferativos en aproximadamente la mitad de los tumores mutantes de KRAS ensayados (11). Es esperanzador que el inhibidor de MEK CI-1040, así como trametinib, hayan provocado ambas respuestas objetivas en ensayo de fase 1 (12, 13). La inhibición de MEK, por tanto, es un enfoque viable para el tratamiento de cánceres activados por KRAS, pero en un marco de monoterapia, la inhibición de MEK es improbable que produzca el grado de actividad necesaria para impactar significativamente el desenlace en esta población de pacientes resistentes.

Una estrategia para mejorar la actividad de agente único inhibidor de MEK es dirigirse adicionalmente a la señalización de PI3K. Esta estrategia de combinación se basa en evidencia *in vitro* e *in vivo* que sugiere que los tumores mutantes de KRAS requieren inhibición dual de las rutas de señalización tanto de MAPK como PI3K para alcanzar inhibición máxima del crecimiento tumoral (11, 14-16). Se ha mostrado que la liberación de bucles de retroalimentación negativa produce la activación de la ruta alternativa cuando cualquiera de ellas se inhibe (16, 17). La activación de la ruta de PI3K, comúnmente debido a mutaciones PI3KCA o pérdida de PTEN, representa un mecanismo de resistencia principal a la terapia de inhibidor de MEK en cánceres mutantes de KRAS. La inhibición combinada de ambas rutas lleva a un aumento significativo en apoptosis y contracción tumoral (18).

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

Por tanto, los inhibidores de mTOR, MEK y PI3K se conocen en la técnica. Por ejemplo, Ikura et al., patente en EE UU No. 7.897.792 divulga una clase de inhibidores de MEK basados en cumarina. Los inhibidores de PI3K se divulgan, por ejemplo, en las patentes en EE UU No. 2010/0249099; 2011/0009405; y 2011/0053907. El uso combinado de inhibidores de PI3K y MEK para tratar cáncer de pulmón se divulga, por ejemplo, en Engelman et al., *Nature Medicine*, Vol. 14, Número 14, páginas 1351-56 (2008).

También se conocen en la técnica inhibidores de mTOR, por ejemplo, los documentos WO 2006/122806, WO 2010/003816, la patente en EE UU No. 9.284.315, y el documento WO 2012/068106. En algunas formas de realización, un inhibidor del estado de la técnica es un inhibidor dual de mTOR y PI3K.

La modulación de componentes distales de la ruta de PI3K también se ha implicado en una amplia variedad de otros procesos de enfermedad incluyendo infecciones y enfermedades inmunitarias/inflamatorias caracterizadas por la destrucción de tejido (27). Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un problema de salud mundial principal. Se sabe que las cascadas de señalización intracelular incluyendo, por ejemplo, las proteínas quinasas p38 y activada por mitógeno ERK son importantes en la regulación de metaloproteinasas de matriz (MMP) (28). La fosfatidil inositol 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- α e IL-10 de monocitos mientras el aumento de quimioquinas inducido por Mtb puede ser inhibido por inhibidores de PI3K (32). PIP3, el producto posterior de la actividad PI3K, también se requiere para maduración del fagocitoma micobacteriano (33). La inhibición de AKT puede producir un efecto supresor global sobre la secreción y expresión génicas de las MMP y el crecimiento intracelular de Mtb se previene por 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 se dirigen a las rutas de señalización relacionadas con estos procesos de señalización pueden ser eficaces para la interrupción de mecanismos de transducción de señales en infección micobacteriana junto a proporcionar una reducción en el daño del tejido inflamatorio.

La ruta de señalización celular mTOR es un componente de la ruta de supervivencia celular de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que desempeña un papel significativo en la regulación del crecimiento y proliferación celular. Se considera que la activación anómala de la ruta de PI3K está implicada en muchos tipos de cáncer que produce resistencia asociada a terapia. La ruta PI3K/AKT/mTOR está implicada en la regulación del metabolismo, crecimiento y supervivencia celulares, progresión del ciclo celular, y transcripción y traducción. AKT reside después de la señalización de fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K), que se activa tras unión de ligandos (tal como insulina u otros factores de crecimiento) a receptores tirosinas quinasas (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 antes y después de Akt y por tanto sirve como una unión crítica de señalización en la ruta de PI3K. La quinasa mTOR se ensambla en dos complejos distintos dentro de la célula (mTORC1 y mTORC2), y están localizados en ambos lados del centro de señalización AKT. El complejo sensible a rapamicina con raptor (mTORC1) reside después de AKT mientras el complejo insensible a rapamicina con rictor (mTORC2) puede activar completamente AKT por fosforilación directa en Ser473. Por tanto, está bien establecido que mTOR es capaz de formar dos complejos multiproteicos primarios conocidos como mTORC1 y mTORC2. Estos complejos sirven para regular la síntesis de proteínas celulares, que son requisitos clave para la homeostasis celular incluyendo crecimiento y proliferación. Por tanto, mTOR es una ruta de señalización en cáncer muy relevante después de los receptores de superficie, y existe una necesidad significativa para fármacos mejorados capaces de dirigirse a mTOR.

La activación por ligando unido de un receptor transmembrana produce la activación de PI3K que posteriormente fosforila Akt, que es desfosforilada por PTEN. Debido a señalización posterior aumentada de la ruta PI3K/Akt/mTOR el cáncer junto con enfermedades autoinmunitarias incluyendo procesos inflamatorios son en parte responsables para estas enfermedades y ejercen numerosos efectos biológicos posteriores, incluyendo la traducción de ARNm al fosforilar dianas posteriores, tal como 4E-BP1 y p70 S6 quinasa, la supresión de autofagia a través de Atg13 y ULK1, biogénesis de ribosomas, y activación de transcripción que produce actividad mitocondrial o adipogénesis aumentadas. Por tanto, mTOR es una diana posterior de la señalización de EGFR/PI3K/Akt y MET junto con intercomunicación significativa con la señalización de MEK, y según esto se considera una diana clave para el tratamiento terapéutico de varios tipos de enfermedades.

La disregulación de las rutas PI3K/AKT/mTOR y MEK produce crecimiento y proliferación celular incontrolados. Sin embargo, todavía existe una necesidad en la técnica para compuestos y métodos para tratar cánceres y otras enfermedades y afecciones por inhibición de mTOR, MEK, y PI3K. A pesar del descubrimiento de inhibidores de molécula pequeña de mTOR, MEK, y PI3K, el diseño de inhibidores potentes de mTOR, MEK, y PI3K permanece un

desafío significativo en descubrimiento de fármacos modernos. Según esto, todavía existe una necesidad en la técnica para inhibidores de mTOR, MEK, y PI3K multifuncionales 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 único diseñados para unirse a mTOR, MEK, y PI3K y para inhibir la actividad de mTOR, MEK, y PI3K.

Marcian E. Van Dort et al., Journal of medicinal chemistry, 59(6):2512-2522 (2016) divulga el descubrimiento de inhibidores de dianas oncogénicas multifuncionales contra proteínas quinasas activadas por mitógenos alostéricas (MEK1) y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

Nobuko Nishimura et al., Journal of medicinal chemistry 54(13):4735-4751 (2011) divulga inhibidores duales de fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K)/diana de rapamicina de mamífero (mTOR): descubrimiento y relaciones de estructura y actividad de una serie de derivados de quinolina y quinoxalina.

El documento WO2009/155121 divulga compuestos que inhiben la fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K); métodos de tratar enfermedades o afecciones, tal como cáncer, usando los compuestos; y composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos.

Compendio de la invención

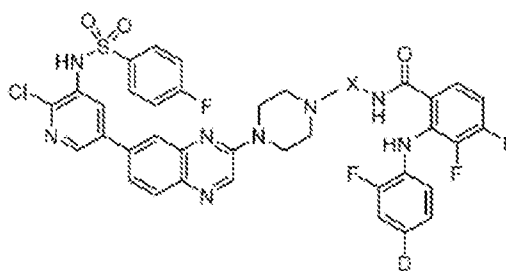
La presente invención se dirige a un compuesto individual que se codirige a las rutas de MAP quinasa y PI3K, y a sus usos en tratar cáncer. Los presentes compuestos se han desarrollado para codirigirse a estas importantes rutas de señalización con el fin de combatir enfermedades asociadas con la disregulación de sus rutas.

Más en particular, la presente invención se dirige 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 crecimiento, evolución y metástasis tumorales. Los inhibidores individuales de mTOR, PI3K y MEK, químicamente modificados para acomodar enlazadores, mientras mantienen alta afinidad de unión hacia sus respectivas dianas enzimáticas, se han conjugado para proporcionar los presentes inhibidores de mTOR/MEK/PI3K bifuncionales, trifuncionales y tetrafuncionales. Los presentes compuestos inhiben evolución tumoral impulsada por KRAS dirigiéndose simultáneamente a dos o tres nodos reguladores críticos, mTOR, MEK, y PI3K, y al hacer eso interceptar la intercomunicación que se produce entre sus respectivas rutas.

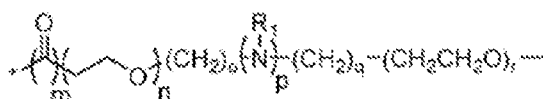
La presente invención, por tanto, se dirige a inhibidores multifuncionales de las enzimas mTOR, MEK, y PI3K, a composiciones que comprenden los inhibidores, y al uso de los inhibidores en un tratamiento terapéutico de afecciones y enfermedades en donde la inhibición de la actividad mTOR, MEK, y PI3K proporciona un beneficio. Los presentes compuestos son inhibidores potentes 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 de KRAS.

La presente invención se dirige a compuestos trifuncionales capaces de inhibir la actividad mTOR, MEK, y PI3K que tienen las siguientes fórmulas estructurales:

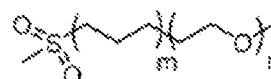
(a)



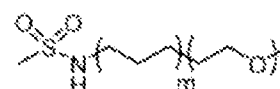
en donde D es I, $-C\equiv CH$, o $-C\equiv C-R$, R = alquilo o arilo, y X se selecciona del grupo que consiste en:



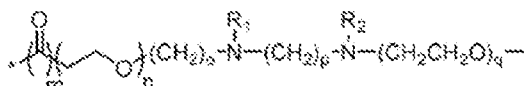
R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 0, 1; q = 0-6; r = 2-6



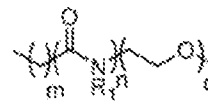
en donde, independientemente, m = 0-6; n = 2-6



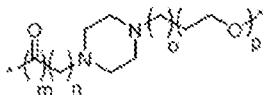
en donde, independientemente, m = 0-6; n = 2-6



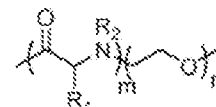
en donde, independientemente, $m = 0, 1$; $n = 0-6$; $o = 0-6$; $p = 1-6$; $q = 2-6$, y R_1 y R_2 , independientemente son H, alquilo, o arilo



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

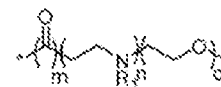


en donde, independientemente, $m = 0, 1$; $n = 0-6$; $o = 0-6$; $p = 2-6$



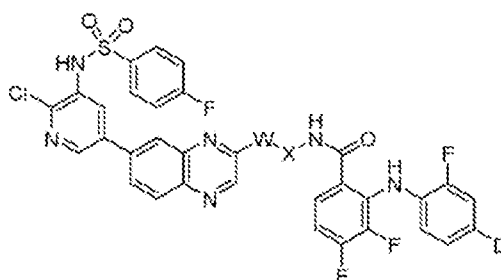
R_1, R_2 , independientemente son H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, $m = 1-6$; $n = 2-6$

y



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

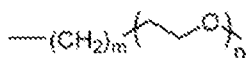
(b)



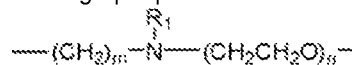
en donde W es y R es H, alquilo o arilo y $m = 0, 1-6$;

5

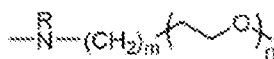
D = I, $-C\equiv CH$, $-C\equiv C-R$ donde R = alquilo o arilo, en donde X se selecciona del grupo que consiste en:



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



$R_1 = H$, alquilo o arilo donde m, n independientemente son 1-6



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



R_1, R_2 son independientemente H, alquilo, o arilo, y m, n, o independientemente son 1-6

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una forma de realización, la presente invención proporciona los compuestos mencionados anteriormente para uso en tratar una afección o enfermedad. La enfermedad o afección de interés es tratable por inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K, por ejemplo, un cáncer.

15 Otra forma de realización de la presente invención es proporcionar una composición que comprende (a) un inhibidor multifuncional presente y (b) un excipiente y/o soporte farmacéuticamente aceptable útil en tratar enfermedades o afecciones en donde la inhibición de uno o más de mTOR, MEK, y PI3K proporciona un beneficio.

Otra forma de realización de la presente invención es una composición que comprende un compuesto multifuncional presente y un segundo agente terapéuticamente activo para uso en tratar un individuo para una enfermedad o afección en donde la inhibición de uno o más de mTOR, MEK, y PI3K proporciona un beneficio.

5 En una forma de realización adicional, la invención proporciona el uso de una composición que comprende un inhibidor multifuncional presente y un segundo agente terapéutico opcional para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección de interés, por ejemplo, un cáncer.

10 Estas y otras formas de realización y características de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada de las formas de realización preferidas.

El ámbito de la invención y por tanto de protección se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier objeto divulgado en la siguiente descripción, pero no abarcado por las reivindicaciones no se debe entender que forma parte de la invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura acoplada del compuesto 14 en el bolsillo alostérico de MEK (A) y en PI3K α (B);

20 La figura 2 muestra la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11, y 14 que se dirigen a las rutas MAPK/ERK y PI3K/AKT de células tumorales pulmonares A-549 (Fig. 2A) y de glioma D54 (Fig. 2B) cultivadas;

La figura 3 muestra la cuantificación de la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11, y 14;

25 La figura 4 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vitro* en ratones que portan tumores por el compuesto 14;

La figura 5 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones que portan glioma D54 por MV4-162 (compuesto 14) o MB4-168;

30 La figura 6 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en las líneas tumorales de melanoma con crecimiento subcutáneo A357 y A2058 en ratones;

35 La figura 7 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en la línea tumoral de cáncer de colon con crecimiento subcutáneo CT26 en ratones;

La figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia frente a días pasados para animales tratados con MV4-162 (compuesto 14);

40 La figura 9 contiene gráficos que muestran volúmenes tumorales de tumores de melanoma A2058 y A357 para animales tratados con MV-162 (compuesto 14) y vehículo control;

La figura 10 contiene gráficos que muestran el porcentaje de cambio en volumen tumoral frente a días para animales tratados con un vehículo control y MV4-162 (compuesto 14);

45 La figura 11 ilustra y grafica la masa tumoral para ratones tratados con compuesto 14 (MV4-162) y un vehículo control.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

50 El término "PI3K" como se usa en el presente documento significa una fosoinositido-3-quinasa de clase I (incluyendo clase Ia y clase Ib), clase II, o clase III, como se define en la publicación de la patente en EE UU No. 2011/0009405.

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

55 El término "mTOR" como se usa en el presente documento significa diana mecanicista de rapamicina.

El término "una enfermedad o afección en donde la inhibición de mTOR y/o PI3K y/o MEK proporciona un beneficio" se refiere a una afección en la que al menos una de mTOR, PI3K, y MEK, y/o una acción de al menos una de mTOR, PI3K, y MEK, es importante o necesaria, por ejemplo, para el inicio, evolución, 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 tal afección incluye, pero no está limitado a, un cáncer. Un experto en la materia es capaz fácilmente de determinar si un compuesto trata una enfermedad o afección mediada por una o más de mTOR, PI3K, y MEK para cualquier tipo celular particular, por ejemplo, mediante ensayos que convenientemente se pueden usar para evaluar la actividad de compuestos particulares.

65

El término “segundo agente terapéutico” se refiere a un agente terapéutico diferente de un inhibidor multifuncional presente y que se sabe 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 quimioterapéutico conocido, como taxol, o radiación, por ejemplo.

El término “enfermedad” o “afección” indica alteraciones y/o anomalías que por regla general se considera que son condiciones o funciones patológicas, y que se pueden manifestar en forma de signos, síntomas y/o disfunciones particulares. Como se demuestra posteriormente, los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de MEK y PI3K, o mTOR, MEK y PI3K y se pueden usar en tratar enfermedades y afecciones en donde la inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K proporciona un beneficio.

Como se usan en el presente documento, los términos “tratar”, “que trata”, “tratamiento”, y similares se refieren a eliminar, reducir o aliviar una enfermedad o afección, y/o síntomas asociados con la misma. Aunque no excluido, tratar una enfermedad o afección no requiere que la enfermedad, afección, o 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 volver a desarrollar una enfermedad o afección, o de una recaída 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 de una recaída 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 en necesidad de tal tratamiento.

Dentro del significado de la invención, “tratamiento” también incluye profilaxis de recaída o profilaxis de fase, así como el tratamiento de signos, síntomas y/o disfunciones agudos o crónicos. El tratamiento puede estar orientado sintomáticamente, por ejemplo, para suprimir síntomas. Se puede efectuar durante un periodo corto, estar orientado durante un término medio, o puede ser un tratamiento a largo plazo, por ejemplo, en el 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 (los) ingrediente(s) activo(s) suficiente, cuando se administra en un uso según la invención, para administrar eficazmente el (los) ingrediente(s) activo(s) para el tratamiento de la afección o enfermedad de interés a un individuo en necesidad de ello. En el caso de un cáncer u otro trastorno de proliferación, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente puede reducir (es decir, retrasar a algún nivel y preferiblemente parar) la proliferación celular indeseada; reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retrasar a algún nivel y preferiblemente parar) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, retrasar a algún nivel y preferiblemente parar) la metástasis tumoral; inhibir, a algún grado, el crecimiento tumoral; reducir la señalización de mTOR, MEK y PI3K en las células diana; y/o aliviar, a algún grado, uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Al grado que el compuesto o composición administrado previene el crecimiento y/o destruye células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

El término “envase” significa cualquier receptáculo y cierre para el mismo adecuado para almacenar, enviar, dispensar, y/o manejar un producto farmacéutico.

El término “prospecto” significa información que acompaña un producto farmacéutico que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia requeridos para permitir al médico, farmacéutico y paciente tomar una decisión informada respecto al uso del producto. El prospecto en general 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 concurrentemente al sujeto que se trata. Mediante “concurrentemente” se quiere decir que cada agente se administra o bien simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos de tiempo. Sin embargo, si no se administran simultáneamente, quiere decir que se administran a un individuo en una secuencia y suficientemente cercanos en el tiempo de modo que se proporcione el efecto terapéutico deseado y puedan actuar en concierto. Por ejemplo, un inhibidor multifuncional presente se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo que un segundo agente terapéutico. Un inhibidor multifuncional presente y el segundo agente terapéutico se pueden administrar por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier ruta adecuada. Cuando un inhibidor multifuncional presente y el segundo agente terapéutico no se administran al mismo tiempo, se entiende que se pueden administrar en cualquier orden a un sujeto en necesidad de ello. Por ejemplo, un inhibidor multifuncional presente se puede administrar antes (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, o 12 semanas antes), al mismo tiempo que, 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, o 12 semanas después) la administración de una segunda modalidad de tratamiento de agente terapéutico (por ejemplo, radioterapia), a un individuo en necesidad de ello. En varias formas de realización, un inhibidor multifuncional presente y el segundo agente terapéutico se administran separados 1 minuto, separados 10 minutos, separados 30 minutos, separados menos de 1 hora, separados 1 hora, separados de 1 hora a 2 horas, separados de 2 horas a 3

horas, separados de 3 horas a 4 horas, separados de 4 horas a 5 horas, separados de 5 horas a 6 horas, separados de 6 horas a 7 horas, separados de 7 horas a 8 horas, separados de 8 horas a 9 horas, separados de 9 horas a 10 horas, separados de 10 horas a 11 horas, separados de 11 horas a 12 horas, separados no más de 24 horas o separados no más de 48 horas. En una forma de realización, los componentes de las terapias de combinación se administran separados de 1 minuto a 24 horas.

El uso de los términos “un”, “una”, “el”, “la”, y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se debe interpretar que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento simplemente se pretende que sirva como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si estuviera individualmente enumerado en el presente documento. El uso de cualquiera de los ejemplos, o redacción ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, se pretende que ilustre mejor la invención y no es una limitación del ámbito de la invención a menos que se reivindique de otra manera. No se debe interpretar que ninguna redacción en la especificación indica ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

La investigación ha establecido que dirigirse a mTOR, MEK, y PI3K usando inhibidores de molécula pequeña es una estrategia terapéutica contra el cáncer viable. Sin embargo, se sabe que los cánceres con mutación de KRAS están constitutivamente activados, son resistentes al estándar de cuidado y un marcador de mal pronóstico. Dos rutas efectoras de KRAS, MAPK y PI3K, son mensajeros importantes de proliferación y supervivencia, respectivamente, y son mecanismos de resistencia entre sí. Estudios preclínicos de cánceres han mostrado que la inhibición múltiple de rutas efectoras tiene efectos sinérgicos, que proporciona un razonamiento para terapias de combinación en un marco clínico.

La relevancia clínica de estos hallazgos se investiga 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 individual” no promiscuo ofrece un número de ventajas previstas sobre un enfoque de mezcla racionalmente diseñada. Primero, los efectos inespecíficos están compuestos cuando se combinan dos agentes separados independientemente de la selectividad de los componentes individuales. Algunas actividades inespecíficas se han demostrado ventajosas para el tratamiento de poblaciones de pacientes inesperados. Por ejemplo, el inhibidor de la quinasa abl “selectivo” imatinib se ha demostrado eficaz para el tratamiento de GIST impulsado por c-kit, así como ciertas neoplasias malignas impulsadas por PDGFR (20).

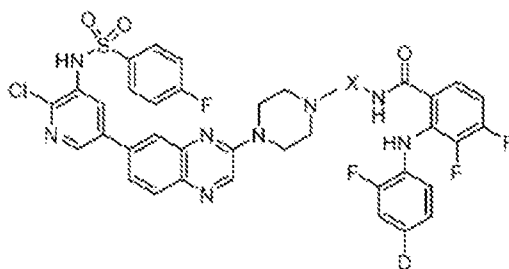
Sin embargo, en el mayor número de casos, se produce daño colateral en forma de toxicidades no mecanicistas cuando se inhiben dianas quinasas inesperadas. Segundo, los perfiles farmacocinéticos diferentes entre los agentes individuales pueden ser problemáticos cuando se combinan en la clínica, que puede además estar compuesto por desventajas de la interacción fármaco-fármaco diferentes. Los problemas de cumplimiento del paciente y coste de los fármacos apoyan además el diseño de entidades químicas individuales para deteriorar la señalización a través de múltiples nodos. También se encuentran obstáculos logísticos cuando se realizan ensayos de combinación con dos agentes no aprobados. Mientras los datos clínicos con el inhibidor de MEK trametinib parecen alentadores (21, 22), es menos probable que un inhibidor de PI3K o AKT se apruebe en el futuro predecible. Las células tumorales muestran una amplia gama de mecanismos para restablecer el flujo a través de la ruta PI3K/AKT/mTOR cuando se exponen a un inhibidor de PI3K, limitando de esta manera la eficacia de su agente único y obstaculizando su ruta de aprobación reguladora (23). La eficacia favorable derivada de un inhibidor horizontal, es decir, paralelo de la señalización PI3K/AKT y MEK/ERK, comparado con dirigirse a una etapa individual, se ha confirmado en datos clínicos tempranos (19).

Los presentes compuestos son inhibidores multifuncionales químicamente enlazados que se dirigen específicamente a las rutas tanto de MAPK como PI3K. Una única molécula que tiene esta capacidad de inhibición de rutas combinadas aumenta la eficacia y seguridad sobre inhibidores de diana única individuales. La administración de un único fármaco, en oposición a dos fármacos, también aumenta el cumplimiento del paciente con una pauta de tratamiento recetada.

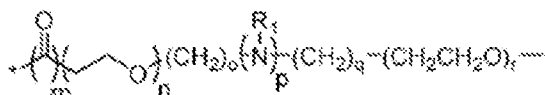
La presente invención se dirige a una nueva clase de inhibidores multifuncionales de MEK y PI3K o mTOR, MEK y PI3K. Los inhibidores multifuncionales de MEK/PI3K de la presente invención por tanto son útiles en el tratamiento de cánceres y precánceres en sujetos en necesidad de tal tratamiento.

La presente invención se dirige a compuestos trifuncionales capaces de inhibir la actividad mTOR, MEK, y PI3K que tienen una siguiente fórmula estructural:

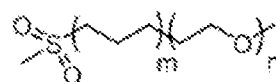
(a)



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:



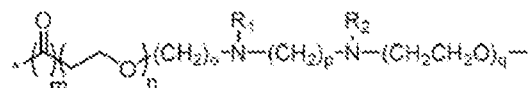
R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 0, 1; q = 0-6; r = 2-6



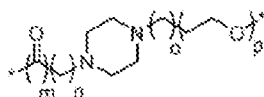
en donde, independientemente, m = 0-6; n = 2-6



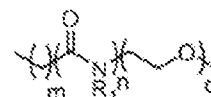
en donde, independientemente, m = 0-6; n = 2-6



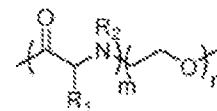
en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 1-6; q = 2-6, y R₁ y R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo



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

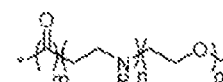


R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0-6; n = 1-6; o = 2-6;



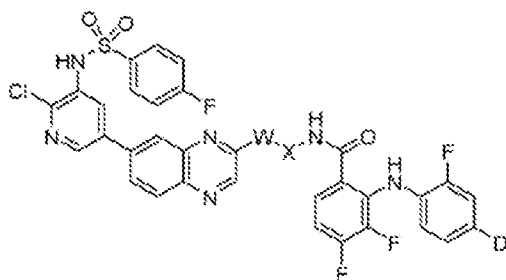
R₁, R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 1-6; n = 2-6

y



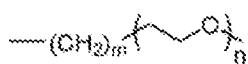
R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 1-6; o = 2-6;

5 (b)

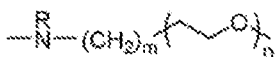


en donde W es $(-N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-)$ o $(-N(R)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-)$
y R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1-6;

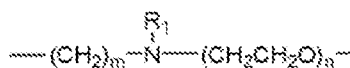
10 D = I, $-C\equiv CH$, $-C\equiv C-R$ donde R = alquilo o arilo, en donde X se selecciona del grupo que consiste en:



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



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



$R_1 = H$, alquilo o arilo donde m, n independientemente son $1-6$



R_1, R_2 son independientemente H , alquilo, o arilo, y m, n , o independientemente son $1-6$

La presente invención abarca compuestos trifuncionales 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 para tratar una enfermedad o afección en donde la inhibición de mTOR y/o MEK y/o PI3K proporciona un beneficio, por ejemplo, cánceres. 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 tratar la enfermedad o afección que afecta al individuo en necesidad de ello, por ejemplo, un agente quimioterapéutico y/o radiación que se saben útiles en tratar un cáncer particular.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarbonados de C_{1-10} saturados de cadena lineal y ramificados incluyendo, pero no limitados 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_n significa que el grupo alquilo tiene " n " átomos de carbono. El término C_{n-m} significa que el grupo alquilo puede tener de " n " a " m " átomos de carbono. El término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Un grupo alquilo, por ejemplo, metilo, o alquileo, por ejemplo, $-CH_2-$, puede estar sustituido con grupos halo, trifluorometilo, trifluorometoxi, hidroxilo, alcoxi, nitro, ciano, alquilamino, o amino, por ejemplo.

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

El término "hidroxilo" se define como $-OH$.

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

El término "amino" se define como $-NH_2$, y el término "alquilamino" se define como $-NR_2$, en donde al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno.

El término "nitro" se define como $-NO_2$.

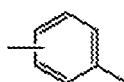
El término "ciano" se define como $-CN$.

El término "carbamoilo" se define como $-C(=O)NR_2$.

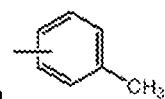
El término "trifluorometilo" se define como $-CF_3$.

El término "trifluorometoxi" se define como $-OCF_3$.

Como se usa en el presente documento, grupos tal como



es una abreviatura para



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 están limitados a, fenilo, naftilo, fluorenilo, azuleno, 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 otro(s) anillo(s) puede(n) ser saturado, parcialmente insaturado, o aromático, por ejemplo, dihidronaftilo, indenilo, indanilo, o tetrahidronaftilo (tetralinilo).

El término "heteroarilo" se refiere a estructuras de anillos 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, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxanteno, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, piracina, pirimidina, piridacina, indolicina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolicina, isoquinolina, quinolona, ftalacina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, y similares.

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, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, una fracción arilo o heteroarilo, trifluorometilo, ciano, y similares.

Además, también se incluyen en la presente invención sales, hidratos y solvatos de los presentes compuestos. La invención además incluye 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 compuesto multifuncional o compuesto trifuncional presente como un enantiómero único, se puede obtener o bien por resolución del producto final o por síntesis estereoespecífica a partir de material de partida enantioméricamente puro o 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 intermedio, o un material de partida se puede lograr por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Además, en situaciones donde tautómeros de un compuesto multifuncional presente son posibles, se pretende que la invención incluya todas las formas tautoméricas del compuesto.

Los compuestos de la invención pueden existir como sales. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención con frecuencia son preferidas en los usos de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal o forma dipolar de los presentes compuestos multifuncionales. Las sales de los presentes compuestos multifuncionales se pueden preparar durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o por separado haciendo reaccionar el compuesto con un ácido que tenga 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 los ácidos que se pueden emplear para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tal como nítrico, bórico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, y fosfórico, y ácidos orgánicos tal como oxálico, maleico, succínico, y cítrico. Los ejemplos no limitantes de sales de compuestos de la invención incluyen, pero no están limitados a, las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, 2-hidroxietansulfonato, fosfato, hidrogenofosfato, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerolfosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, succinato, fumarato, maleato, ascorbato, isotionato, salicilato, metanosulfonato, mesitilenosulfonato, naftilenosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, 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 se pueden cuaternizar 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. A la luz de lo anterior, cualquier referencia a compuestos de la presente invención que aparezca en el presente documento se pretende que incluya los presentes compuestos multifuncionales, así como sales, hidratos o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

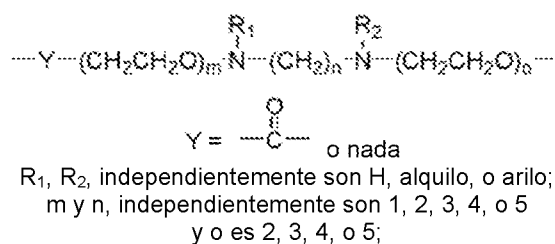
El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado farmacológicamente inactivo de una molécula de "fármaco" parental que requiere biotransformación (por ejemplo, o espontánea o enzimática) en el sistema fisiológico diana para liberar, o para convertir (por ejemplo,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

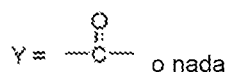
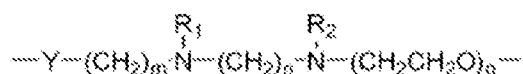
Los profármacos con frecuencia ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad con tejido, o liberación retrasada en el organismo mamífero. (Véase, por ejemplo, Bundgard, "Design of Prodrugs", pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Ámsterdam (1985); y Silverman, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", pp. 352-401, Academic Press, San Diego, Calif. (1992)). Los profármacos ejemplares comprenden una molécula de fármaco activo misma y un grupo enmascarador químico (por ejemplo, un grupo que suprime reversiblemente la actividad del fármaco). Algunos profármacos preferidos son variaciones o derivados de compuestos que tienen grupos cortables en condiciones metabólicas. Los profármacos ejemplares se vuelven farmacéuticamente activos *in vivo* o *in vitro* cuando experimentan solvolisis en condiciones fisiológicas o experimentan degradación enzimática u otra transformación bioquímica (por ejemplo, fosforilación, hidrogenación, deshidrogenación, glucosilación). Los profármacos comunes incluyen derivados de ácidos tal como ésteres preparados por reacción de ácidos parentales con un alcohol adecuado (por ejemplo, un alcohol inferior), amidas preparadas por reacción del compuesto ácido parental con una amina, o grupos básicos hechos reaccionar para formar un derivado base acilado (por ejemplo, una alquilamida inferior).

Los inhibidores adicionales de PI3K que se pueden unir a un inhibidor de MEK y/o inhibidor de mTOR incluyen

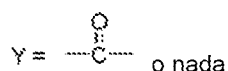
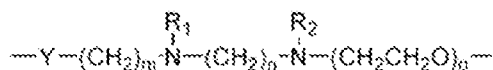
C ₅₀ (nM)					
Compuesto	Estructura	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
ST-177		292 ± 31	2117 ± 444	771 ± 63	291 ± 32
ST-5-02		248 ± 24	2900 ± 375	681 ± 90	135 ± 19
ST-187		9.9 ± 1.2	71 ± 8	54 ± 1	8.1 ± 1.7
ST-178		20 ± 3	208 ± 15	64 ± 5	17 ± 1
ZSTK474		5.0 ± 0.8	15.2 ± 1.4	20.8 ± 0.6	3.9 ± 0.6
ST-5-03		8.2 ± 0.7	14.3 ± 2.5	21 ± 1	2.9 ± 0.5
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

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



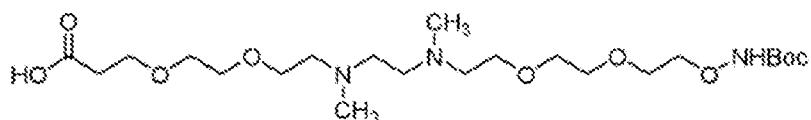


R₁, R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo;
m y n, independientemente son 1, 2, 3, 4, o 5
y o es 2, 3, 4, o 5.

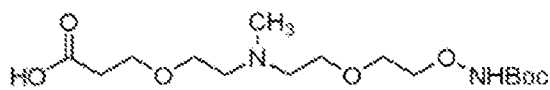


R₁, R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo;
m y n, independientemente son 1, 2, 3, 4, o 5
y o es 2, 3, 4, o 5.

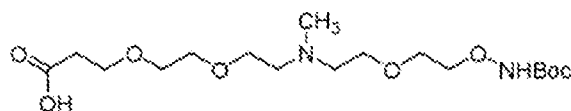
En formas de realización preferidas adicionales, un enlazador adecuado para la preparación de una sal es



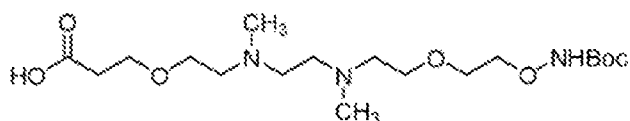
Ácido t-Boc-aminoxil-PEG2-N',N''-dimetiletano-1,2-diamina-PEG2 (ST-179)



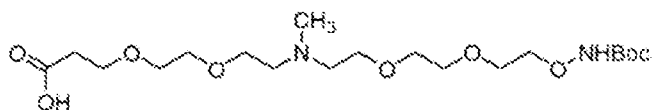
Ácido t-Boc-aminoxil-PEG1-N-metilamina-PEG1 (ST-5-09)



Ácido t-Boc-aminoxil-PEG1-N-metilamina-PEG2 (ST-5-10)

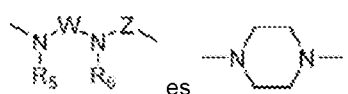


Ácido t-Boc-aminoxil-PEG1-N',N''-dimetiletano-1,2-diamina-PEG1 (ST-188)



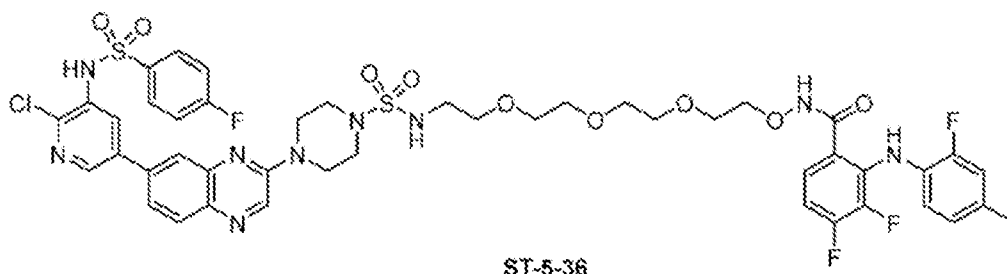
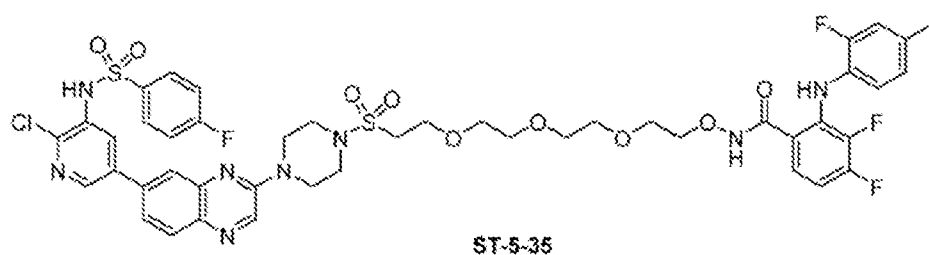
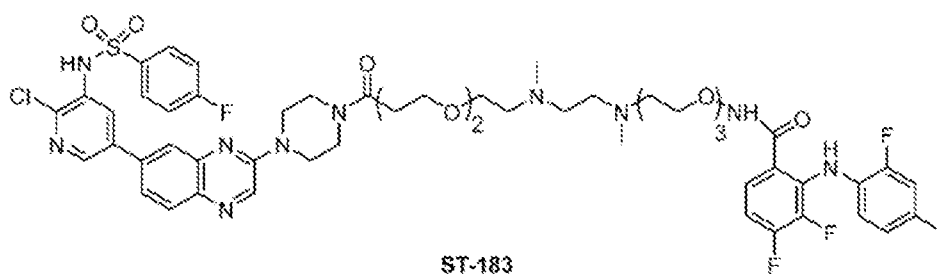
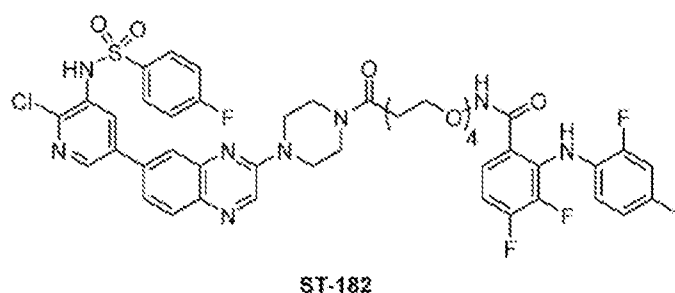
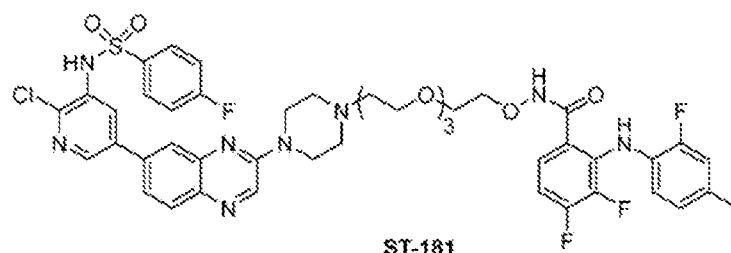
Ácido t-Boc-aminoxil-PEG2-N-metilamina-PEG2 (ST-5-11)

En una forma de realización del compuesto (e), el enlazador



Para aumentar aún más la biodisponibilidad del fármaco, el enlazador puede ser 2-[2,3-bis(2-hidroxietoxi)propoxi]etanol, un enlazador terciario, o pentaeritritol, un enlazador cuaternario, para enlazar inhibidores de MEK, PI3K y mTOR a través de enlaces éster.

Los compuestos específicos de la presente invención capaces de inhibir mTOR, PI3K, y MEK incluyen, pero no están limitados a, compuestos que tienen las estructuras mostradas a continuación.



5

10

15

La presente invención incluye (a) el desarrollo de inhibidores individuales de mTOR, PI3K, y MEK que están químicamente modificados con enlazadores de conjugación para mantener alta afinidad de unión hacia sus dianas enzimáticas respectivas; y (b) la conjugación de estas entidades químicas en una etapa sintética final para proporcionar compuestos inhibidores multifuncionales de entidad química única prototipo de ST-181 a ST-183. Esta estrategia también se podría usar para unir inhibidores de MEK alternativos tal como Trametinib, Selumetinib, Pimersertib, SMK-17, por ejemplo. Otros inhibidores de MEK se divulgan 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 alternativos de PI3K incluyen, por ejemplo, GDC 0941, GDC 0980, BKM-120, BEZ235, PIK-90 y duvelisib.

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

La presente invención por tanto proporciona inhibidores multifuncionales de mTOR y/o MEK y/o PI3K, como se ejemplifica por los presentes compuestos, para uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones en donde la inhibición de mTOR, MEK, y PI3K tiene un efecto beneficioso. Se prevé que un compuesto multifuncional presente muestre una mayor actividad contra tumores mutantes de KRAS que la monoterapia de inhibidores de mTor, MEK, o PI3K.

Los presentes compuestos se pueden administrar como el compuesto puro o como una composición farmacéutica. La administración de una composición farmacéutica, o el presente compuesto multifuncional puro, se puede realizar durante o después del inicio de la enfermedad o afección de interés. Típicamente, las composiciones farmacéuticas son estériles, y no contienen compuestos tóxicos, carcinógenos o mutagénicos que producirían una reacción adversa cuando se administran.

En muchas formas de realización, un compuesto multifuncional presente se administra 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 compuesto multifuncional presente y el segundo agente terapéutico se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente para alcanzar el efecto deseado. Además, el presente compuesto multifuncional y el segundo agente terapéutico se pueden administrar 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 dosis eficaz para cada segundo agente terapéutico es conocido en la técnica, y el segundo agente terapéutico se administra a un individuo en necesidad del mismo en tales intervalos establecidos.

Un compuesto multifuncional presente y el segundo agente terapéutico se pueden administrar juntos como una dosis unitaria individual o por separado como dosis unitarias múltiples, en donde el presente compuesto multifuncional se administra antes del segundo agente terapéutico o viceversa. Se pueden administrar una o más dosis del presente compuesto multifuncional y/o una o más dosis del segundo agente terapéutico. Los presentes compuestos multifuncionales, por tanto, se pueden usar junto con uno o más segundos agentes terapéuticos, por ejemplo, pero no limitado a, agentes anticancerosos.

Las enfermedades y afecciones que se pueden tratar según la invención incluyen, por ejemplo, cánceres. Se puede tratar una variedad de cánceres incluyendo, pero no limitado a: carcinomas, incluyendo vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico y no microcítico y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, aparato 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 linfocítico, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkett, tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide, y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (RCC), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mielóide y linfoblástica, neuroblastoma, y glioblastoma.

Las formas adicionales de cáncer tratable por los inhibidores duales de MEK/PI3K de la presente invención incluyen, por ejemplo, oncología de adultos y pediátrica, crecimiento de tumores/neoplasias malignas sólidas, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas de tejidos blandos humanos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, en particular de la cabeza y el cuello, carcinoma de células escamosas esofágico, carcinoma oral, neoplasias malignas de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, y leucemia de células pilosas, linfomas de efusión (linfomas basados en cavidades del cuerpo), linfoma tímico cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma microcítico, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres no microcíticos, cáncer de mama, incluyendo carcinoma microcítico 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, tal como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células de transición invasivas de la vejiga, y cáncer de vejiga invasor de músculo), cáncer de próstata, neoplasias malignas del aparato

genital femenino (incluyendo carcinoma ovárico, neoplasias epiteliales peritoneales primarias, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), neoplasias malignas del aparato 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 de hueso (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, evolución tumoral de queratinocitos de piel humana, y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, efusión peritoneal, efusión pleural maligna, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de la vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, neoplasia maligna mieloide incluyendo leucemia mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mieloide crónica (LMC), y sarcoma de Kaposi.

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

La ruta de administración también puede ser por inyección intraocular directa de los compuestos para tratamientos de tumores del ojo, por ejemplo, incluyendo melanoma uveal y retinoblastoma. Los presentes inhibidores multifuncionales también se pueden administrar por vía tópica, oral, intravenosa o por implante intraocular, para mejorar la biodisponibilidad de fármaco ocular. Como las rutas de señalización celular pueden tener "intercomunicación" significativa y por tanto muchas interacciones moleculares diferentes con otras rutas biológicas, dirigirse a las rutas PI3K/Akt/mTOR y Raf/MEK/ERK puede ser beneficioso para las enfermedades oculares, incluyendo glaucoma, cataratas, degeneración macular senil, ambliopía, y retinopatía diabética.

Enfermedades y afecciones adicionales, incluyendo cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades intestinales inflamatorias, vasculitis, síndrome de Behcet, psoriasis, dermatosis inflamatorias, asma, enfermedades alérgicas respiratorias, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto, 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 causado por daño a o malfuncionamiento de los nervios mismos), y dolor nociceptivo (los nociceptores son receptores en el sistema nervioso que se activan durante lesión) y dolor crónico asociado con diagnóstico clínico como, por ejemplo, fibromialgia, inflamación, malfuncionamiento musculoesquelético que se puede tratar por administración de un inhibidor de mTOR y/o MEK y/o PI3K presente se divulgan en la publicación de patente en EE UU No. 2011/0053907; patente en EE UU No. 7.897.792; publicación de patente en EE UU No. 2011/0009405; y publicación de patente en EE UU No. 2010/0249099.

Un presente compuesto multifuncional se puede administrar por cualquier ruta adecuada, por ejemplo, por administración oral, yugal, inhalación, sublingual, rectal, vaginal, intracisternal o intratecal mediante punción lumbar, transuretral, nasal, percutánea, es decir, transdérmica, o parenteral (incluyendo inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracoronaria, intradérmica, intramamaria, intraperitoneal, intraarticular, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular). La administración parenteral se puede lograr usando una aguja y una jeringa o usando una técnica de alta presión.

Las composiciones farmacéuticas incluyen esas en donde un presente compuesto multifuncional se administra en una cantidad eficaz para alcanzar su fin pretendido. La formulación exacta, ruta de administración, y dosis las determina un médico individual en vista de la afección o enfermedad diagnosticada. La cantidad e intervalo de dosis se pueden ajustar 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 se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la dosis tolerada máxima (DTM) de un compuesto, que se define como la mayor dosis que no produce toxicidad en animales. La proporción de dosis entre la dosis tolerada máxima y los efectos terapéuticos (por ejemplo, inhibición de crecimiento tumoral) es el índice terapéutico. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma posológica empleada, y la ruta de administración utilizada. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un presente compuesto multifuncional requerida para uso en terapia varía con la naturaleza de la afección que se trata, la longitud de tiempo que la actividad se desea, y la edad y el estado del paciente, y finalmente la determina el médico. Las cantidades e intervalos de dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del inhibidor multifuncional que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados. La dosis deseada convenientemente se puede administrar en una única dosis, o como dosis múltiples administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como una, dos, tres, cuatro o más subdosis al día. Con frecuencia las dosis múltiples se desean, o requieren. Por ejemplo, un presente inhibidor multifuncional se puede administrar a una frecuencia de: cuatro dosis administradas como una dosis al día en intervalos de cuatro días (q4d x

4); cuatro dosis administradas como una dosis al día en intervalos de tres días (q3d x 4); una dosis administrada al día en 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 pauta de dosis determinada que es apropiada por las circunstancias.

Un presente compuesto multifuncional se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 500 miligramos por dosis, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 250 miligramos por dosis, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 miligramos por dosis. Por ejemplo, un presente compuesto multifuncional se puede administrar, 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 dosis de una composición que contiene un presente inhibidor multifuncional, o una composición que contiene el mismo, puede ser desde aproximadamente 1 ng/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. La dosis de una composición puede estar en cualquier dosis incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 1 µg/kg. La dosis de una composición puede estar en cualquier dosis incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 1 µg/kg, 10 µg/kg, 25 µg/kg, 50 µg/kg, 75 µg/kg, 100 µg/kg, 125 µg/kg, 150 µg/kg, 175 µg/kg, 200 µg/kg, 225 µg/kg, 250 µg/kg, 275 µg/kg, 300 µg/kg, 325 µg/kg, 350 µg/kg, 375 µg/kg, 400 µg/kg, 425 µg/kg, 450 µg/kg, 475 µg/kg, 500 µg/kg, 525 µg/kg, 550 µg/kg, 575 µg/kg, 600 µg/kg, 625 µg/kg, 650 µg/kg, 675 µg/kg, 700 µg/kg, 725 µg/kg, 750 µg/kg, 775 µg/kg, 800 µg/kg, 825 µg/kg, 850 µg/kg, 875 µg/kg, 900 µg/kg, 925 µg/kg, 950 µg/kg, 975 µg/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 200 mg/kg. Las dosis anteriores son ejemplares del caso medio, pero puede haber casos individuales en los que se justifiquen dosis mayores o menores, y tales están dentro del ámbito de esta invención. En la práctica, el médico determina la pauta de dosis real que es más adecuada para un paciente individual, que puede variar con la edad, peso, y respuesta del paciente particular.

En el tratamiento de un cáncer, un presente compuesto multifuncional se puede administrar con un agente quimioterapéutico y/o radiación.

Formas de realización de la presente invención emplean radiación electromagnética de: radiación gamma (de 10^{-20} a 10^{-13} m), 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 contra el cáncer actualmente emplean radiosensibilizadores activados por radiación electromagnética, por ejemplo, rayos X. Los ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos X incluyen, pero no están limitados a, metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiaurea, cis-platino, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de cánceres emplea luz visible como el activador de radiación del agente sensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no están limitados a: derivados de hematoporfirina, PHOTOFRIN®, derivados de benzoporfirina, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feorbordio-a, bacterioclorofila a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de cinc, y análogos y derivados terapéuticamente eficaces de los mismos.

Los radiosensibilizadores se puede administrar junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos además de un presente inhibidor multifuncional, tales compuestos incluyen, pero no están limitados a compuestos que fomentan 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 quimioterapéuticos que actúan sobre el tumor con o sin radiación adicional, u otros compuestos terapéuticamente eficaces para tratar cáncer u otra enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar junto con radiosensibilizadores incluyen, pero no están limitados 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, hidralacina, y L-BSO.

El agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente o compuesto farmacológico que induce apoptosis. El agente o compuesto farmacológico puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, o anticuerpo. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar incluyen, pero no están limitados 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 se puede administrar con antibióticos, tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclinas, mostazas de nitrógeno, tal como ciclofosfamida, análogos de pirimidina, tal como 5-fluorouracilo, cis-platino, hidroxiaurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, tal como adenocarcinoma de la mama, donde los tumores incluyen células dependientes

de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto se puede administrar junto con leuprolida o goserelina (análogos peptídicos 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 denominado en el presente documento como "modalidades antineoplásicas adyuvantes". Los agentes quimioterapéuticos adicionales útiles en la invención incluyen hormonas y antagonistas de las mismas, radioisótopos, anticuerpos, productos naturales, y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos útiles en la presente invención se enumeran en la siguiente tabla.

Tabla 1

<u>Agentes alquilantes</u>	<u>Productos naturales</u>
<u>Mostazas de nitrógeno</u>	<u>Fármacos antimitóticos</u>
mecloretamina	<u>Taxanos</u>
ciclofosfamida	paclitaxel
ifosfamida	alcaloides de la vinca
melfalán	vinblastina (VLB)
clormabucilo	vincristina
mostaza de uracilo	vinorelbina
temozolomida	vindesina
<u>Nitrosoureas</u>	Taxotere® (docetaxel)
carmustina (BCNU)	estramustina
lomustina (CCNU)	fosfato de estramustina
semustina (metil-CCNU)	<u>Epipodofilotoxinas</u>
clormetina	etopósido
estreptozocina	tenipósido
<u>Etilenimina/metil-melamina</u>	<u>Antibióticos</u>
trietilnmetilamina (TEM)	actinomicina D
trietilnifosforamida (tiotepa)	daunomicina (rubidomicina)
hexametilmelamina (HMM, altretamina)	doxorubicina (adriamicina)
<u>Alquilsulfonatos</u>	mitoxantroneidarrubicina
busulfán	bleomicina
pipobroman	esplicamicina (mitramicina)
<u>Triacinas</u>	mitomicina-C
decarbacia (DTIC)	dactinomicina
<u>Antimetabolitos</u>	afidocolina
<u>Análogos de ácido fólico</u>	epirubicina
metotrexato	idarrubicina
trimetrexato	daunorrubicina
pemetrexed (antifolato multidirigido)	mitramicina
<u>Análogos de pirimidina</u>	desoxi co-formicina
5-fluorouracilo	<u>Enzimas</u>
fluorodesoxiuridina	L-asparaginasa
gemcitabina	L-arginasa
citosina arabinósido (AraC, citabarina)	<u>Radiosensibilizadores</u>
5-azacitidina	metronidazol
2,2'-difluorodesoxi-citidina	misonidazol
floxuridina	desmetilmisonidazol
pentostanina	pimonidazol
<u>Análogos de purina</u>	etanidazol
6-mercaptapurina	nimorazol
6-tioguanina	RSU 1069
azatioprina	EO9
2'-desoxicoformicina (pentostatina)	RB 6145
eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)	<u>Antiandrógenos no esteroideos</u>
fosfato de fludarabina	SR4233
2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)	flutamida
<u>Inhibidores de topoisomerasa de tipo I</u>	nicotinamida
	5-bromodesoxiuridina
	5-yododesoxiuridina
	bromodesoxicitidina

camptotecina
topotecano
irinotecano

Modificadores de respuestas biológicas

G-CSF
GM-CSF

Agentes de diferenciación
derivados de ácido retinoico

Hormonas y antagonistas
Adrenocorticosteroides/antagonistas
prednisona y equivalentes
dexametasona
ainoglutetimida

Progestinas
caproato de hidroxiprogesterona
acetato de medroxiprogesterona
acetato de megestrol

Estrógenos
dietilestilbestrol
etinil estradiol/ equivalentes

Antiestrógeno
tamoxifeno

Andrógenos
propionato de testosterona
fluoximesterona/equivalentes

Antiandrógenos
flutamida
análogos de la hormona liberadora de gonadotropina
leuprolida

Agentes misceláneos

Complejos de coordinación de platino
cisplatino
carboplatino
oxaliplatino
antracenediona
mitoxantrona

Urea sustituida
hidroxiurea

Derivados de metilhidracina
N-metilhidracina (MIH)
procarbina

Supresores adrenocorticales
mitotano (o,p'-DDD)
ainoglutetimida

Citoquinas
interferón (α , β , γ)
interleuquina-2

Fotosensibilizadores
derivados de hematoporfirina
PHOTOFRIN®
derivados de benzoporfirina
Npe6
etioporfirina de estaño (SnET2)
feoborbido-a
bacterioclorofila a
naftalocianinas
ftalocianinas
ftalocianinas de cinc

Radiación
rayos X
luz ultravioleta
radiación gamma
luz visible
radiación infrarroja
radiación de microondas

- Los agentes que afectan a microtúbulos interfieren con la mitosis celular y se conocen bien en la técnica por su actividad citotóxica. Los agentes que afectan microtúbulos útiles en la invención incluyen, pero no están limitados 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), derivados de TAXOL® (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritil cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas incluyendo, pero no limitado a, epotilona A, eoptilona B, y discodermolida (véase Service, (1996) *Science*, 274:2009) estramustina, nocodazol, MAP4, y similares. Los ejemplos de tales agentes también se describen 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.
- Los agentes citostáticos que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17- α -etinilestadiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megesterolacetato, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, zoladex.
- Otros agentes citostáticos son antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas de matriz, y otros inhibidores de VEGF, tal como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU668. También se pueden utilizar anticuerpos anti-Her2. Un inhibidor de EGFR es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También están incluidos el anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR e inhibidores de Src.

También adecuado para uso como un agente citostático es CASODEX® (bicalutamida, Astra Zeneca) que hace los carcinomas dependientes de andrógenos no proliferativos. Aun otro ejemplo de un agente citostático es el antiestrógeno TAMOXIFEN® que inhibe la proliferación o crecimiento de cáncer de mama dependiente de estrógenos.

5 Los 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 la quinasa Src, e inhibidores de PDGF.

10 Los compuestos también podrían administrarse en combinación con opioides o cannabinoides, AINE, esteroides para alivio de dolor crónico. Los segundos agentes terapéuticos adicionales que se pueden administrar con un presente inhibidor multifuncional de la presente invención se conocen bien en la técnica, por ejemplo, como se divulgan en la publicación de patente en EE UU 2011/0053907; y la publicación de patente en EE UU 2011/0009405; y la publicación de patente en EE UU 2010/0249099.

15 Los compuestos de la presente invención típicamente se administran en mezcla con un soporte farmacéutico seleccionado con respecto a la ruta pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se formulan de una manera convencional usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los presentes compuestos multifuncionales.

20 Estas composiciones farmacéuticas se pueden fabricar, por ejemplo, por procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, formación de grajeas, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida. Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto multifuncional se administra por vía oral, la composición típicamente está en forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición además puede

25 contener un soporte sólido, tal como gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula, y polvo contienen de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 95%, y preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 50%, de un presente compuestos multifuncional. Cuando se administra en forma líquida, se puede añadir un soporte líquido, tal como agua, vaselina, o aceites de origen animal o vegetal. La forma líquida de la

30 composición puede además contener solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos, o glicoles. Cuando se administra en forma líquida, la composición contiene de aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 90%, y preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 50%, en peso, de un presente compuesto multifuncional.

35 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del presente compuesto multifuncional se administra por inyección intravenosa, cutánea, o subcutánea, la composición está en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógenos. La preparación de tales soluciones parenteralmente aceptables, teniendo debidamente en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, está dentro de las capacidades de la técnica. Una composición preferida para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea típicamente contiene un vehículo isotónico.

40 Los presentes compuestos multifuncionales se pueden combinar fácilmente con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales soportes permiten que los agentes activos se formulen como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener añadiendo

45 un presente inhibidor multifuncional a un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grajeas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, rellenos y preparaciones de celulosa. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes.

50 Un presente inhibidor multifuncional se puede formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma posológica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

55 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas del principio activo en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de un presente inhibidor multifuncional como suspensiones de inyección oleaginosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos o ésteres de ácidos grasos sintéticos. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias

60 que aumentan la viscosidad de la suspensión. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes solubles o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos y permiten la preparación de soluciones muy concentradas. Alternativamente, una composición presente puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos estéril, antes del uso.

65 Un presente inhibidor multifuncional también se puede formular en composiciones rectales, tal como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales. Además de las formulaciones

descritas previamente, el presente inhibidor multifuncional también se puede formular como una preparación en depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los presentes inhibidores multifuncionales se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico.

En particular, los presentes inhibidores multifuncionales se pueden administrar por vía oral, yugal, o sublingual en forma de comprimidos que contienen excipientes, tal como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, ya sea solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar con aditivos farmacéuticamente aceptables, tal como agentes de suspensión. Los presentes compuestos multifuncionales también se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, o intracoronaria. Para la administración parenteral, los inhibidores multifuncionales se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o monosacáridos, tal como manitol o glucosa, para hacer la solución isotónica con la sangre. Los compuestos también se podrían administrar usando un inhalador como un spray para alcanzar el tejido del pulmón o por administración como un spray nasal.

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

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

Los inhibidores de mTOR, MEK y PI3K anteriores poseían propiedades que impedían su desarrollo como agentes terapéuticos. Según una característica importante de la invención, los presentes compuestos multifuncionales se sintetizaron y evaluaron como inhibidores duales 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 usando un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K, y un inhibidor de mTOR.

Síntesis de compuestos

Los presentes compuestos son un resultado de conjugar, o ligar, 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 indica que, aunque se ejemplifican varios compuestos a continuación, solo los mencionados en las reivindicaciones adjuntas están abarcados por la invención.

Los inhibidores de MEK de tipo benzhidroxamato se sintetizan, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 2002/006213. Los inhibidores de MEK de tipo SMK-17 se sintetizan, por ejemplo, como se divulga en el documento WO 2004/083167. Los inhibidores de PI3K basados en triacina se sintetizan como se divulga en las publicaciones de patente en EE UU Nos. 2011/0053907, 2011/0009405, y 2010/0249099. Los inhibidores de mTOR se sintetizan como se divulga en AM Venketasan et al., *J. Med. Chem.* 53: 2636, 2010; N. Nishimur et al., *J. Med. Chem.* 54: 4735-51, 2011; y el documento WO 2008/032162.

Materiales y Métodos

Las síntesis químicas que implican reactivos y solventes sensibles al aire o la humedad se realizaron bajo una presión positiva de nitrógeno en material de vidrio secado en horno. Todos los otros reactivos químicos y solventes anhidros se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, y se usaron sin purificación adicional. Los intermedios de compuestos clave análogos de 1,3,5-triacina (2a, 2b) (7) y éster pentafluorofenílico del ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico (21) (compuesto 3) se sintetizaron como se ha descrito previamente. El 4-metilbencenosulfonato de 16,16-dimetil-15-oxo-3,6,9,12,14-pentaoxa-13-azaheptadecilo (tosilato de t-Boc-aminoxi PEG4) y cloruro de 4-clorobutano-1-sulfonilo se compraron de Broadpharm, San Diego, CA, y Enamine Ltd., Monmouth Jct., NJ, respectivamente. Todos los otros reactivos químicos y solventes anhidros se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, y se usaron sin purificación adicional.

La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice 60 (malla 230-400 ASTM) comprada de EMD Millipore, Billerica, MA. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó usando Uniplate (250 µm) de gel de sílice GF de Analtech. Las placas de TLC se visualizaron después de desarrollo con luz ultravioleta (UV) o por rociado con reactivo de ácido fosfomolibdico con posterior calentamiento. Los espectros de ¹H RMN se registraron en instrumentos Varian a 400 y 700 MHz, respectivamente, en CDCl₃ o CD₃OD como solvente con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) se describen en partes por millón (ppm) y en hercios (Hz), respectivamente. Los análisis espectrales de masa de alta resolución se realizaron usando o un espectrómetro

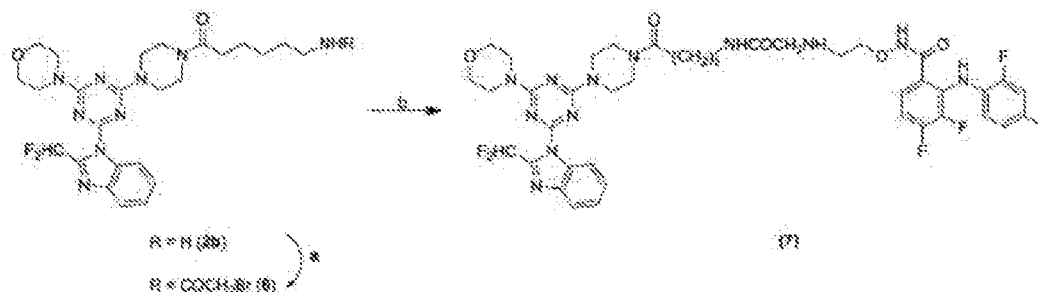
de masas VG-70-250-S para impacto electrónico (EI) y modos de ionización química (DCI), un instrumento Waters Autospec Ultima con una interfaz de electrospray para modo de ionización de electrospray (ESI) o un Waters Tofspec-2E corrido en modo reflectrón. Se realizó HPLC usando un sistema de HPLC Waters Breeze (Waters Corporation, Milford, MA) equipado con un detector de absorbancia de longitud de onda dual Waters 2487. El análisis de HPLC se realizó a temperatura ambiente en una columna Waters XSELECT CSH C-18, (4,6 mm × 250 mm), 5 µm de partícula, con mezclas de solventes de TFA al 0,1% en H₂O (A) y TFA al 0,1% en CH₃CN (B) a una velocidad de flujo de 1 ml/min con absorbancia de UV seguida a 254 y 280 nm. Las carreras de HPLC se realizaron usando un gradiente de solvente de 25 minutos de o bien de B al 30% a B al 90% (método I), de B al 60% a B al 90% (método II), o de B al 10% a B al 90% (método III). Se demostró que todos los compuestos biológicamente ensayados tenían >95% de pureza química por análisis de HPLC en gradiente de fase inversa.

Abreviaturas usadas

15	Akt	proteína quinasa B
	MEK	proteína quinasa activada por mitógenos alostérica
	PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
	mTor	diana de rapamicina de mamífero
	br s	señal ancha
	cLogP	logP calculado
20	CH ₃ CN	acetonitrilo
	DCM	diclorometano
	DMF	N,N-dimetilformamida
	DIEA	N,N-diisopropiletilamina
	DMSO	dimetilsulfóxido
25	Et ₃ N	trimetilamina
	HPBCD	(2-hidroxiopropil)-β-ciclodextrina
	MEK	metil etil cetona
	rt	temperatura ambiente
	TFA	ácido trifluoroacético
30	THF	tetrahidrofurano
	PdCl ₂ dppf	dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (II)
	HAc	ácido acético
	EDCI	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodimida
	HOBT	1-hidroxibenzotriazol
35	P(Ph) ₃	trifenilfosfina
	DEAD	azodicarboxilato de dietilo
	LHMDS	hexametildisilazida de litio
	TBAF	fluoruro de tetra-n-butilamonio
	PyBOP	(hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio)

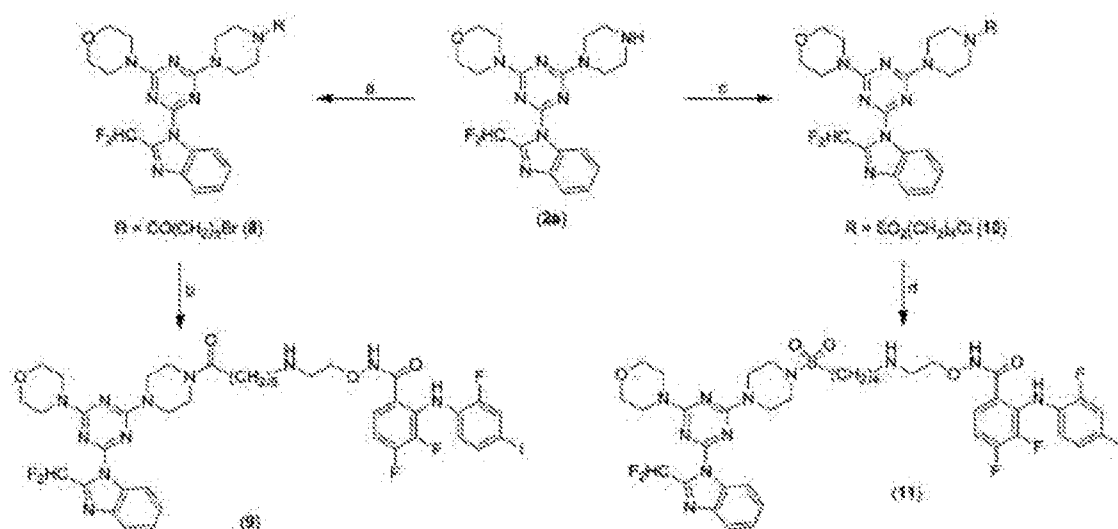
Los inhibidores de MEK y PI3K se pueden conjugar usando los enfoques no limitantes mostrados en el esquema 1 al esquema 4.

Esquema 1ª



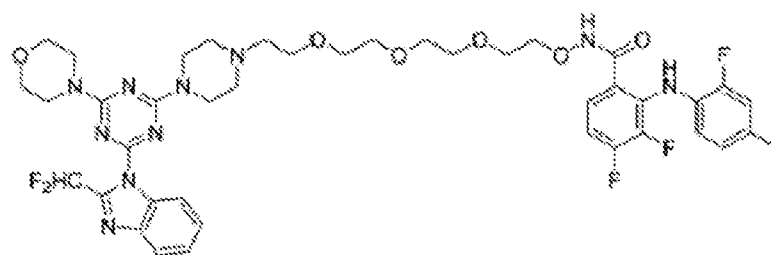
^aReactivos y condiciones: (a) BrCH₂COBr, Et₃N, CH₂Cl₂, de 0°C a rt, 3 h, 80%; (b) 5, NaI, K₂CO₃, DMF, rt, 4 h, 24%.

Esquema 2^a



^aReactivos y condiciones: (a) $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{COCl}$, K_2CO_3 , MEK, 0°C a rt, 3 h, 96%; (b) 5, NaI, K_2CO_3 , CH_3CN , reflujo, 4 h, 37%; (c) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_4\text{SO}_2\text{Cl}$, Et_3N , CH_2Cl_2 , de 0°C a rt, 18 h, 92%; (d) 5, NaI, K_2CO_3 , CH_3CN , reflujo, 18 h, 30%.

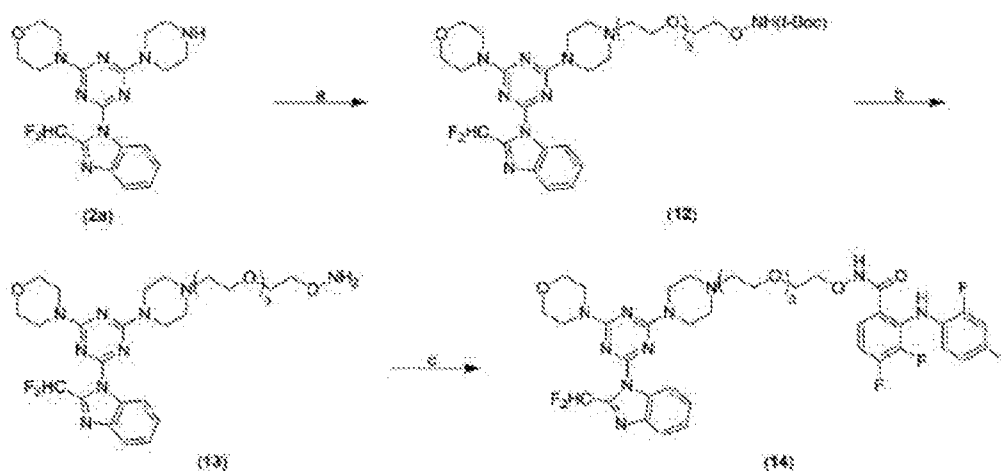
Esquema 3: Síntesis de 14 (ST-162)



14

IC_{50} MEK1: 0,015 nM

IC_{50} PI3K: 191 nM



^aReactivos y condiciones: (a) $\text{TosO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{NH}(\text{t-Boc})$, K_2CO_3 , tolueno, reflujo, 24 h, 71%; (b) TFA, CH_2Cl_2 , $0-5^\circ\text{C}$, 2 h, 82%; (c) 3, DIEA, DMF, rt, 18 h, 55%.

Química sintética. Los intermedios clave 2a, 2b y 3 (Figura 3) usados en la preparación de los compuestos inhibidores bifuncionales diana se sintetizaron como se ha descrito previamente (7, 21). El inhibidor de MEK1 5 se sintetizó por tratamiento de 3 con éster tert-butilico del ácido (2-aminoetil)carbámico²² en DMF en presencia de DIEA para dar el intermedio 4 seguido por corte catalizado por ácido trifluoroacético del grupo protector Boc (Figura 3). La síntesis del derivado inhibidor 7 se realizó como se muestra en el esquema 1. Inicialmente, 2b se trató con bromuro de

bromoacetilo en presencia de trietilamina para dar el correspondiente derivado 2-bromoacetamida 6 que se hizo reaccionar con 5 para dar el análogo inhibidor 7 en un rendimiento global del 18,5%. Los análogos inhibidores 9 y 11 se obtuvieron del intermedio común 1,3,5-triacina sustituida con piperacina 2a como se muestra en el esquema 2. La triacina 2a se trató inicialmente con cloruro de 6-bromohexanoilo en presencia de carbonato de potasio para dar el correspondiente análogo 6-bromohexanamida 8 que proporcionó el análogo inhibidor 9 en un rendimiento del 37% después de reacción con el inhibidor de MEK 5 en acetonitrilo a reflujo. El análogo inhibidor 11 se preparó a partir de 2a en un rendimiento global de 27,5% por un enfoque similar a través del intermedio 4-clorobutananosulfonamida 10. La preparación del inhibidor bifuncional ligado pegilado 14 (ST-162) se llevó a cabo como se muestra en el esquema 3. Inicialmente, el intermedio 1,3,5-triacina sustituida con piperacina 2a se calentó a reflujo con el derivado tosilato PEG4 aminoxiprotectado y carbonato de potasio en tolueno para dar el intermedio 12 seguido por eliminación catalizada por TFA del grupo Boc para dar el derivado aminoxi 13. La reacción posterior de 13 con el derivado éster activado 3 como se ha descrito previamente dio 14 en un rendimiento del 55%.

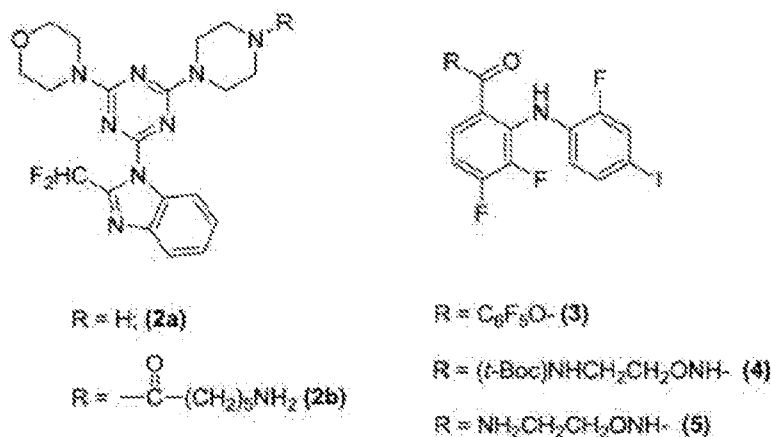


Figura 3. Intermedios clave usados en la síntesis de inhibidores bifuncionales de MEK/PI3K.

3,4-Difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-N-[2-tert-butoxicarbonilamino]etoxibenzamida (4)

Una solución de éster tert-butílico del ácido (2-aminoetil)carbámico²² (0,945 g, 5,36 mmol) en DMF (6 ml) se añadió en porciones a una solución de éster pentafluorofenílico del ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico²¹ (3) (3,0 g, 5,36 mmol) en DMF (6 ml) seguido por DIEA (1,38 g, 1,87 ml, 10,7 mmol) y se agitó a rt durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida, se diluyó con EtOAc (100 ml), y se extrajo con salmuera (2 × 50 ml), H₂O (50 ml), secó (MgSO₄) y concentró a presión reducida. El material crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de EtOAc del 30-55% en hexanos para proporcionar 2,77 g (94%) del compuesto del título 4 como una espuma blanca. ¹H RMN (CDCl₃): δ 10,31 (br s, 1H), 8,59 (br s, 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 (br s, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,43-3,39 (m, 2H), 1,45 (s, 9H). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₂₀H₂₂N₃F₃IO₄ [M + H⁺], 552,0602. Determinada: 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 solución fría (0-5°C) de 4 (2,77 g, 5,0 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) en una atmósfera de nitrógeno y se agitó a esta temperatura durante 3 h. Tras completar la reacción, la mezcla se diluyó con Et₂O (250 ml) y hielo picado (100 g). El pH de la solución acuosa se ajustó a pH 8 por la adición lenta de NaHCO₃ saturado acuoso y la fase orgánica se separó, secó (Na₂SO₄) y concentró a presión reducida. El producto crudo se sometió a cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 5-30% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 1,72 g (76%) del compuesto del título 5 como un sólido blanco. ¹H RMN (CD₃OD): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₁₅H₁₄N₃F₃IO₂ [M + H⁺], 452,0077. Determinada: 452,0079. HPLC (método I): t_R = 9,72 min.

2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(6-(N-bromoacetilamino)hexanoil)}piperacino]-1,3,5-triacin-2-il]-1H-bencimidazol (6). Una solución del análogo de 1,3,5-triacina 2b (0,265 g, 0,50 mmol) y Et₃N (0,102 g, 1,0 mmol) en CH₂Cl₂ (3 ml) se enfrió a 0°C usando un baño de hielo y se trató gota a gota en una atmósfera de nitrógeno con una solución de bromuro de bromoacetilo (0,122 g, 53 µl, 0,60 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml). El baño de hielo se retiró, y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta rt 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), NaHCO₃ saturado acuoso (50 ml), salmuera (2 × 50 ml), y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 2-8% en CH₂Cl₂ para dar 0,26 g (80%) del compuesto del título 6 como un sólido amorfo beis. ¹H RMN (CDCl₃): 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 (br s, 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₂₇H₃₅N₉BrF₂O₃ [M + H⁺], 650,2009. Determinada: 650,1985.

5 N-(2-((2-((4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacin-1-il)-6-oxohexil)amino)-2-oxoetil)amino)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)benzamida (compuesto 7). Una solución del análogo benzhidroxamato 5 (0,18 g, 0,40 mmol), K₂CO₃ 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 solución de 6 (0,26 g, 0,40 mmol) en DMF (2 ml) y se agitó a rt durante 18 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), la fase orgánica se lavó con salmuera (2 × 25 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 5-20% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,098 g (24%) del compuesto del título 7 como un sólido amorfo crema. ¹H RMN (CDCl₃ + 1 gota de CD₃OD): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₄₂H₄₇N₁₂F₅O₅ [M + H⁺], 1021,2752. Determinada: 1021,2754. HPLC (método I): t_R = 15,34 min (95,3% de pureza química).

20 2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(6-(bromohexanoil))piperacino}-1,3,5-triacin-2-il]-1H-bencimidazol (8). Una suspensión agitada del análogo de 1,3,5-triacina 2a (0,208 g, 0,5 mmol) y K₂CO₃ anhidro (0,208 g, 1,5 mmol) en metil etil cetona (3,5 ml) se enfrió a 0-5°C usando un baño de hielo y se trató gota a gota en una atmósfera de nitrógeno con una solución de cloruro de 6-bromohexanoilo (0,112 g, 81 µl, 0,525 mmol) en MEK (1,5 ml). El baño de hielo se retiró, y la mezcla de reacción se agitó a rt durante 3 h adicionales. El residuo obtenido después de concentración a presión reducida se repartió entre NaHCO₃ saturado acuoso (100 ml) y EtOAc (100 ml). La fase orgánica se retiró, lavó sucesivamente con salmuera (50 ml), H₂O (50 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de acetona al 3-10% en CH₂Cl₂ para dar 0,28 g (96%) del compuesto del título 8 como un aceite incoloro. ¹H RMN (CDCl₃): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₂₅H₃₂N₈BrF₂O₂ [M + H⁺], 593,1794. Determinada: 593,1795. HPLC (método I): t_R = 20,38 min.

30 N-(2-((6-(4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacin-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 benzhidroxamato 5 (0,24 g, 0,53 mmol), K₂CO₃ anhidro (0,042 g, 0,30 mmol) y NaI (0,045 g, 0,30 mmol) en CH₃CN (5 ml) se agitó a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se extrajo con salmuera (50 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 3-20% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,096 g (37%) del compuesto del título 9 como un polvo amorfo blanco. ¹H RMN (CDCl₃): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₄₀H₄₄N₁₁F₅O₄ [M + H⁺], 964,2537. Determinada: 964,2550. HPLC (método I): t_R = 15,71 min (96,7% de pureza química).

45 2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(4-clorobutano-1-sulfonil))piperacino}-1,3,5-triacin-2-il]-1H-bencimidazol (10). Una solución del análogo de 1,3,5-triacina 2a (0,208 g, 0,5 mmol) y Et₃N (0,061 g, 84 µl, 0,6 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) se enfrió a 0-5°C en una atmósfera de nitrógeno usando un baño de hielo. Una solución de cloruro de 4-clorobutano-1-sulfonilo (0,096 g, 70 µl, 0,5 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se añadió gota a gota, y el baño de hielo se retiró, y la mezcla de reacción se agitó a rt durante 18 horas. La mezcla de reacción se trató con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó sucesivamente con salmuera (2 × 50 ml), H₂O (50 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 1-5% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,264 g (92%) del compuesto del título 10 como una espuma blanca. ¹H RMN (CDCl₃): 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 (solapante m, 4H). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₂₃H₃₀N₈ClF₂O₃S [M + H⁺], 571,1812. Determinada: 571,1812.

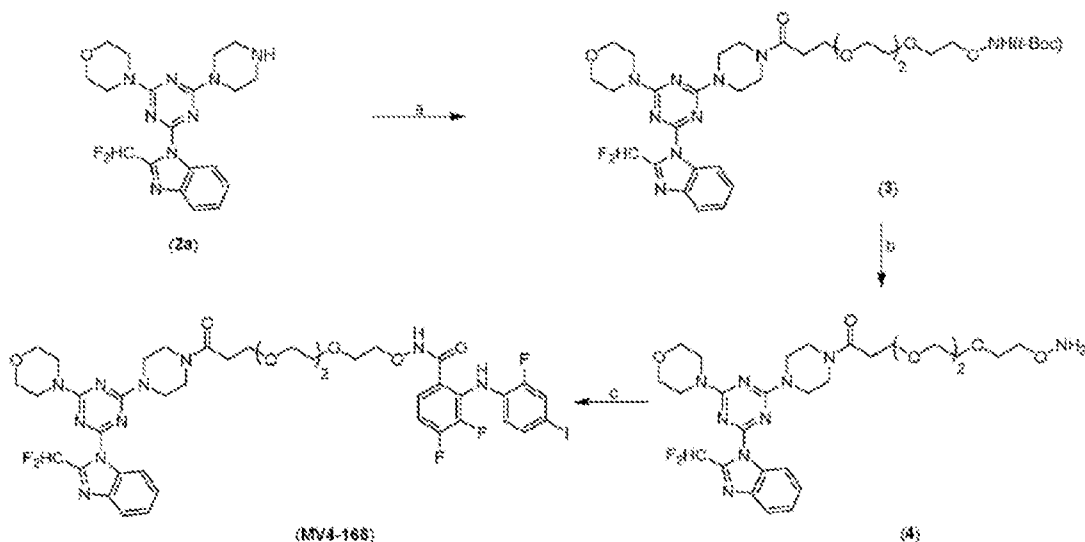
55 N-(2-((4-((4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacin-1-il)sulfonil)-butil)amino)etoxi)-3,4-difluoro-2-((2-fluoro-4-yodofenil)amino)benzamida (compuesto 11). Una mezcla del análogo 4-clorobutilsulfonamida 10 (0,156 g, 0,273 mmol), análogo benzhidroxamato 5 (0,248 g, 0,55 mmol), K₂CO₃ anhidro (0,042 g, 0,30 mmol) y NaI (0,045 g, 0,30 mmol) en CH₃CN (5 ml) se agitó a reflujo durante 18 h. La mezcla se diluyó con CHCl₃ (100 ml) se extrajo con salmuera (2 × 50 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 5-15% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,080 g (30%) del compuesto del título 11 como un polvo amorfo blanco. ¹H RMN (CDCl₃ + 1 gota de CD₃OD): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₃₈H₄₂N₁₁F₅O₅S [M + H⁺], 986,2050. Determinada: 986,2043. HPLC (método III): t_R = 20,09 min (97,9% de pureza química).

2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(2-(2-(2-(2-(tert-butilcarbonilaminoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil]-piperacino)-1,3,5-triacin-2-il]-1H-benzimidazol (12). Una mezcla del análogo de 1,3,5-triacina 2a (0,52 g, 1,25 mmol), tosilato de t-Boc-aminoxio PEG4 (0,58 g, 1,25 mmol), y K₂CO₃ anhidro (0,345 g, 2,5 mmol) en tolueno (8 ml) se agitó a reflujo durante 24 h. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml), se extrajo con salmuera (100 ml), H₂O (100 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 2-5% en CHCl₃ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,63 g (71%) del compuesto del título 12 como una goma viscosa amarilla pálida. ¹H RMN (CDCl₃): 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). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₃₂H₄₈N₉F₂O₇: 708,3639. Determinada: 708,3636. HPLC (método I): t_R = 9,76 min.

2-(Difluorometil)-1-[4-(4-morfolinil)-6-{4-(2-(2-(2-(2-aminoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil]piperacino)-1,3,5-triacin-2-il]-1H-benzimidazol (13). Una solución agitada de 12 (0,255 g, 0,36 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) se enfrió a 0°C con un baño de hielo y se trató gota a gota con una solución de TFA (2,5 ml) en CH₂Cl₂ (5 ml). La reacción se agitó a 0-5°C durante 2 h adicionales, después se trató con agua helada (100 ml), y el pH de la fase acuosa se ajustó a pH 8 con NaHCO₃ acuoso saturado. La mezcla se extrajo dos veces con EtOAc (100 ml) y el extracto orgánico se lavó sucesivamente con salmuera (100 ml), H₂O (100 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 2-4% en CH₂Cl₂ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,18 g (82%) del compuesto del título 13 como un aceite viscoso incoloro. ¹H RMN (CDCl₃): 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 (br s, 2H), 3,89-3,69 (m, 14H), 3,67 (m, 12 H), 2,66 (t, 2H, J = 5,5 Hz), 2,60 (m, 4H). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₂₇H₄₀N₉F₂O₅ [M + H⁺], 608,3115. Determinada: 608,3114. HPLC (método III): t_R = 10,75 min.

N-(2-(2-(2-(4-(4-(2-(Difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacino-1-il)etoxi)etoxi)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 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 rt durante 24 h. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml), se extrajo con salmuera (2 × 100 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 2-5% en CHCl₃ que contenía NH₄OH al 1% para dar 0,088 g (55%) del compuesto del título 14 como un sólido cristalino rosa pálido. ¹H RMN (CDCl₃ + 1 gota de CD₃OD): 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 (br s, 1H), 2,64 (t, 2H, J = 5,5 Hz), 2,59-2,52 (m, 4H). HRMS (ESI⁺): m/z calculada para C₄₀H₄₅N₁₀F₅O₆ [M + H⁺], 983,2483. Determinada: 983,2477. HPLC (método I): t_R = 14,56 min.

Esquema 4. Síntesis de MV4-168 (ST-168)



Reactivos y condiciones: (a) (t-Boc)NHO-(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOH, PyBoP, DIEA, THF:DCM, 4 h, 73%; (b) TFA, DCM, 0-5°C, 2 h, 82%; (c) DIEA, PyBop, THF:DCM, 18 h, 54%.

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

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

Los compuestos intermedios análogo de 1,3,5-triacina (2a) (2) y ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-benzoico (2) (3) se sintetizaron como se ha descrito previamente. El ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxa-5-azaoctadecan-18-oico (ácido t-Boc-aminoxio-PEG3) se compró de Broadpharm, San Diego, CA. Se demostró que todos

los compuestos biológicamente ensayados tenían >98% de pureza química por análisis de HPLC en gradiente de fase inversa.

2-(2-(2-(3-(4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacina-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etoxicarbamato de tert-butilo (3)

Una solución del análogo ácido t-Boc-aminoxi PEG3 (170 mg, 0,50 mmol) en 12 ml de THF:DCM (1:1) se trató con el análogo de 1,3,5-triacina 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 (rt) durante 4 h. El análisis de HPLC (método 1) y el análisis de TLC (placas de sílice de Analtech; DCM:CH₃OH:NH₄OH (95:5:1)) mostraron terminación 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), H₂O (25 ml) y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 1%-4% en DCM que contenía NH₄OH al 1% para dar 269 mg (73%) del compuesto del título 3 como un aceite viscoso. ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,72 (br s, 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). HRMS (ESI⁺): *m/z* calculada para C₃₃H₄₈N₉F₂O₈ [M + H⁺]: 736,3588. Determinada: 736,3588; calculada para [M + Na⁺]: 758,3408. Determinada: 758,3407. HPLC (método I): t_R = 15,8 min.

3-(2-(2-(2-(aminooxi)etoxi)etoxi)etoxi)-1-(4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacina-1-il)propan-1-ona (4)

Una solución agitada de 3 (0,184 g, 0,25 mmol) en DCM (4 ml) se enfrió a 0°C con un baño de hielo y se trató con una solución 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 NaHCO₃. La mezcla se extrajo dos veces con EtOAc (25 ml), y los extractos orgánicos se lavaron sucesivamente con salmuera y H₂O, después se secaron (Na₂SO₄). La concentración a presión reducida dio el producto 4 (130 mg; 82%) como un aceite amarillo pálido que se usó directamente en la siguiente etapa. ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,33 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,56 (t, 1H, J = 53,6 Hz), 7,47-7,39 (m, 2H), 3,52 (br s, 1H), 3,93-3,65 (m, 30H), 2,70 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 1,68 (br s, 2H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calculada para C₂₈H₄₀N₉F₂O₆ [M + H⁺]: 636,3064. Determinada: 636,3068 (100%); calculada para [M + Na⁺]: 658,2884. Determinada: 658,2885. HPLC (método I): t_R = 7,7 min.

N-(2-(2-(2-(3-(4-(4-(2-(difluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-morfolino-1,3,5-triacin-2-il)piperacina-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 DIEA (57 mg, 77 µl, 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 rt durante 18 h. El análisis de HPLC (método 1) y el análisis de TLC (sílice de Analtech; DCM:CH₃OH:NH₄OH; 95:5:1; R_f del producto ST-168 = 0,20) mostraron terminación 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, NaHCO₃ acuoso saturado, salmuera y secó (Na₂SO₄). El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice con un gradiente de CH₃OH al 1%-6% en DCM que contenía NH₄OH al 1% para dar 110 mg (54%) del compuesto del título como un sólido amorfo blanco. ¹H RMN (CDCl₃): δ 8,90 (br s, 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, 28H), 2,62 (m, 2H), 1,89 (br s, 2H). HRMS (ESI⁺): *m/z* calculada para C₄₁H₄₅N₁₀F₂O₇ [M + H⁺]: 1011,2432. Determinada: 1011,2431; calculada para [M + Na⁺]: 1033,2251. Determinada: 1033,2247 (100%). HPLC (método II): t_R = 17,7 min.

Método de análisis de HPLC I. El análisis de HPLC se realizó a temperatura ambiente en una columna Waters XSELECT CSH C-18, (4,6 × 250 mm), 5 µm de partícula, con mezclas de solventes de TFA al 0,1% en H₂O (A) y TFA al 0,1% en CH₃CN (B) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El análisis se realizó con un gradiente de solvente desde el 30% de B (inicial) al 90% de B durante un tiempo de carrera de 25 min siguiendo la absorbancia de UV a 254 y 280 nm.

Método de análisis de HPLC II. El análisis de HPLC se realizó como antes con un gradiente de solvente desde el 50% de B (inicial) al 90% de B durante un tiempo de carrera de 25 min.

Datos biológicos

Se describe la síntesis de una serie de inhibidores de MEK1/PI3K bifuncionales, de entidad única lograda por unión covalente de análogos estructurales del inhibidor de PI3K competitivo de ATP ZSTK474 y el inhibidor de MEK no competitivo de ATP PD0325901. Los inhibidores bifuncionales mostraron potente inhibición *in vitro* de MEK1 (0,015 < CI₅₀ (nM) < 500) y PI3K (54 < CI₅₀ (nM) < 341) en ensayos de inhibición enzimática. La inhibición concurrente de MEK1 y PI3K se demostró con el compuesto 14 en dos líneas celulares tumorales (A549, D54). Los inhibidores produjeron viabilidad celular disminuida dependiente de la dosis similar a la administración combinada de dosis equivalentes de ZSTK474 y PD0325901. La eficacia *in vivo* del compuesto 14 después de la administración oral se demostró en ratones portadores de glioma D54 y tumor de pulmón A549. El compuesto 14 mostró una inhibición del 95% y el 67% de fosforilación de ERK1/2 y Akt en tumor, respectivamente, a las 2 h tras la administración por análisis de

inmunotransferencia, confirmando la biodisponibilidad y eficacia de esta estrategia de inhibidor bifuncional hacia inhibición de MEK1/PI3K combinada.

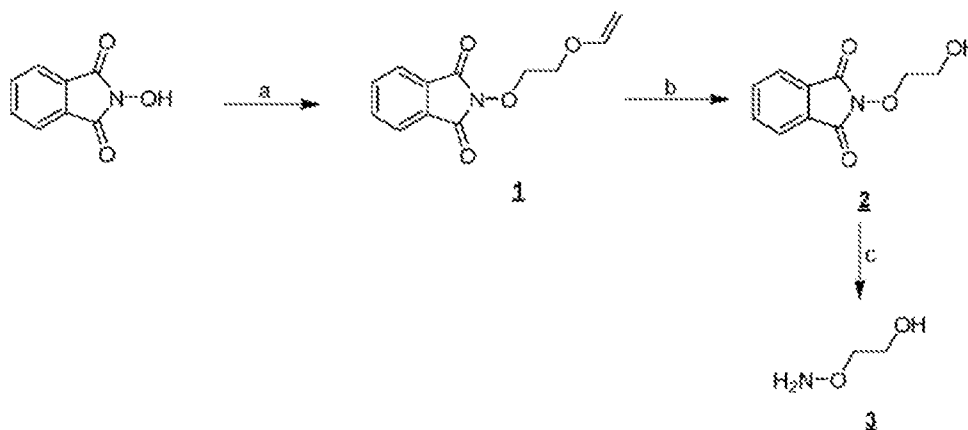
Acoplamiento virtual del compuesto 14 en los bolsillos de unión de MEK1 y PI3K. Se predice que ST-162 retenga muchas de las interacciones de unión mostradas por el potente inhibidor de MEK1 PD318088 con la región de unión alostérica de MEK1 incluyendo interacciones clave de ambos oxígenos hidroxamato con Lys97, el átomo de 4-flúor en el anillo A con los NH del esqueleto de Val211 y Ser212, y el anillo B que contiene yodo con el bolsillo hidrofóbico (Figura 4A). De forma similar, también se predice que ST-162 sirva como un inhibidor de PI3K, ya que retiene la interacción de puentes de hidrógeno del oxígeno del grupo morfolino con el grupo NH amida del esqueleto de valina (Val828) y la interacción de nitrógeno de imidazol con el grupo amino de la cadena lateral de Lys779 (Figura 4B).

Síntesis de análogo éster de ácido graso de PD0316684

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

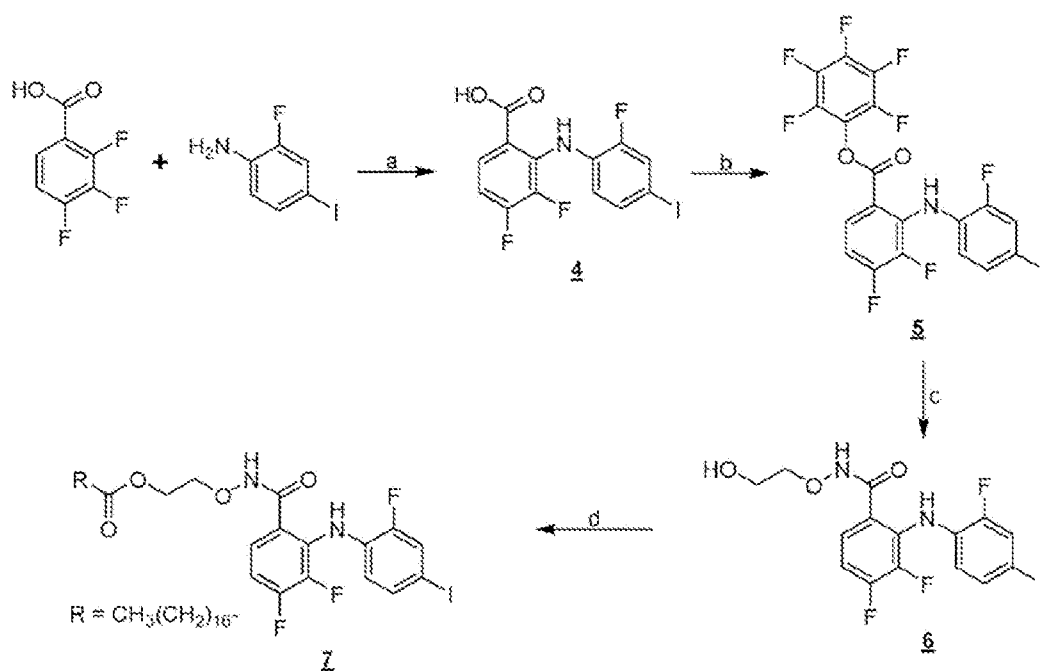
El compuesto intermedio 25 en los esquemas posteriores se sintetiza usando los procedimientos generales descritos en Venkatesan, AM. *et al. J. Med Chem.* 53, 2636-2645, 2010.

Etapa 1



Reactivos y condiciones: (a) éter vinílico de etilenglicol, $P(Ph)_3$, DEAD, THF, 0°C; (b) HCl 0,3 N, dioxano, rt; (c) $CH_3NH_2NH_2$, DCM.

Etapa 2

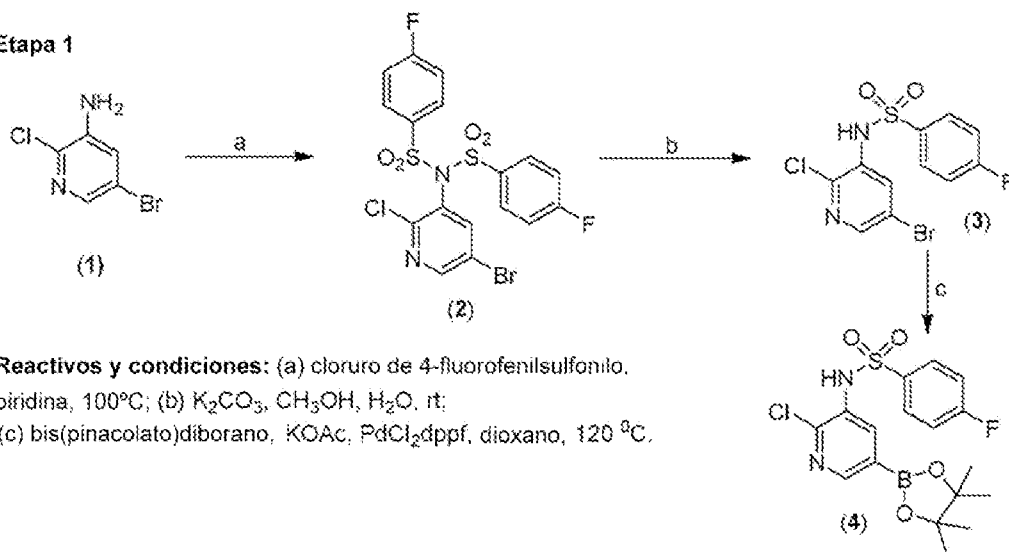


Reactivos y condiciones: (a) LHMDs, THF, -65°C ; (b) trifluoroacetato de pentafluorofenilo, piridina, DMF; (c) 3, DIEA, DMF, rt; (d) cloruro ácido, Et_3N , DMF.

5

Síntesis de ST-181

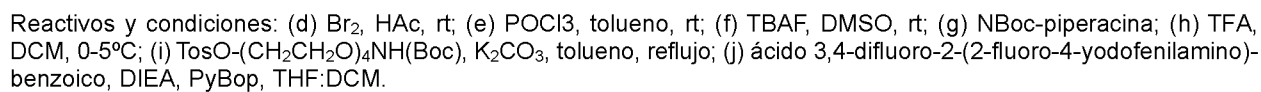
Etapa 1



Reactivos y condiciones: (a) cloruro de 4-fluorofenilsulfonilo, piridina, 100°C ; (b) K_2CO_3 , CH_3OH , H_2O , rt; (c) bis(pinacolato)diborano, KOAc, PdCl_2dppf , dioxano, 120°C .

Etapa 2

10

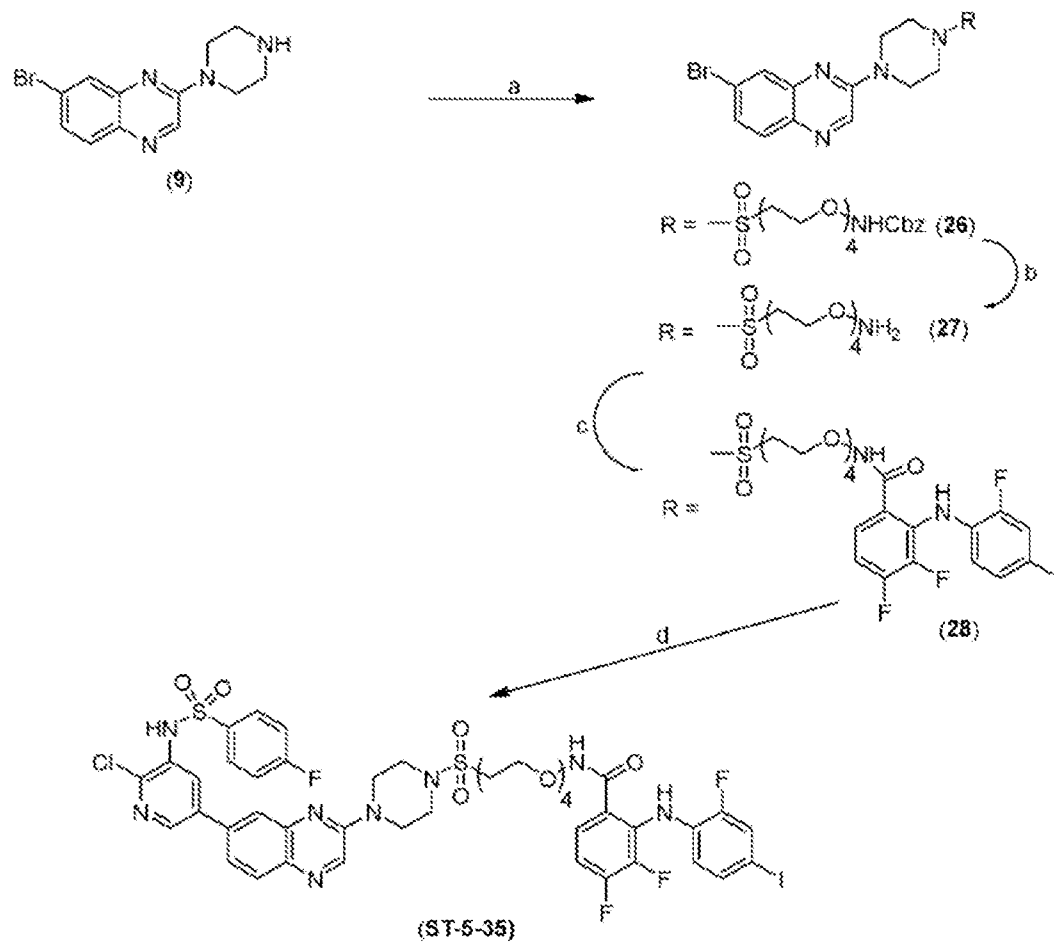


(4) + (12)

Reaction conditions:
 K_2CO_3
 PdCl_2dppf
 dioxano, H_2O
 $90 - 100^\circ\text{C}$

(ST-181)

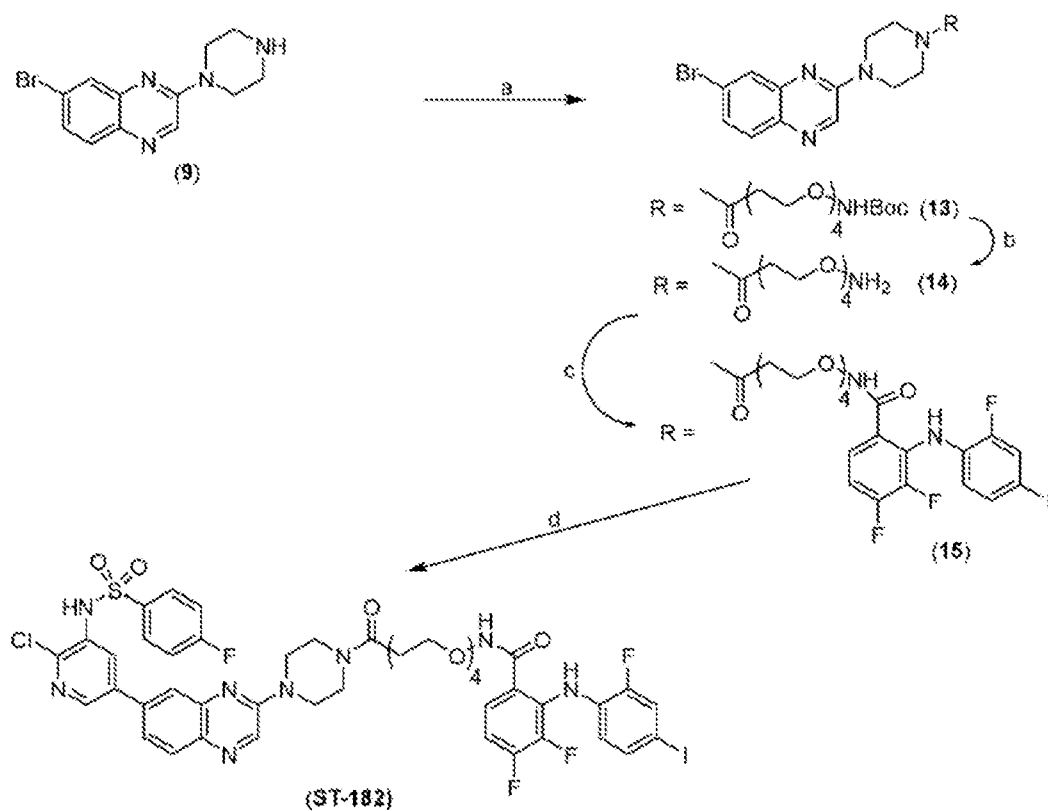
10



Reactivos y condiciones: (a) CbzNH(OCH₂CH₂)₄SO₂Cl, DIEA, DCM; (b) (CH₃)₃SiH, CH₃CN, 25°C; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl₂dppf, K₂CO₃, dioxano, H₂O, 90-100°C.

5

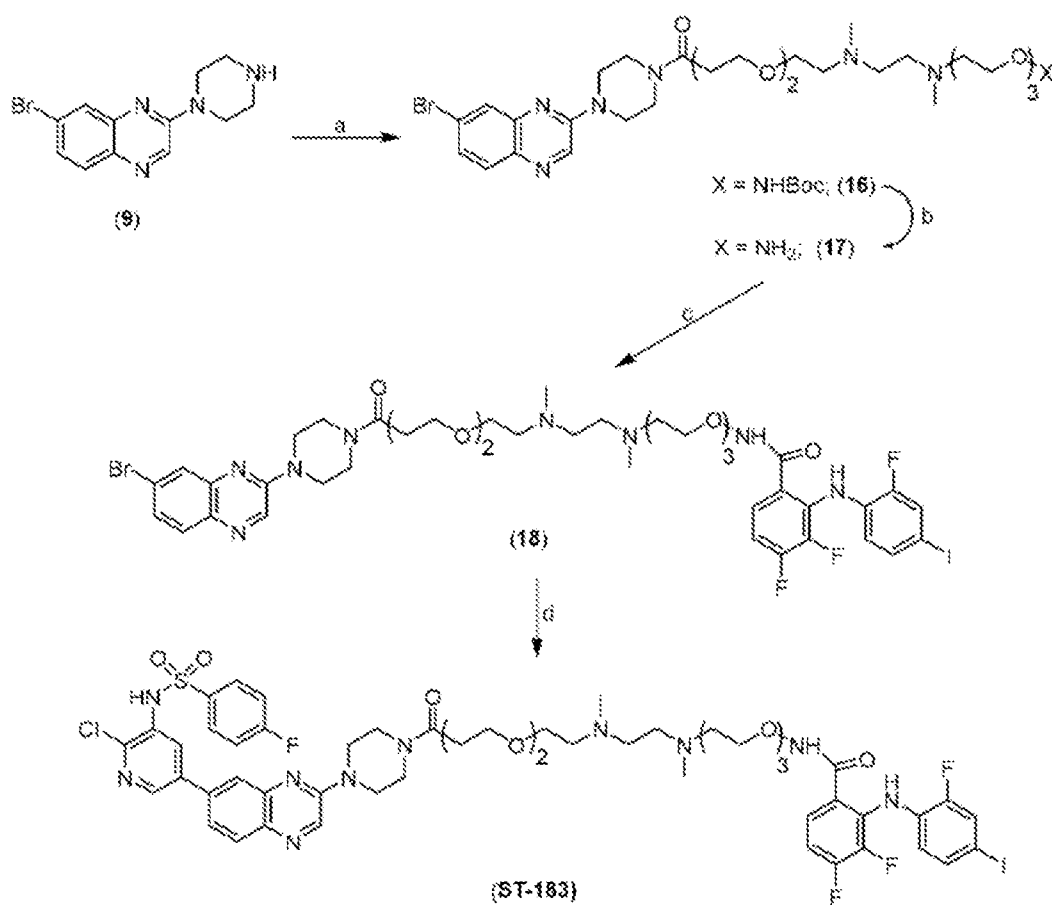
Síntesis de ST-182



Reactivos y condiciones: (a) BocNH(OCH₂CH₂)₄COOH, 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, PdCl₂dppf, K₂CO₃, dioxano, H₂O, 90-100°C.

5

Síntesis de ST-183

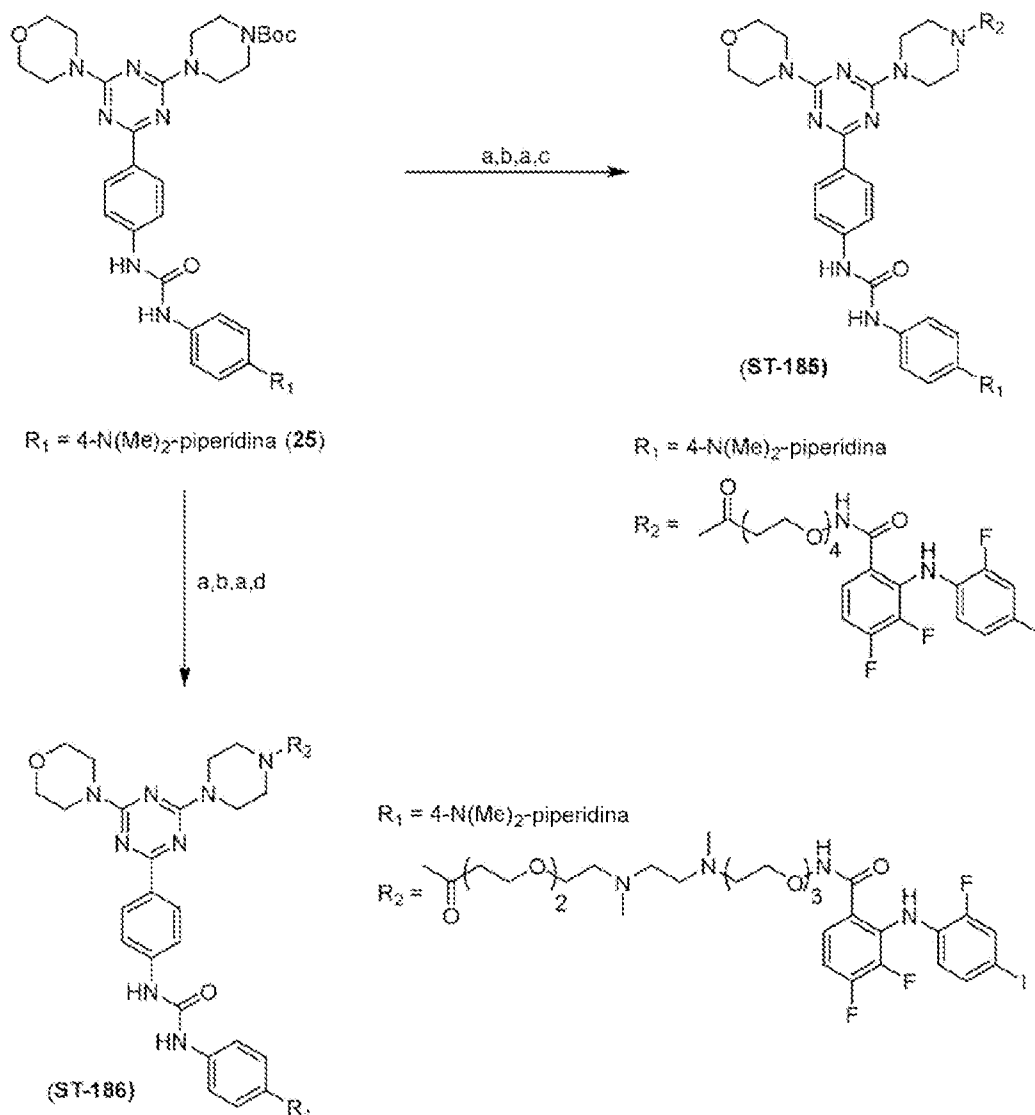


Reactivos y condiciones: (a) $\text{BocNH(OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N(CH}_3\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_3\text{)(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, PyBop, DIEA, THF:DCM; (b) TFA, DCM, 0-5°C; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) **4**, PdCl_2dppf , K_2CO_3 , dioxano, H_2O , 90-100°C.

Síntesis de ST-184



Síntesis de ST-185 y ST-186



Reactivos y condiciones: (a) TFA, DCM, 0-5°C; (b) BocNH(OCH₂CH₂)₄COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM; (c) ácido 3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzoico, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) BocNH(OCH₂CH₂)₃N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOH, PyBop, DIEA, THF:DCM.

Datos biológicos

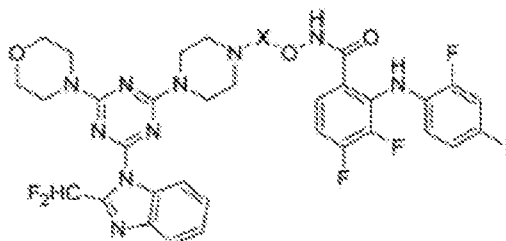
La figura 1 muestra las estructuras acopladas del compuesto 14 en el bolsillo alostérico de MEK1 y PI3Kα. La figura 1A muestra el modo de unión del compuesto 14 en el sitio catalítico alostérico de MEK1 (PDB código 3WIG). La porción de PI3K del compuesto 14 está fuera al solvente (izquierda). La figura 1B muestra el modo de unión del compuesto 14 al sitio catalítico de PI3K (PDB código 2WXX). La porción de unión a MEK1 está fuera al solvente (izquierda). Se muestran las interacciones de apilamiento del orbital π como líneas discontinuas, los enlaces de hidrógeno también se muestran como líneas discontinuas.

SAR de la inhibición de MEK1 y PI3K para análogos inhibidores bifuncionales. Los datos de inhibición de MEK1 y PI3K *in vitro* para análogos inhibidores se presentan en la tabla 1. Todos los análogos en la serie demostraron inhibición de MEK1 significativamente alta en el intervalo nanomolar bajo a subnanomolar (0,015 nM < Cl₅₀ < 56,7 nM). El alto grado de inhibición de MEK observada como se ejemplifica por los análogos 9 y 14 podría ser debido a la retención de los elementos estructurales de la cadena lateral de hidroxamato claves de los potentes inhibidores de MEK PD0316684 y 5 en la porción enlazadora de las estructuras de inhibidores. La correspondiente actividad inhibidora de PI3K para estas series de inhibidores era menos pronunciada (54 nM < Cl₅₀ < 341 nM) mostrando el compuesto 7 la mayor inhibición de PI3K (Cl₅₀ = 54 nM) en la serie. La inhibición de PI3K mejorada de 7 comparada con 9 podría ser debida a su longitud de la cadena enlazadora extendida, aunque interacciones electrónicas adicionales atribuidas al enlace amida en el enlazador también podrían desempeñar un papel. La potencia de PI3K similar (191 nM < Cl₅₀ < 341 nM)

mostrada por los análogos 9, 11, y 14 también sugiere que la naturaleza de la unión del enlazador al nitrógeno de piperacina desempeña un papel minoritario en influir la inhibición de PI3K. La lipofilicidades calculadas (cLogP) para inhibidores funcionales estaban en el intervalo de 4,84-5,71 (Tabla 1) aproximándose al umbral aceptable (cLogP < 5) para biodisponibilidad oral.

5

Tabla 1. Datos de inhibición de enzimas MEK1 y PI3K *in vitro*^a



Compuesto	Enlazador (X)	cLogP	C ₅₀ (nM) ^a	
			MEK1	PI3K
7		4.84	0.50 ± 1.2	34 ± 23
9		5.58	0.019 ± 3.09	341 ± 56
11		5.48	56.7 ± 1.3	285 ± 36
14		5.71	0.013 ± 1.57	191 ± 64
5	n.a.	3.75	0.00715 ± 1.49	n.d.
PD0316684	n.a.	3.68	13.0 ± 1.6	n.d.
PD0325901	n.a.	2.85	15.0 ± 1.3	n.d.

10

^a Las notas al pie son la siguientes. # Los datos de unión son la media de tres experimentos cada uno realizado en duplicado. † Los datos de cLogP se obtuvieron usando ChemDraw Professional (versión 15.0.0.106).

15

Estudios de eficacia y viabilidad celulares. La actividad inhibidora de MEK1 y PI3K *in vitro* 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 compuestos inhibidores se midió por 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 compuestos para dirigirse *in vitro* a las rutas MAPK/ERK y PI3K/AKT por análisis de inmunotransferencia de lisados de proteína obtenidos de células tumorales de pulmón A549 la figura 2A y glioma D54 la figura 2B. Las células se incubaron en presencia de los compuestos indicados durante 1 hora y los lisados se probaron con anticuerpos específicos contra pAKT y pERK1/2 y se compararon con vehículo control (DMSO). Las células A549 (Figura 2A) y D54 (Figura 2B) se trataron con inhibidores en las concentraciones indicadas durante 1 hora y se sometieron a análisis de inmunotransferencia. Como se muestra en la figura 2A, en células A549 cultivadas, todos los compuestos en esta serie mostraron una disminución de la fosforilación de pERK1/2, lo que demuestra la potente eficacia de estos compuestos en inhibir la actividad enzimática de la quinasa MEK1. De forma similar, los compuestos 7, 9 y 14 también mostraron alta potencia en inhibir la actividad PI3K, como se indica por el bajo nivel de pAKT en muestras de células tratadas. Notablemente, todos los análogos inhibidores también demuestran inhibición significativa de la actividad MEK en ambas líneas celulares que se correlaciona bien con los datos de inhibición *in vitro* (Tabla 1). La inhibición tanto de MEK como PI3K era más pronunciada en líneas celulares tratadas con los compuestos 9 y 14 comparados con los compuestos 7 y 11.

30

El efecto de la serie de novedosos compuestos sobre la viabilidad celular se determinó usando el ensayo AlamarBlue. Las células tumorales A549 y D54 se trataron con análogos inhibidores bifuncionales (compuestos 7, 9, 11, y 14), inhibidor de MEK1 (PD0325901), inhibidor de PI3K (ZSTK474), y una combinación de ZSTK474 y PD0325901 48 horas antes del análisis del ensayo. La figura 3 muestra la cuantificación para la actividad *in vitro* de los compuestos 7, 9, 11, y 14 mediante una dependencia de la dosis de la viabilidad celular después de exposición a los compuestos 7, 9, 11, 14 y el inhibidor de PI3K ZSTK474 y el inhibidor de MEK1 PD0325901 en las concentraciones indicadas en (A) células tumorales de pulmón A549 y (B) células de glioma D54. El porcentaje de células tumorales viables se determinó 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 líneas celulares tumorales tanto A549 (Figura 3A) como D54 (Figura 3B). En particular, los compuestos 9 y 14 fueron similares a o en algunos casos superaron los efectos terapéuticos de las monoterapias individuales (por ejemplo, PD0325901) por viabilidad celular comprometida en ambas líneas celulares. De forma interesante, se encontró que los compuestos 9 y 14 eran tan eficaces como la combinación de ZSTK474 y PD0325901 en términos de pérdida de viabilidad celular en ambas líneas celulares (Figura 3A, Figura 3B). Significativamente, se encontró que los compuestos 9 y 14 tenían una actividad antitumoral que era similar a la de la terapia de combinación consistente en la coinubación con ZSTK474 y PD0325901 (Figura 3A, Figura 3B).

Actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones que portan tumores. En la base de la combinación de los datos de inhibición *in vitro* y los estudios de eficacia/viabilidad celular, el compuesto 14 se usó para evaluación *in vivo* adicional. Se usaron cuatro ratones Foxn1nu desnudos atímicos para evaluar la actividad de modulación de diana oncogénica *in vivo*. Se trataron ratones que portan tumores en el flanco D54 (n = 2) y A549 (n = 2) con vehículo o 375 mg/kg de compuesto 14 por alimentación forzada oral 2 horas antes del sacrificio. La figura 4A y la figura 4B muestran la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en ratones que portan tumores. Se trataron ratones que portan tumores subcutáneos D54 y A549 con vehículo o 375 mg/kg de compuesto 14 por alimentación forzada oral 2 horas antes del sacrificio. En la figura 4A, el análisis de inmunotransferencia de tejido tumoral extirpado mostró que el compuesto 14 modulaba con éxito las actividades tanto de MEK1 como PI3K en un tumor D54 relativo al vehículo control. En la figura 4B, el análisis de inmunotransferencia de tejido tumoral A549 extirpado mostró que el compuesto 14 modulaba con éxito las actividades tanto de MEK1 como PI3K en un tumor A549 relativo al vehículo control. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* del compuesto 14 para supresión de las actividades quinasa de MEK1/PI3K *in vivo* en tumores sólidos, confirmando que se podría alcanzar la inhibición simultánea *in vivo* de las rutas Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química única (compuesto 14). El análisis de inmunotransferencia de tejido tumoral extirpado reveló que el compuesto 14 inhibía la fosforilación de ERK1/2 y Akt en ambos tipos tumorales (Figura 4A y Figura 4B). Además, en otro experimento preliminar usando el compuesto 9 también se alcanzó la modulación de los niveles de ERK1/2 y pAkt en tumores de ratón tanto para tumores A549 como D54 (datos no mostrados). En conjunto, tomados juntos, estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad MEK1/PI3K se puede lograr tanto *in vitro* como *in vivo* por los compuestos inhibidores bifuncionales 9 y 14.

El aumento de las cascadas de señalización Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor en respuesta a estimulación con factores de crecimiento se ha demostrado en muchos cánceres humanos. Estudios también han mostrado que la inhibición de MEK fomenta una activación compensatoria de la actividad quinasa de PI3K/Akt. Según esto, codirigirse a estas dos rutas de señalización se ha reconocido como una estrategia quimioterapéutica prometedora en el tratamiento eficaz contra el cáncer. Para abordar este fin, se desarrollaron 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 de inhibidores de MEK no competitivos de ATP representada por PD0325901 usando una variedad de grupos espaciadores. Todos los inhibidores demostraron inhibición de nanomolar a subnanomolar de MEK1, así como de actividad quinasa de PI3K en ensayos de inhibición enzimática *in vitro* y una disminución dependiente de la dosis en viabilidad celular en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y glioma D54. Además, todos los inhibidores demostraron inhibición significativa de la actividad MEK1 en estas dos líneas celulares en correlación con demostrar actividad anticáncer *in vitro*. Estudios preliminares *in vivo* realizados en ratones que portan tumores D54 y A549 con el compuesto 14 después de administración oral revelaron inhibición significativa de la actividad MEK1 y PI3K 2 horas tras la administración, confirmando la eficacia *in vivo* hacia la modulación de diana. Hasta donde sabemos, este trabajo representa la primera demostración de inhibición simultánea *in vivo* de las rutas Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química única.

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

La figura 6 muestra la actividad de inhibición de MEK1 y PI3K *in vivo* en las líneas tumorales de melanoma con crecimiento subcutáneo A357 y A2058 en ratones. Los ratones que portan tumores de melanoma s.q. se trataron o con vehículo o 400 mg/kg de ST-162 o ST-168 por alimentación forzada oral 2 horas antes del sacrificio. El análisis de inmunotransferencia de tejido tumoral extirpado mostró que ambos compuestos modularon con éxito las actividades tanto MEK1 como PI3K en estos tumores de melanoma humano relativo al vehículo control. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* de ST-162 y ST-168 para la supresión de las actividades quinasas MEK1/PI3K *in vivo* en tumores sólidos, confirmando que se podría alcanzar la inhibición simultánea *in vivo* de las rutas Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química única (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 con crecimiento subcutáneo CT26 en ratones. Los ratones que portan tumores de colon subcutáneos se trataron o con vehículo o 400 mg/kg de ST-162 o ST-168 por alimentación forzada oral 2 horas antes del sacrificio. También se evaluaron inhibidores conocidos de PI3K y el inhibidor 901 de MEK en este estudio. El análisis de inmunotransferencia de tejido tumoral extirpado mostró que ST-162 y ST-168 modularon con éxito las actividades tanto MEK1 como PI3K en este modelo de tumor de colon humano relativo al vehículo control. Estos datos demuestran la biodisponibilidad y eficacia *in vivo* de ST-162 y ST-168 para la supresión de las actividades quinasas MEK1/PI3K *in vivo* en tumores de colon sólidos, confirmando que se podría alcanzar la inhibición simultánea *in vivo* de las rutas Ras/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTor usando un inhibidor bifuncional de entidad química única (compuestos ST-162 y ST-168).

En estudios preliminares, se ensayaron varios modelos de ratón para eficacia terapéutica usando administración oral de ST-162. Se usaron ratones Foxn1nu desnudos atímicos para evaluar la actividad de modulación de diana oncogénica *in vivo*. Se trataron ratones que portan tumores D54 intracerebrales, tumores de colon subcutáneos (CT26) y tumores de melanoma subcutáneos (A375 y A2058) con vehículo o 400 mg/kg de compuesto ST-162 por alimentación forzada oral durante 14-30+ días. Todos los estudios revelaron que se podrían alcanzar retrasos significativos de crecimiento tumoral (CT26, A375, y A2058) o supervivencia animal mejorada (D54).

La figura 8 es un estudio usando el compuesto ST-162 administrado empezando cuando los tumores intracerebrales alcanzan un volumen de aproximadamente 20 microlitros (medido por RM), se encontró una mejora significativa ($P = 0,0054$) en la supervivencia global comparado a animales tratados con vehículo control. Estos datos demuestran claramente que se puede alcanzar la supresión simultánea de la actividad MEK1/PI3K *in vivo* por el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de glioma D54 humano intracerebrales.

En la figura 9, el compuesto ST-162 se administró durante 14 días empezando cuando tumores de melanoma subcutáneos A2058 y A375 fueron medibles por calibrador y RM y los volúmenes tumorales se midieron durante el tiempo y compararon con controles de vehículo. Se observó una reducción significativa de crecimiento tumoral para ambos modelos tumorales de melanoma en animales tratados con ST-162 comparados con animales control de vehículo. Estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad MEK1/PI3K puede tener impacto en 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 empezando cuando tumores de colon subcutáneos CT-26 fueron medibles por calibrador y RM y los volúmenes tumorales se midieron durante el tiempo y compararon con controles de vehículo. Se observó una reducción significativa de crecimiento tumoral para tumores CT-26 en animales tratados con MVA-162 (compuesto 14) comparados con animales control de vehículo. Estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad MEK1/PI3K puede tener impacto en las tasas de crecimiento *in vivo* debido al tratamiento con el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de colon humano.

En la figura 11, ST-162 se administró durante 14 días empezando cuando tumores de colon subcutáneos CT-26 fueron medibles por calibrador y RM y los volúmenes tumorales se midieron durante el tiempo y compararon con controles de vehículo. El día 14, dos tumores se extirparon y compararon en tamaño y peso. Como se muestra, los tumores control de vehículo eran significativamente mayores que los recogidos de ratones tratados con ST-162 durante 14 días. Estos datos demuestran claramente que la supresión simultánea de la actividad MEK1/PI3K puede tener impacto en los volúmenes tumorales *in vivo* debido al tratamiento con el inhibidor bifuncional ST-162 en tumores de colon humano ya que los tumores tratados eran menores en volumen frente a los tumores tratados con vehículo control.

Ensayos de inhibición de MEK1 *in vitro*. La actividad de inhibición de MEK1 *in vitro* de análogos inhibidores se determinó usando kits de ensayo de quinasas luminiscente Kinase-Glo de Promega (WI, EE UU) según las instrucciones del fabricante. MEK1 purificada y Erk2 inactiva se compraron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE UU) y Carina Biosciences (Kobe, Japón), respectivamente. Brevemente, se añadieron series de diluciones de compuestos en placas de 96 pocillos, seguido por soluciones de MEK1, Erk2 y ATP. Las reacciones quinasas se corrieron a 30°C durante 30 minutos. Se añadieron después volúmenes iguales de solución Kinase-Glo, y las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. Las señales de bioluminiscencia se adquirieron con un lector multimarcador Envision de PerkinElmer. Los ensayos se realizaron en triplicado con varias concentraciones de inhibidor cada uno corrido en duplicado. Los datos de CI_{50} se calcularon usando 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 basado en fluorescencia Adapta TR-FRET. Los ensayos se realizaron en triplicado con varias concentraciones de inhibidores (de 0,1 nM a 10 µM).

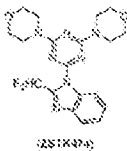
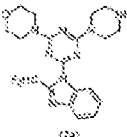
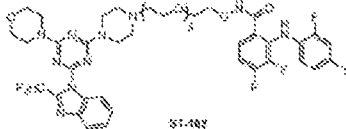
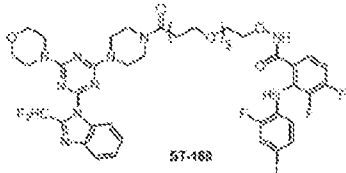
Modelos de acoplamiento virtual de análogos inhibidores bifuncionales. Los modelos de acoplamiento de análogos inhibidores bifuncionales se obtuvieron usando software de Schrödinger Inc. Las estructuras cristalinas de rayos X de MEK1 (PDB código 3WIG) y PI3K (PDB código 2WXX) se prepararon usando la Protein Preparation Wizard en Maestro (Protein Preparation Wizard, Schrödinger, LLC, Nueva York, NY). La estructura de proteína se usó después para generar las rejillas de receptor para acoplamiento usando OPLS2005 con el sitio de unión definido por el ligando nativo. Los ligandos inhibidores bifuncionales se construyeron y prepararon para 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 estándar con parámetros por defecto y sin restricciones (23).

Cultivo celular y ensayos de muerte celular. Una línea celular epitelial de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y una línea celular de glioma D54 se hicieron crecer en RPMI suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor al 10% y penicilina/estreptomycin/glutamina al 1% (Gibco, Carlsbad, CA). Las células se hicieron crecer en un incubador humidificado a 37°C con un suministro de CO₂ al 5%. El ensayo inicial de los efectos terapéuticos de los compuestos inhibidores se logró usando ensayos de viabilidad celular. Se prepararon soluciones madre de compuestos inhibidores (10 mM), ZSTK474 (inhibidor de PI3K representativo), PD0325901 (inhibidor de MEK representativo) en DMSO y se usaron para hacer soluciones finales por dilución en serie en medio RPMI. Los pocillos control se dosificaron con medio que contenía solvente portador DMSO al 1%. La viabilidad celular se determinó 48 horas después usando un ensayo AlamarBlue (Life Technologies, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Las señales de fluorescencia se determinaron con un lector multimarcador EnVision Xcite de PerkinElmer (PerkinElmer, Waltham, MA).

Análisis de inmunotransferencia. Las células se sembraron en placas de seis pocillos 24 horas antes del tratamiento y se incubaron con soluciones del respectivo compuesto inhibidor durante 1 h. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron con tampón de lisis de NP-40 (NP40 al 1%, NaCl 150 mM, y Tris 25 mM, pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasas (mezcla de inhibidores de proteasas 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 cantidades iguales de lisado de proteína celular completo se cargaron en cada carril y resolvieron usando un gel Bis-Tris en gradiente del 4-12% (Invitrogen, CA). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Invitrogen, CA). Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios después de bloquear, seguido por incubación con anticuerpo secundarios conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) apropiado a temperatura ambiente durante 1 hora. Se uso ECL-Plus para detectar la actividad de peroxidasa según el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos generados contra fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204), pAKT (S473), fosfo-p70 S6K* y anticuerpos de ERK, AKT totales se compraron de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE UU), y anti-β actina (conjugado con HRP) se compró de Abcam (Cambridge, MA, EE UU). Los anticuerpos secundarios con HRP se compraron de Jackson ImmunoResearch (San Luis, MO, EE UU).

Evaluación *in vivo* de eficacia de inhibidores. Todos los experimentos animales fueron aprobados por el Comité de la Universidad sobre el Uso y Cuidado de Animales (UCUCA) en la Universidad de Michigan. Ratones Foxn1nu desnudos atímicos de cinco semanas de edad se inocularon por vía subcutánea con 1 x 10⁶ células D54 completamente suspendidas en los flancos de dos ratones, y similarmente, dos ratones adicionales se inocularon con células A549 en el flanco. Cada inyectado contenía un volumen total de 200 µl de suspensión celular en medio RPMI al 50% mezclado con matriz de membrana basal BD Matrigel al 50% (Becton, Dickinson and Company, East Rutherford, NJ). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 150 mm³ por medida con calibrador, los ratones fueron privados de alimento durante 2-4 horas seguido por la administración con o vehículo (200 µl de DMSO:HPBCD (3:2)) o análogos inhibidor ST-162 (375 mg/kg en 200 µl de DMSO/HPBCD (3:2)) por vía oral 2 horas antes del sacrificio. Los tejidos tumorales se recogieron de los grupos tratados tanto con vehículo como fármaco y se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se ha descrito previamente.

Actividad de inhibición de subtipo de PI3K (nM)*

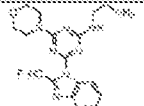
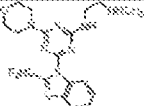

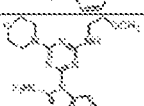
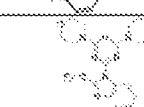
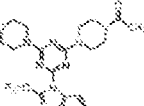
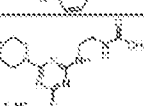
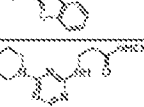
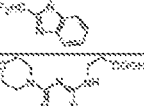
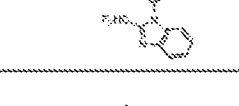
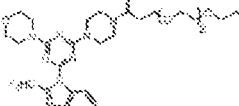
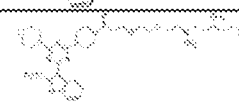
Inhibidor	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
 (ZSTK474)	5.0 \pm 0.8	15.2 \pm 1.4	20.8 \pm 0.6	3.9 \pm 0.6
 (2a)	180 \pm 25	1093 \pm 168	1873 \pm 283	142 \pm 7.5
 ST-162	467 \pm 9.0	4073 \pm 290	5803 \pm 511	942 \pm 120
 ST-168	69.2 \pm 2.2	1482 \pm 377	2293 \pm 241	41.7 \pm 2.1


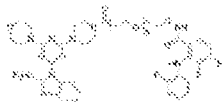
* Datos descritos como media \pm error estándar de la media (EEM).

- 5 También se divulga la síntesis de otra serie de inhibidores multifuncionales de entidad única alcanzada por unión covalente de análogos estructurales de un inhibidor de PI3K, un inhibidor de mTOR y un inhibidor de MEK. Los inhibidores multifuncionales mostraron potente inhibición *in vitro* de MEK1 (182 < CI₅₀ (nM) < 398), PI3K (39 < CI₅₀ (nM) < 191), y mTOR (50,4 < CI₅₀ (nM) < 53,1) en ensayos de inhibición enzimática. La inhibición concurrente se demostró por los compuestos ST-162, ST-168 y ST-180 en líneas celulares tumorales (A375 (melanoma), D54
10 (glioma), CT26 (cáncer colorrectal), A2058 (melanoma)). Los inhibidores produjeron una viabilidad celular disminuida 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 tiene un tumor sólido en el flanco mostraron por análisis de inmunotransferencia que 2 horas tras 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 del inhibidor multifuncional ST-168. La eficacia *in vivo* del compuesto ST-168 después de 40 dosis orales diarias de ST-168 (400 mg/kg) se demostró en ratones que tienen tumor melanoma A375. En este estudio ST-168 mostró una
15 reducción significativa > 6 veces en el tamaño tumoral sobre los animales tratados con vehículo control 35 días tras el inicio del tratamiento. También se observó una vida significativamente aumentada en estos ratones que portan tumores A375 tratados con ST-168 sin efectos secundarios detectables (tal como pérdida de peso corporal) debido a la dosis
20 de fármaco a largo plazo.

Datos de inhibición de enzima de subtipo de PI3K

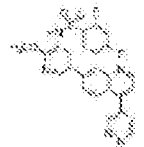
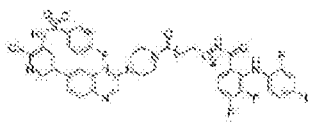
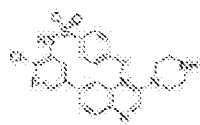
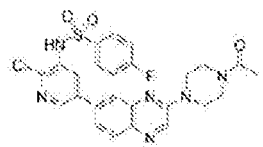
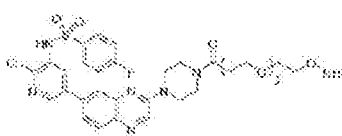
CI ₅₀ (nM)					
Compuesto	Estructura	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ

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-5-22		16.6 ± 1.4	199 ± 12	54 ± 1.5	9.5 ± 2.4
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
ST-167		11.5 ± 0.1	214 ± 49	140 ± 6.6	1.3 ± 0.2
ST-180		39 ± 9	2215 ± 425	717 ± 136	52 ± 1.4
ST-5-05		39 ± 2	2517 ± 557	2590 ± 660	56 ± 13

ST-162		191 ± 64	4073 ± 290	5803 ± 511	942 ± 120
ST-168		69.2 ± 2.2	1482 ± 377	2293 ± 241	41.7 ± 2.1

Datos de inhibición de mTOR y subtipo de PI3K para ST-182 e intermedios

CI50 (nM)

Compuesto	Estructura	mTOR	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
GSK 436		4.2 ± 0.1 (0.18/0.3)	< 0.495 (0.02)	1.2 ± 0.2 (0.13)	0.83 ± 0.1 (0.06)	< 0.495 (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 ± 0.13	< 0.495	30.2 ± 0.59	1.33 ± 0.14	< 0.495

5

10

15

Evaluación *in vivo* de la eficacia de inhibidores. Ratones Foxn1nu desnudos atímicos de cinco semanas de edad se inocularon por vía subcutánea con 1×10^6 células D54 completamente suspendidas en los flancos de dos ratones, y similarmente, dos ratones adicionales se inocularon con células A549 en el flanco. Cada inyectado contenía un volumen total de 200 μ l de suspensión celular en medio RPMI al 50% mezclado con matriz de membrana basal BD Matrigel al 50% (Becton, Dickinson and Company, East Rutherford, NJ). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 150 mm³ por medida con calibrador, los ratones fueron privados de alimento durante 2-4 horas seguido por la administración con o vehículo (200 μ l de DMSO:HPBCD (3:2)) o análogo inhibidor (14) (375 mg/kg en 200 μ l de DMSO/HPBCD (3:2)) por vía oral 2 horas antes del sacrificio. Los tejidos tumorales se recogieron de los grupos tratados tanto con vehículo como fármaco y se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se ha descrito previamente.

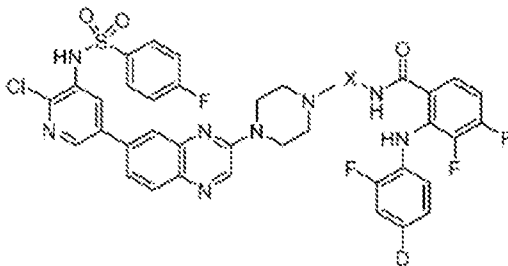
Referencias

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 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 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 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 USA.* 2009;106(43):18351-6.
19. T Shimizu et al., *Clin Cancer Res.* 2012;18(8):2316-25.
- 20 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 25. WO 2002/006213A2.
26. 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 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 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 Liao 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 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.

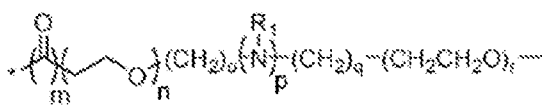
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura:

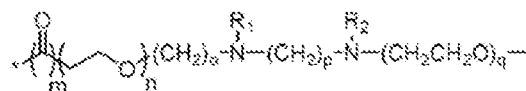
5 (a)



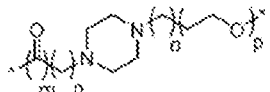
en donde D es I, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, o $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$, R = alquilo o arilo, y X se selecciona del grupo que consiste en:



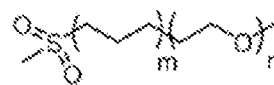
R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 0, 1; q = 0-6; r = 2-6



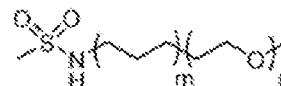
en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 1-6; q = 2-6, y R₁ y R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo



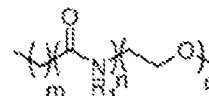
en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 0-6; o = 0-6; p = 2-6



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



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

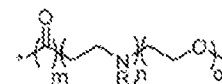


R₁, independientemente, es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0-6; n = 1-6; o = 2-6;



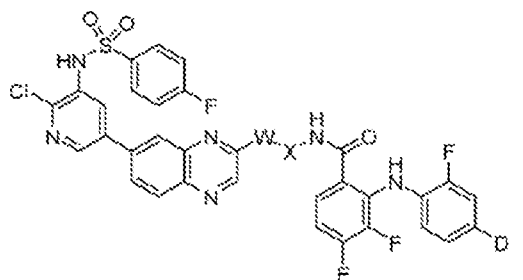
R₁, R₂, independientemente son H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 1-6; n = 2-6

y



R₁, independientemente es H, alquilo, o arilo, en donde, independientemente, m = 0, 1; n = 1-6; o = 2-6;

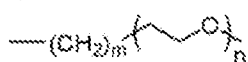
(b)



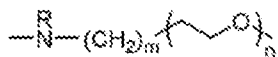
en donde W es (---N---) o ---O---
y R es H, alquilo o arilo y m = 0, 1-6;

5

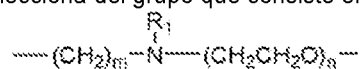
D = I, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$ donde R = alquilo o arilo, en donde X se selecciona del grupo que consiste en:



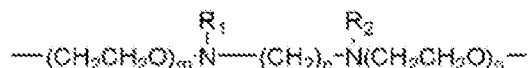
en donde m = 0, 1-6; n = 1-6; o cualquier combinación de m y n



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



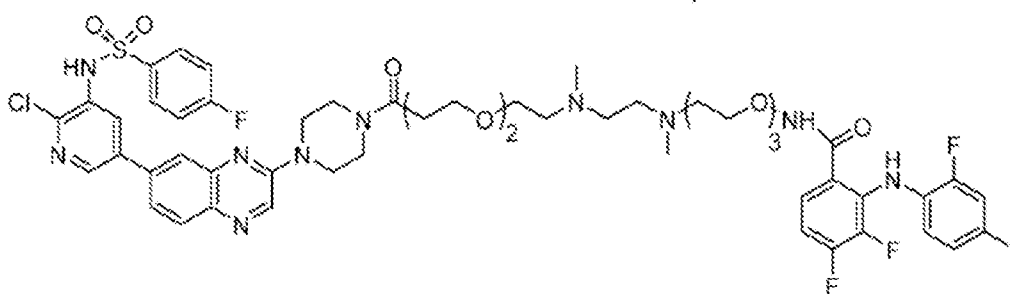
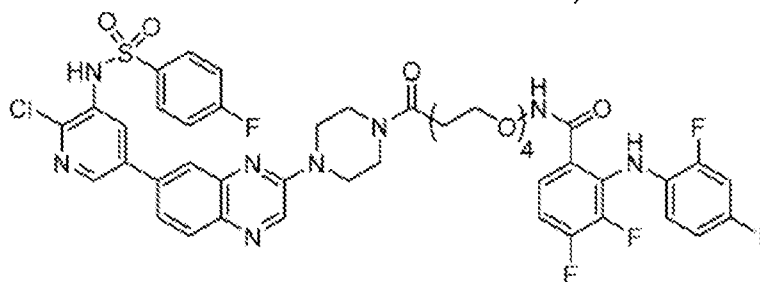
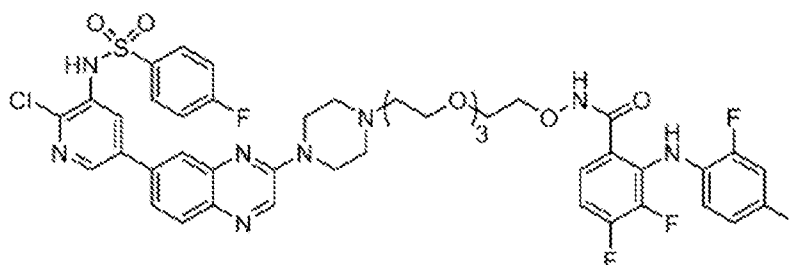
R₁ = H, alquilo o arilo donde m, n independientemente son 1-6



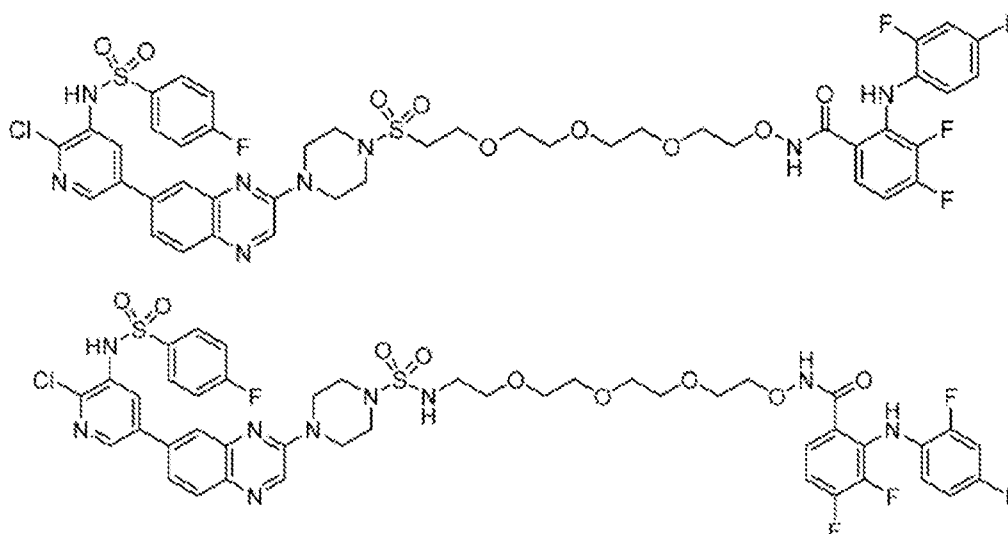
R₁, R₂ son independientemente H, alquilo, o arilo, y m, n, o independientemente son 1-6

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

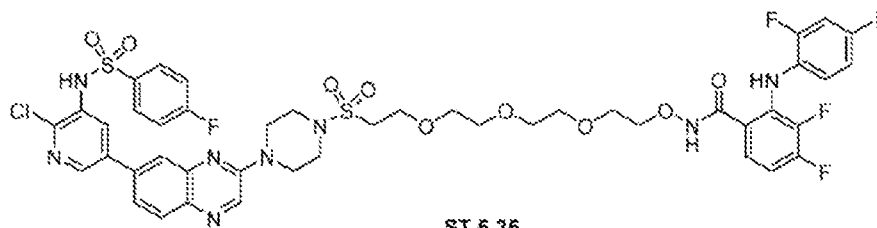
- 10 2. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en



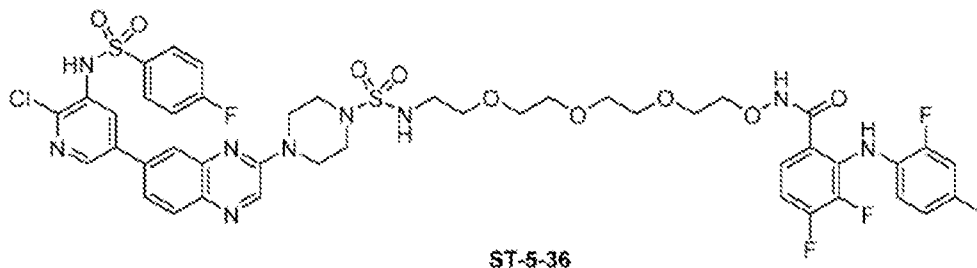
15



3. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 2 que tiene la fórmula



o



4. Una composición que comprende (a) un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, (b) un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de una enfermedad o afección en donde la inhibición de MEK y/o PI3K proporciona un beneficio, y (c) un excipiente y/o soporte farmacéuticamente aceptable opcional.
5. La composición de la reivindicación 4 en donde el segundo agente terapéutico comprende un agente quimioterapéutico útil en el tratamiento del cáncer.
6. Una composición que comprende un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en tratar una enfermedad o afección en donde la inhibición de al menos uno de mTOR, MEK y PI3K proporciona un beneficio.
8. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto se usa en combinación con un segundo agente terapéutico útil en el tratamiento de la enfermedad o afección.
9. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 8, en donde el compuesto y el segundo agente terapéutico se administran simultáneamente.

10. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 9, en donde el compuesto y el segundo agente terapéutico se administran por separado.
11. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 7, en donde la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, incluyendo vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico y no microcítico y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, aparato 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 hodgkiniano, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkett, tumores hematopoyéticos de linaje mielode, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielode, y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (CCR), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mielode y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma, oncología de adultos y pediátrica, crecimiento de tumores/neoplasias malignas sólidas, carcinoma mixode y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas de tejidos blandos humanos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, en particular de la cabeza y el cuello, carcinoma de células escamosas esofágico, carcinoma oral, neoplasias malignas de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, y leucemia de células pilosas, linfomas de efusión (linfomas basados en cavidades del cuerpo), linfoma tímico, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma microcítico, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres no microcíticos, cáncer de mama, incluyendo carcinoma microcítico 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, tal como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células de transición invasivas de la vejiga, y cáncer de vejiga invasor de músculo), cáncer de próstata, neoplasias malignas del aparato genital femenino (incluyendo carcinoma ovárico, neoplasias epiteliales peritoneales primarias, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), neoplasias malignas del aparato 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 de hueso (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, evolución tumoral de queratinocitos de piel humana, y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, efusión peritoneal, efusión pleural maligna, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de la vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, neoplasia maligna mielode incluyendo leucemia mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mielode crónica (LMC), sarcoma de Kaposi, cánceres pancreáticos y colorrectales, y enfermedad metastásica tumoral, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades intestinales inflamatorias, vasculitis, síndrome de Behçet, psoriasis, dermatosis inflamatorias, asma, enfermedades alérgicas respiratorias, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto, 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 causado por daño a o malfuncionamiento de los nervios mismos), y dolor nociceptivo (los nociceptores son receptores en el sistema nervioso que se activan durante lesión) y dolor crónico asociado con diagnóstico clínico.
12. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 11, en donde la enfermedad o afección es un cáncer.
13. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 12, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinomas, incluyendo vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico y no microcítico y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, aparato 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 hodgkiniano, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkett, tumores hematopoyéticos de linaje mielode, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielode, y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma,

neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosa, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, teratocarcinoma, carcinoma de células renales (CCR), cáncer pancreático, mieloma, leucemia mieloide y linfoblástica, neuroblastoma, glioblastoma, oncología de adultos y pediátrica, crecimiento de tumores/neoplasias malignas sólidas, carcinoma mixoide y de células redondas, tumores localmente avanzados, cáncer metastásico, sarcomas de tejidos blandos humanos, incluyendo sarcoma de Ewing, metástasis de cáncer, incluyendo metástasis linfáticas, carcinoma de células escamosas, en particular de la cabeza y el cuello, carcinoma de células escamosas esofágico, carcinoma oral, neoplasias malignas de células sanguíneas, incluyendo mieloma múltiple, leucemias, incluyendo leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, y leucemia de células pilosas, linfomas de efusión (linfomas basados en cavidades del cuerpo), linfoma tímico, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma microcítico, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer de la corteza suprarrenal, tumores productores de ACTH, cánceres no microcíticos, cáncer de mama, incluyendo carcinoma microcítico 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, tal como tumores de vejiga superficiales primarios, carcinoma de células de transición invasivas de la vejiga, y cáncer de vejiga invasor de músculo), cáncer de próstata, neoplasias malignas del aparato genital femenino (incluyendo carcinoma ovárico, neoplasias epiteliales peritoneales primarias, carcinoma cervical, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, cáncer de la vulva, cáncer uterino y tumores sólidos en el folículo ovárico), neoplasias malignas del aparato 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 de hueso (incluyendo osteomas y osteosarcomas), cánceres de piel (incluyendo melanoma maligno, evolución tumoral de queratinocitos de piel humana, y cáncer de células escamosas), cáncer de tiroides, retinoblastoma, neuroblastoma, efusión peritoneal, efusión pleural maligna, mesotelioma, tumores de Wilms, cáncer de la vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, hemangiopericitoma, mielofibrosis, neoplasia maligna mieloide incluyendo leucemia mielógena aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia mieloide crónica (LMC), sarcoma de Kaposi, cánceres pancreáticos y colorrectales, y enfermedad metastásica tumoral.

14. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 8, en donde la enfermedad o afección es un cáncer y el segundo agente terapéutico es un agente farmacológico o compuesto que induce apoptosis, el agente farmacológico o compuesto preferiblemente es un molécula orgánica pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico o anticuerpo, los agentes quimioterapéuticos preferiblemente son 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, antibióticos, tales como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno, tal como ciclofosfamida, análogos de pirimidina, tal como 5-fluorouracilo, cis-platino, hidroxiaurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, leuprolida o goserelina (análogos peptídicos sintéticos de LH-RH), hormonas y antagonistas de las mismas, radioisótopos, anticuerpos, productos naturales, y combinaciones de los mismos, preferiblemente agentes quimioterapéuticos enumerados en la siguiente tabla

Agentes alquilantes

Mostazas de nitrógeno

mecloretamina
ciclofosfamida
ifosfamida
melfalán
clormabucilo
mostaza de uracilo
temozolomida

Nitrosoureas

carmustina (BCNU)
lomustina (CCNU)
semustina (metil-CCNU)
clormetina
estreptozocina

Etilenimina/metil-melamina

trietilenmalmina (TEM)
trietilentiófosforamida (tiotepa)
hexametilmelamina (HMM, altretamina)

Alquilsulfonatos

Productos naturales

Fármacos antimitóticos

Taxanos

paclitaxel
alcaloides de la vinca
vinblastina (VLB)
vincristina
vinorelbina
vindesina
Taxotere® (docetaxel)
estramustina
fosfato de estramustina

Epipodofilotoxinas

etopósido
tenipósido

Antibióticos

actinomicina D
daunomicina (rubidomicina)
doxorubicina (adriamicina)
mitoxantroneidarrubicina

busulfán
pipobroman

Triacinas
decarbacin (DTIC)

Antimetabolitos
Análogos de ácido fólico
metotrexato
trimetrexato
pemetrexed (antifolato multidirigido)

Análogos de pirimidina
5-fluorouracilo
fluorodesoxiuridina
gemcitabina
citosina arabinósido (AraC, citabarina)
5-azacitidina
2,2'-difluorodesoxi-citidina
floxuridina
pentostanina

Análogos de purina
6-mercaptopurina
6-tioguanina
azatioprina
2'-desoxicoformicina (pentostatina)
eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)
fosfato de fludarabina
2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)

Inhibidores de topoisomerasa de tipo I
camptotecina
topotecano
irinotecano

Modificadores de respuestas biológicas
G-CSF
GM-CSF

Agentes de diferenciación
derivados de ácido retinoico

Hormonas y antagonistas
Adrenocorticosteroides/antagonistas
prednisona y equivalentes
dexametasona
ainoglutetimida

Progestinas
caproato de hidroxiprogesterona
acetato de medroxiprogesterona
acetato de megestrol

Estrógenos
dietilestilbestrol
etinil estradiol/ equivalentes

Antiestrógeno
tamoxifeno

Andrógenos
propionato de testosterona
fluoximesterona/equivalentes

bleomicina
esplicamicina (mitramicina)
mitomicina-C
dactinomicina
afidocolina
epirubicina
idarrubicina
daunorrubicina
mitramicina
desoxi co-formicina

Enzimas
L-asparaginasa
L-arginasa

Radiosensibilizadores
metronidazol
misonidazol
desmetilmisonidazol
pimonidazol
etanidazol
nimorazol
RSU 1069
EO9
RB 6145

Antiandrógenos no esteroideos
SR4233
flutamida
nicotinamida
5-bromodesoxiuridina
5-yododesoxiuridina
bromodesoxicitidina

Agentes misceláneos
Complejos de coordinación de platino
cisplatino
carboplatino
oxaliplatino
antracenodiona
mitoxantrona

Urea sustituida
hidroxiurea

Derivados de metilhidracina
N-metilhidracina (MIH)
procarbacin

Supresores corticosuprarrenales
mitotano (o,p'-DDD)
ainoglutetimida

Citoquinas
interferón (α , β , γ)
interleuquina-2

Fotosensibilizadores
derivados de hematoporfirina
PHOTOFIN®
derivados de benzoporfirina
Npe6
etioporfirina de estaño (SnET2)
feoborbido-a
bacterioclorofila a
naftalocianinas

Antiandrógenos

flutamida

análogos de la hormona liberadora de
gonadotropina

leuprolida

ftalocianinas

ftalocianinas de cinc

Radiación

rayos X

luz ultravioleta

radiación gamma

luz visible

radiación infrarroja

radiación de microondas

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), derivados de TAXOL (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritil cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas incluyendo, pero no limitado a, epotilona A, eoptilona B, y discodermolida, estramustina, nocodazol, MAP4, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17- α -etinilestadiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, zoladex, antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas de matriz, y otros inhibidores de VEGF, tal como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU668, anticuerpos anti-Her2, inhibidor de EGFR, preferiblemente EKB-569 (un inhibidor irreversible), anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR e inhibidores de Src, agentes citostáticos tal como CASODEX (bicalutamida, Astra Zeneca), TAMOXIFEN, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de PI3, inhibidores de la quinasa Src, e inhibidores de PDGF, opioides o cannabinoides, AINE, y esteroides para el alivio del dolor crónico.

15. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto y el segundo agente terapéutico se administran de una única composición.
16. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto y el segundo agente terapéutico se administran de composiciones separadas.
17. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 7, en donde el compuesto se administra antes que el segundo agente terapéutico.
18. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 8, en donde el compuesto se administra después del segundo agente terapéutico.

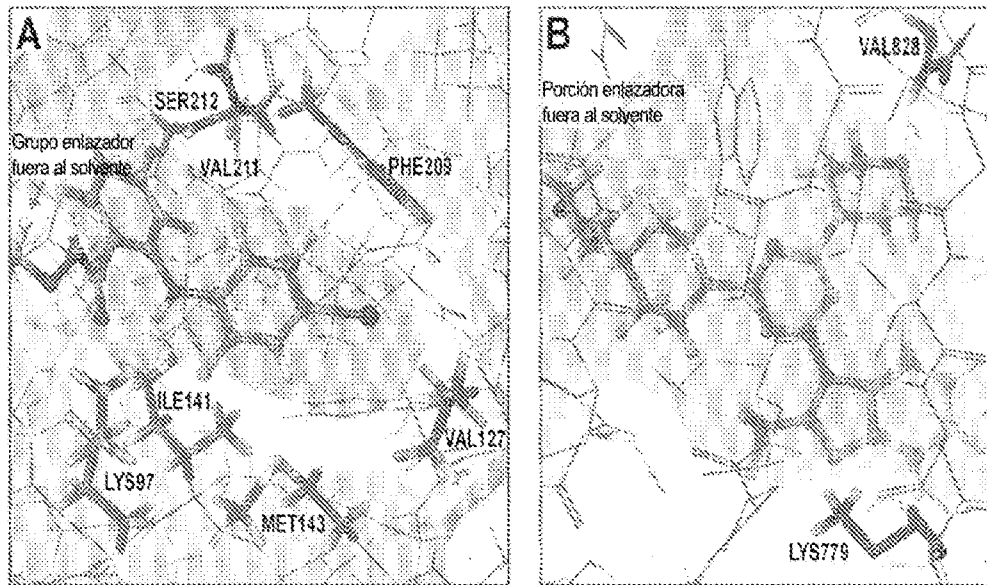


FIG 1

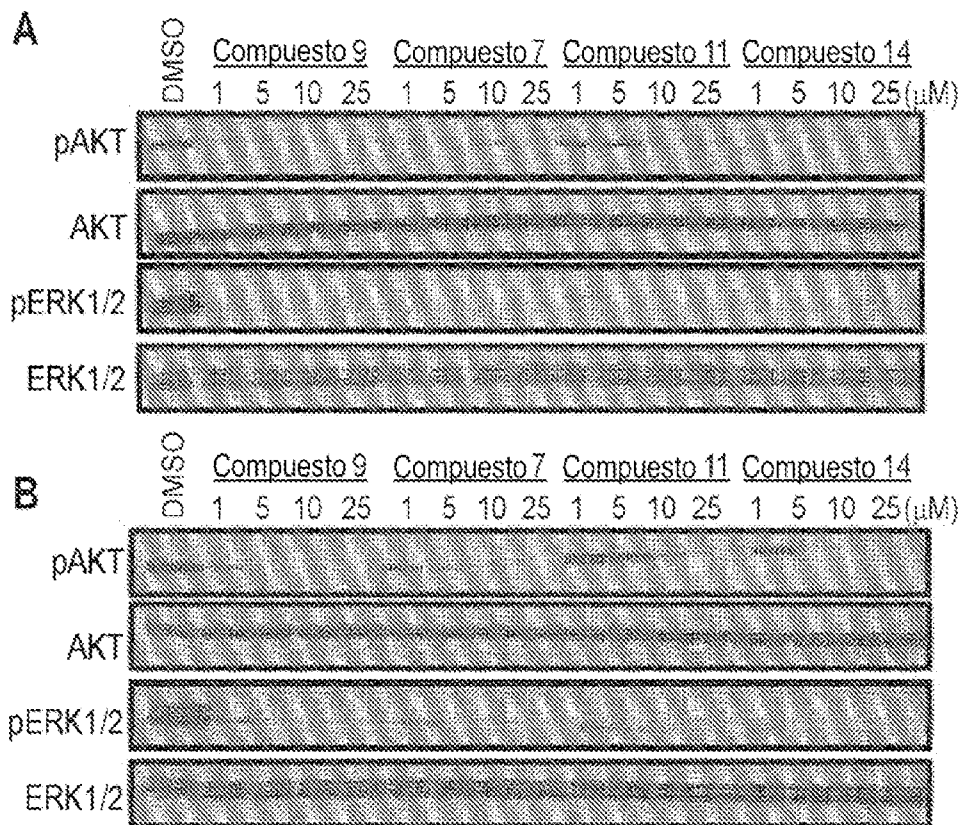


FIG 2

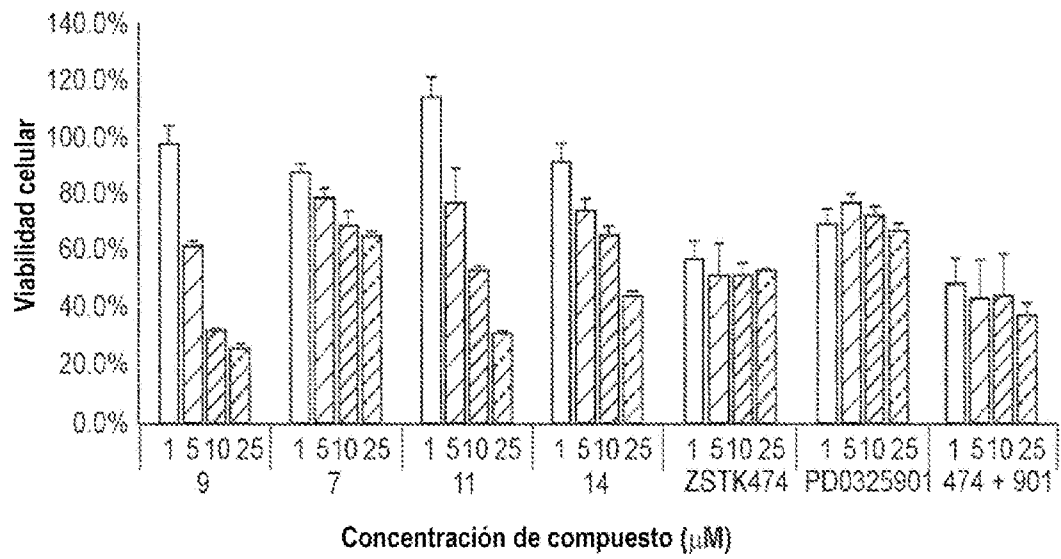


FIG. 3A

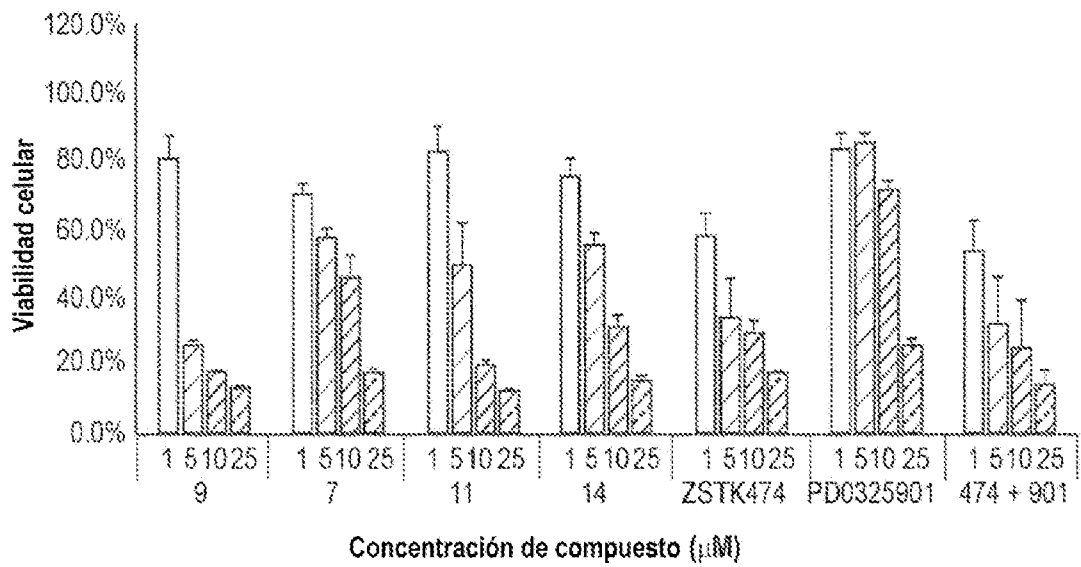


FIG. 3B

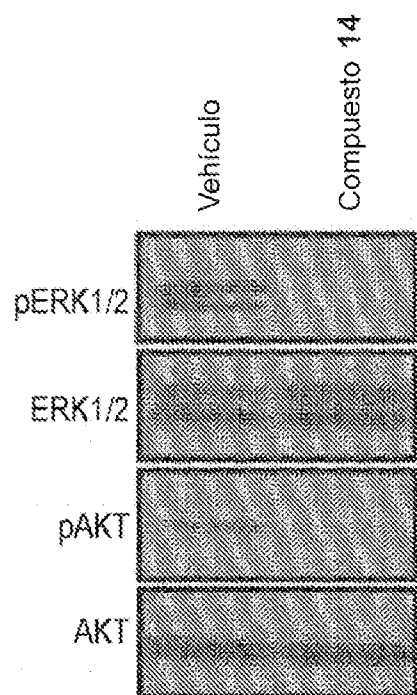


FIG. 4A

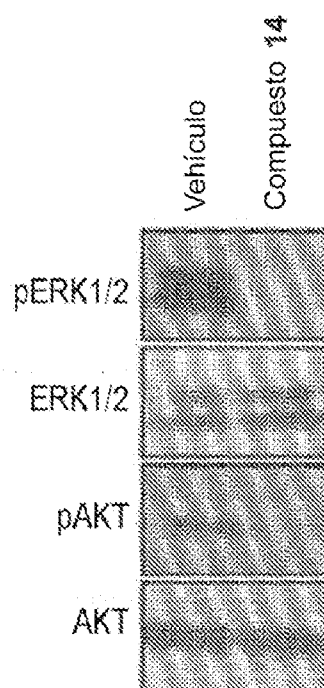


FIG. 4B

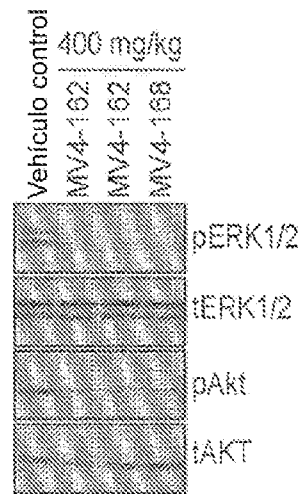


FIG. 5

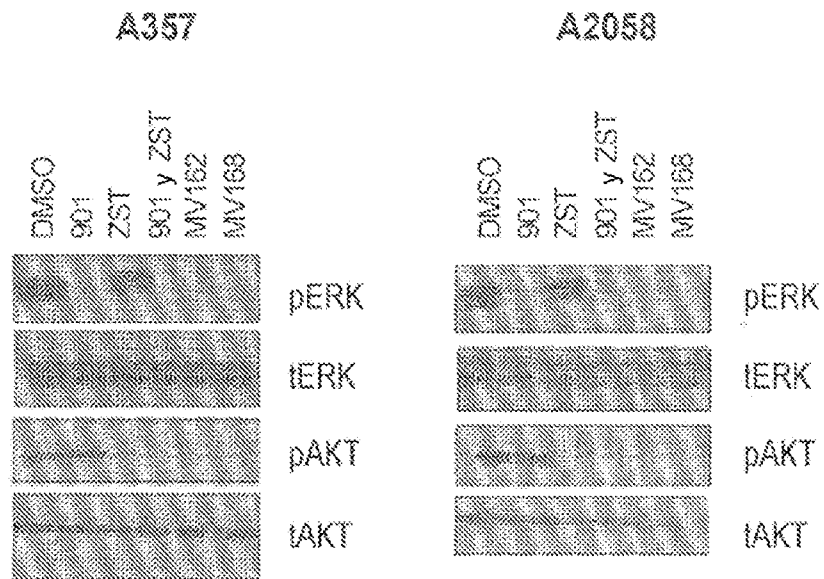


FIG. 6

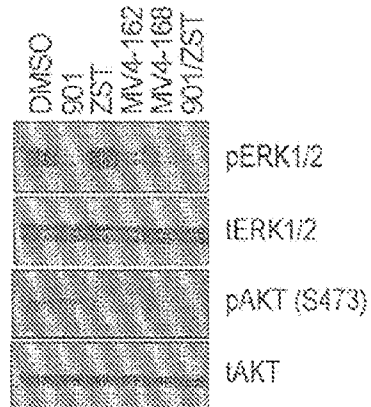


FIG. 7

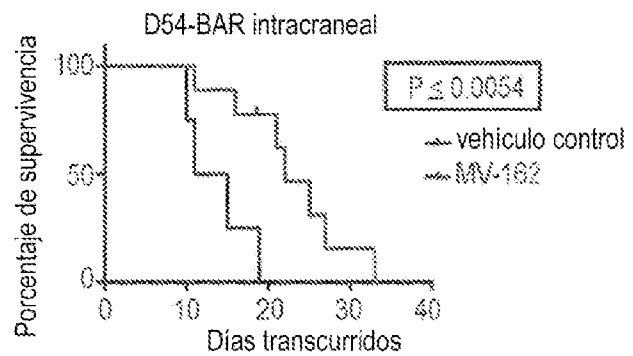


FIG. 8

**Melanoma FL7 (flanco): porcentaje de cambio en volumen tumoral
(Tratamiento empieza 6/3/2016)**

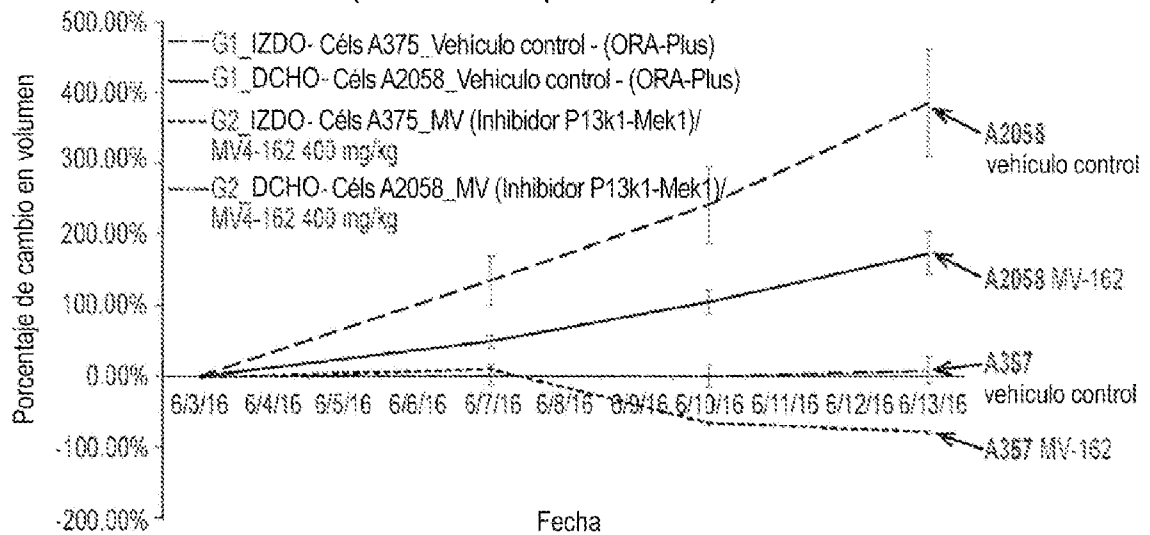


FIG. 9

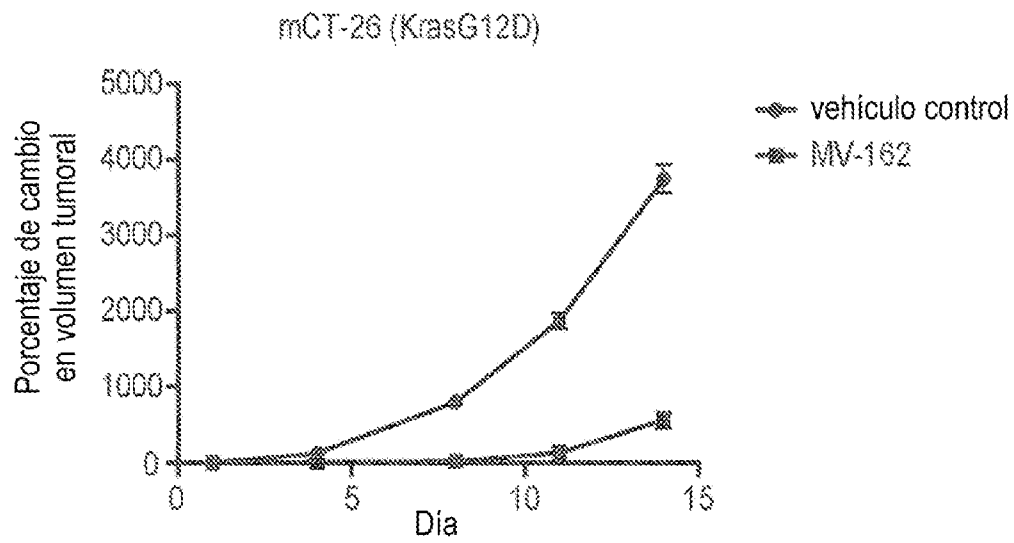


FIG. 10

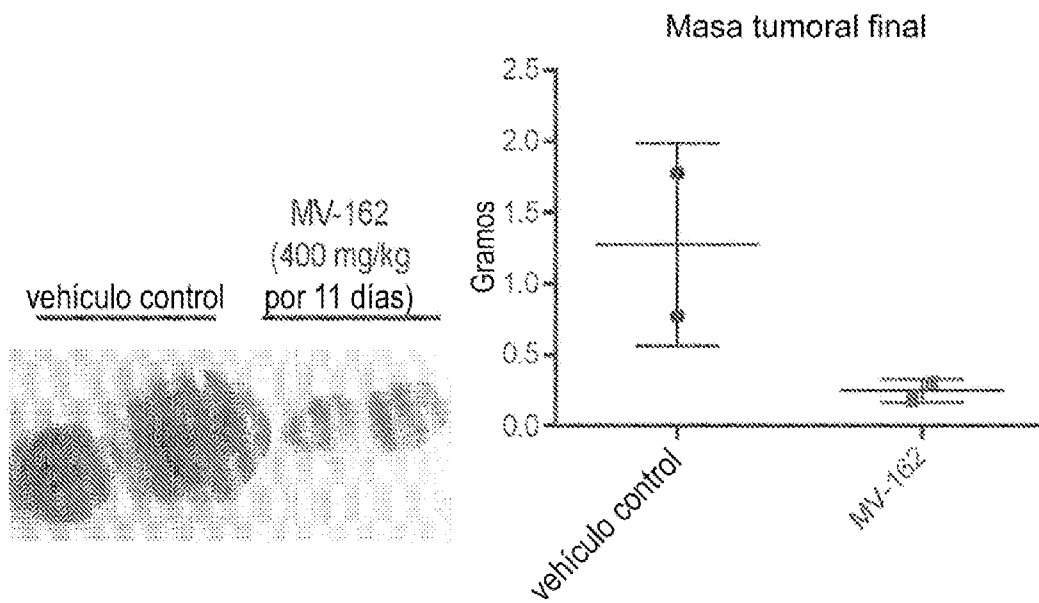


FIG. 11