

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 498**

21 Número de solicitud: 202130526

51 Int. Cl.:

C07D 249/04 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

08.06.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.12.2022

Fecha de concesión:

27.04.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.05.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca (Salamanca) ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ ROMERO, Marta;
GACHO TEMPRANO, Álvaro;
SÁNCHEZ DE BLAS, Beatriz;
PÉREZ MELERO, M^a Concepción;
BERMEJO GONZÁLEZ, Francisco y
GARCÍA MARÍN, José Juan**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **AGENTES CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER
HEPÁTICO Y DIGESTIVO**

57 Resumen:

Agentes citostáticos vectorizados para el tratamiento del cáncer hepático y digestivo.

La presente invención se refiere a la síntesis química de una nueva familia de moléculas vectorizadas mediante la unión de inhibidores de receptores con actividad tirosina kinasa (TKIs) con estructuras esteroideas de tipo ácido biliar, con actividad antitumoral frente al cáncer enterohepático y digestivo.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 930 498 B2

DESCRIPCIÓN**AGENTES CITOSTÁTICOS VECTORIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL
CÁNCER HEPÁTICO Y DIGESTIVO**

5

La presente invención se refiere a la síntesis química de una nueva familia de moléculas vectorizadas mediante la unión de inhibidores de receptores con actividad tirosina kinasa (TKIs) con estructuras esteroideas de tipo ácido biliar, con actividad antitumoral frente al cáncer enterohepático y digestivo.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los ácidos biliares son moléculas sintetizadas por el hígado a partir del colesterol que presentan un marcado tropismo hacia los tejidos del circuito enterohepático debido a la presencia de transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las células que componen estos órganos, como son las proteínas implicadas en la captación de aniones (NTCP, ASBT y OATPs) y cationes (OCTs) orgánicos y sistemas de exportación pasiva (OST α/β) o activa (BSEP, MRP2, MRP3 y MRP4) de estos compuestos. Debido a este especial tropismo que les mantiene, en su mayor parte, recluidos en la circulación enterohepática han sido utilizadas como lanzaderas de fármacos (clorambucilo, cisplatino, etc.) y otras moléculas con potencial actividad farmacológica (péptidos, nucleósidos y bases nitrogenadas), reduciendo así los efectos secundarios indeseables y aumentando su biodisponibilidad en el hígado y en el intestino.

25

30

Por otro lado, los inhibidores de receptores de tipo tirosina kinasa (TKI) constituyen una familia de fármacos que actualmente presenta los resultados más prometedores, aunque muy modestos, en clínica en el tratamiento del cáncer digestivo (adenocarcinoma de estómago y colon) y del cáncer hepático primario y metastásico, que, debido a su detección tardía, a la baja respuesta a la quimioterapia y al desarrollo de efectos secundarios a los tratamientos, tienen un pronóstico funesto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35

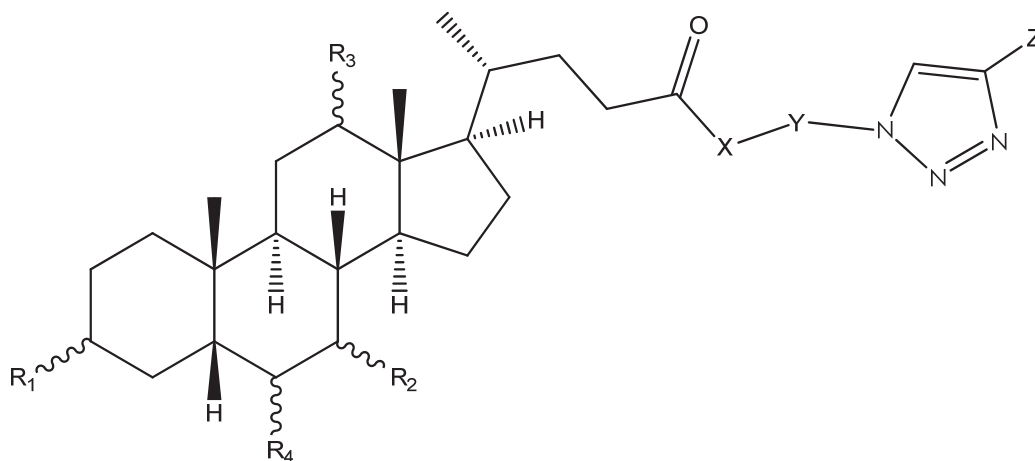
En la presente invención se ha llevado a cabo la síntesis química de una nueva familia

de moléculas vectorizadas denominadas BATKIs (BA: *bile acid*, TKI: *tyrosine kinase inhibitor*) de fórmula general (I), con potencial actividad antitumoral frente al cáncer enterohepático y digestivo.

- 5 Estos compuestos han sido sintetizados mediante la unión de inhibidores de receptores con actividad tirosina kinasa (TKIs) con reconocida actividad citostática frente a estos tipos de tumor, con estructuras esteroideas de tipo ácido biliar. De esta forma, se consigue aumentar la biodisponibilidad en el tejido diana debido al organotropismo de la molécula y, como consecuencia, se potencia su efecto antiproliferativo y se reducen sus efectos secundarios adversos y el desarrollo de quimiorresistencia.

Estas nuevas moléculas constan de dos partes estructurales unidas mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, comúnmente denominada en síntesis orgánica *química click*, donde una de las partes es una azida derivada de ácidos biliares naturales (BAD), como son el ácido cólico o el ácido glicocólico; y la otra, un inhibidor de receptores con actividad tirosina kinasa (TKI) que presenta un triple enlace terminal, como por ejemplo el erlotinib, o modificado previamente para contener un grupo terminal acetileno, como por ejemplo el sorafenib, lo que los hace óptimos para la reacción *click*.

- 20 Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

- 25 donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;
R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

X se selecciona de entre O, S, NR', NH(CH₂)_nCOO, O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -CH₂CH₂SO₂CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-

5 alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆;

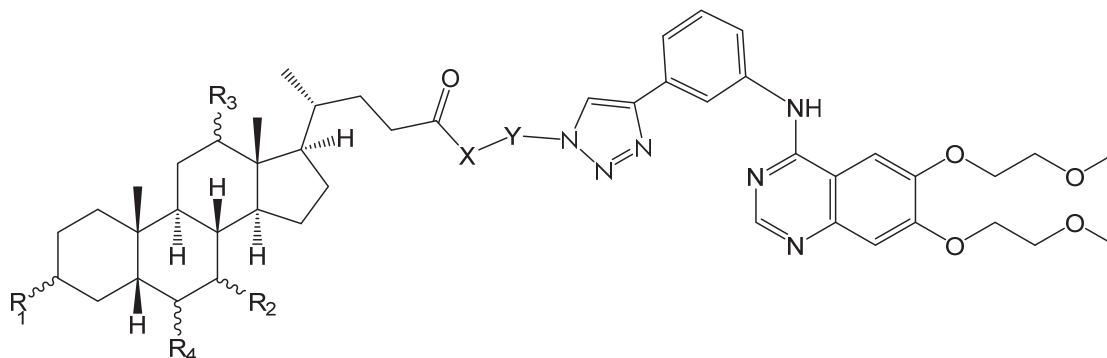
Z es un inhibidor de receptores con actividad tirosina kinasa (TKI), preferiblemente seleccionado de entre imatinib, erlotinib, lenvatinib, regorafenib, sorafenib, sunitinib o cabozantinib;

10 n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

En una realización preferida Z es erlotinib, por lo que los compuestos presentan una

15 fórmula (Ia):



Fórmula (Ia)

20 donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;

R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

X se selecciona de entre O, S, NR', NH(CH₂)_nCOO, O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -CH₂CH₂SO₂CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-,

25 opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆;

n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

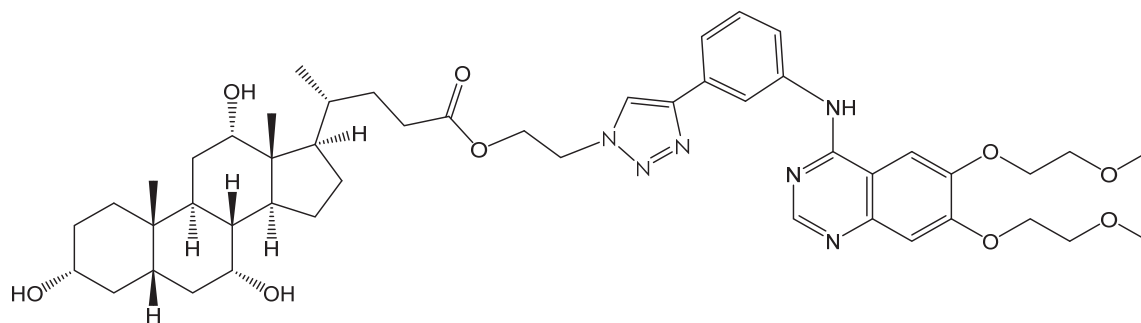
En una realización más preferida R₁, R₂ y R₃ es OH, y más preferentemente esos grupos hidroxilo se encuentran en posición α.

En otra realización más preferida R₄ es H.

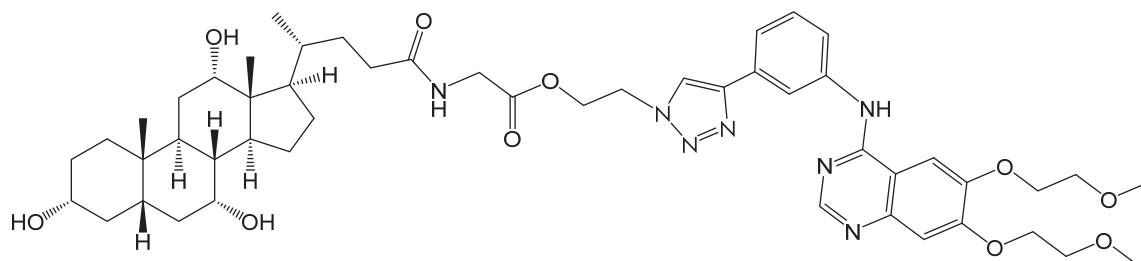
En otra realización más preferida X se selecciona de entre O, S, NR' o NH(CH₂)_nCOO; y más preferiblemente X es O o NHCH₂COO.

En otra realización más preferida Y es -(CH₂)₂-.

En otra realización aún más preferida el compuesto de fórmula (Ia) son los compuestos de fórmula:

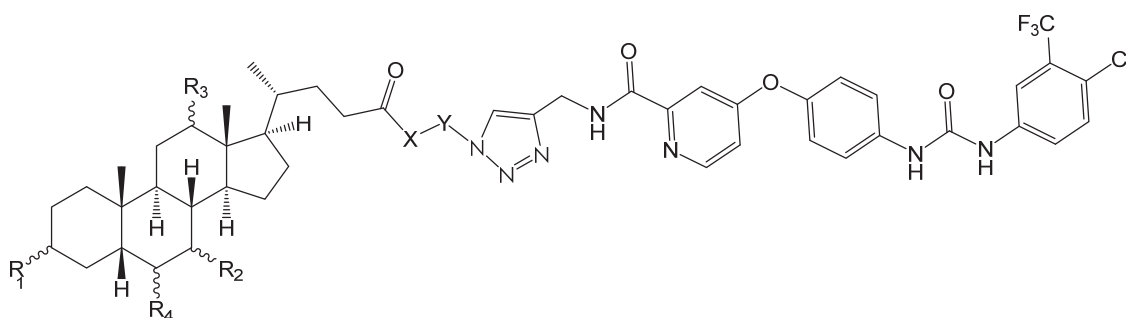


BATKI-1C



BATKI-1G

En otra realización preferida Z es sorafenib, por lo que los compuestos presentan una fórmula (Ib):



Fórmula (Ib)

donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;

5 R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

X se selecciona de entre O, S, NR', NH(CH₂)_nCOO, O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -CH₂CH₂SO₂CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-,
 10 opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆;

n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

15

En una realización más preferida R₁, R₂ y R₃ es OH, y más preferentemente esos grupos hidroxilo se encuentran en posición α.

En otra realización más preferida R₄ es H.

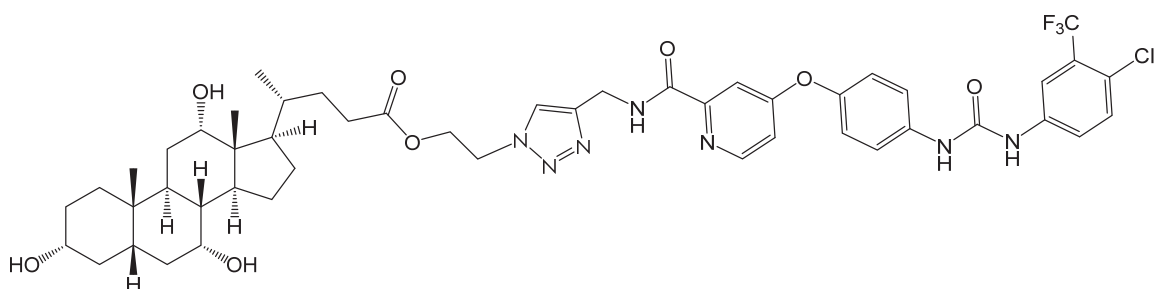
20

En otra realización más preferida X se selecciona de entre O, S, NR'; y más preferiblemente X es O o NHCH₂COO.

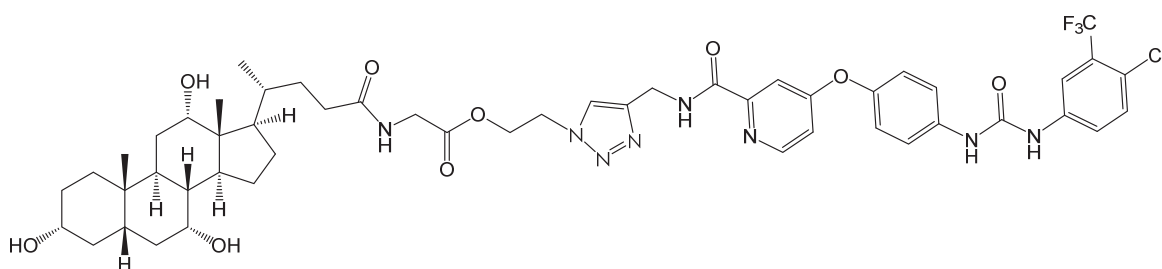
En otra realización más preferida Y es -(CH₂)₂-.

25

En otra realización aún más preferida el compuesto de fórmula (Ib) es el compuesto de fórmula:



BATKI-2C



BATKI-2G

5

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención tal y como se han definido anteriormente, caracterizado por que comprende la reacción entre la azida derivada del ácido cólico o del ácido glicocólico con el grupo acetilénico del inhibidor de receptores de tipo tirosina kinasa en presencia de un catalizador de Cu(I) generado *in situ* en el medio de reacción. Cuando el compuesto

10 inhibidor de receptores con actividad tirosina kinasa no contiene un alquino terminal en su estructura, el inhibidor es previamente modificado con un grupo acetilénico.

En una realización particular, cuando Z es erlotinib (CAS 183321-74-6) es adquirido comercialmente y empleado sin realizar modificación alguna por poseer un acetileno terminal para preparar los compuestos de fórmula (Ia), y más particularmente los compuestos BATKI-1C y BATKI-1G.

15

En otra realización particular, cuando Z es sorafenib (CAS 284461-73-0) o cualquier otro inhibidor sin alquino terminal en su estructura. Este compuesto debe ser modificado añadiendo un grupo acetileno a su estructura para la reacción de *química click* con la azida obtenida a partir del ácido cólico o del ácido glicocólico, y, de este modo obtener los compuestos de fórmula (Ib), más particularmente los compuestos BATKI-2C y BATKI-2G.

20

25

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los compuestos de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica.

La composición de la invención puede administrarse de cualquiera de las maneras conocidas de administración. En una realización preferida, la composición está configurada para poder administrarse de forma intravenosa, intraperitoneal u oral. En
10 este último caso el compuesto puede recubrirse con un polímero que libere su contenido pasado el estómago. De manera aún más preferida, la composición está configurada para ser inyectada por vía intravenosa o intraperitoneal.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de la invención o una composición
15 farmacéutica que lo comprenda, tal y como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de la invención o una composición farmacéutica que lo comprenda, tal y como se ha definido anteriormente, para su uso
20 en el tratamiento de cáncer digestivo o hepático.

En una realización preferida, el cáncer digestivo es adenocarcinoma de estómago o colon.

- 25 En otra realización preferida, el cáncer hepático es primario o metastásico.

Otro aspecto de la invención es el uso del compuesto de la invención o una composición farmacéutica que lo comprenda, tal y como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento.

30 Otro aspecto de la invención es el uso del compuesto de la invención o una composición farmacéutica que lo comprenda, tal y como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer digestivo o hepático.

- 35 En una realización preferida, el cáncer digestivo es adenocarcinoma de estómago o

colon.

En otra realización preferida, el cáncer hepático es primario o metastásico.

- 5 Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de cáncer digestivo o hepático, que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención o una composición farmacéutica que lo comprenda, tal y como se ha definido anteriormente.
- 10 En una realización preferida, el cáncer digestivo es adenocarcinoma de estómago o colon.

En otra realización preferida, el cáncer hepático es primario o metastásico.

- 15 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, dependerá, entre otras causas, de las características propias de los compuestos y de los pacientes, incluyendo la edad, estado del paciente,
- 20 la severidad de la alteración o trastorno, y también de la ruta y frecuencia de administración.

En la presente invención se entiende por “un inhibidor de receptores con actividad tirosina kinasa (TKI)”, todos aquellos fármacos antitumorales que actúan como

25 inhibidores enzimáticos bloqueando específicamente las vías de señalización intracelular mediadas por la fosforilación de proteínas, principalmente inhibiendo la activación de las enzimas de tipo tirosina kinasa, que promueven el crecimiento celular, diferenciación, muerte y angiogénesis (Goel S et al, *Curr Oncol Rep*, **2002**; Arora A et al, *J Pharmacol Exp Ther*, **2005**, 315(3):971-9; 4(1):9-19; He M et al, *Chin J Cancer*,

30 **2012**, 31(3):126-33). Se incluyen en este grupo todos los fármacos activos por vía oral que se utilizan en las actualmente denominadas terapias dirigidas frente al cáncer y que reciben la acepción de “pequeñas moléculas” (“*small molecules*”) por su baja masa molecular como son: imatinib, erlotinib, cabozantinib, lenvatinib, regorafenib, sorafenib, sunitinib, entre otros.

35

En la presente invención el término “alquilo” se refiere a una cadena alifática, lineal o ramificada, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Por ejemplo, este grupo puede ser metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, n-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene 1, 2, 3, o 4, átomos de carbono.

5

En la presente invención el término “halógeno” representa un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

10

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

Fig. 1. Efecto de BATKI-1C, BATKI-1G y erlotinib sobre la viabilidad en células CHO K1 *wild-type* o transfectadas de manera estable con *SLCO1B1* (OATP1B1). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control se representan como la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la *t* de Student.

25

Fig. 2. Efecto de BATKI-2C, BATKI-2G y sorafenib sobre la viabilidad en células CHO K1 *wild-type* o transfectadas de manera estable con *SLCO1B1* (OATP1B1). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control se representan como la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la *t* de Student.

30

Fig. 3. Efecto de BATKI-1C, BATKI-1G y erlotinib sobre la viabilidad en células CHO K1 transducidas con el vector vacío (pWPI) o con un plásmido con la ORF (“*open reading frame*”) de *SLCO1B3* (OATP1B3). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores

35

expresados en tanto % respecto al control se representan como la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la t de Student.

5 **Fig. 4.** Efecto de BATKI-2C, BATKI-2G y sorafenib sobre la viabilidad en células CHO K1 transducidas con el vector vacío (pWPI) o con un plásmido con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLCO1B3* (OATP1B3). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control se representan como la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la t de Student.

Fig. 5. Efecto de BATKI-1C, BATKI-1G y erlotinib sobre la viabilidad en células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 o Alexander transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control corresponden a la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la t de Student.

Fig. 6. Efecto de BATKI-2C, BATKI-2G y sorafenib sobre la viabilidad en células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 o Alexander transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control corresponden a la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la t de Student.

Fig. 7. Efecto de BATKI-1C, BATKI-1G y erlotinib sobre la viabilidad en células de colangiocarcinoma TFK-1 transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control corresponden a la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, † p<0.05; **, ††, p<0.01; ***, †††, p<0.01 en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente

mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 8. Efecto de BATKI-2C, BATKI-2G y sorafenib sobre la viabilidad en células de colangiocarcinoma TFK-1 transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). La viabilidad fue determinada tras 72h de incubación con concentraciones crecientes (de 0 a 100 μ M) de cada fármaco. Los valores expresados en tanto % respecto al control corresponden a la media $\pm$ EEM de n=4 experimentos con triplicados para cada condición. *, $\dagger$ $p < 0.05$; **, $\dagger\dagger$, $p < 0.01$; ***, $\dagger\dagger\dagger$, $p < 0.01$ en comparación con el control (células sin tratar) del grupo correspondiente mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 9. Efecto citostático de BATKI-1C (100 μ M), BATKI-1G (100 μ M), erlotinib (100 μ M), BATKI-2C (50 μ M), BATKI-2G (50 μ M), y sorafenib (50 μ M), en células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 o Alexander transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). Todas las células fueron expuestas a los fármacos durante 2 h. Los valores expresados en tanto % respecto al control (células con DMSO) son media $\pm$ EEM de 4 experimentos realizados con n=3 réplicas. *, $p < 0.05$ comparado con las células sin transportador tratadas con los compuestos mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 10. Efecto citostático de BATKI-1C (100 μ M), BATKI-1G (100 μ M), erlotinib (100 μ M), BATKI-2C (50 μ M), BATKI-2G (50 μ M), y sorafenib (50 μ M), en células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 o Alexander transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). Todas las células fueron expuestas a los fármacos durante 4 h. Los valores expresados en tanto % respecto al control (células con DMSO) son media $\pm$ EEM de 4 experimentos realizados con n=3 réplicas. *, $p < 0.05$ comparado con las células sin transportador tratadas con los compuestos mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 11 Efecto citostático de BATKI-1C (100 μ M), BATKI-1G (100 μ M), erlotinib (100 μ M), BATKI-2C (50 μ M), BATKI-2G (50 μ M), y sorafenib (50 μ M), en células de hepatocarcinoma humano PLC/PRF/5 o Alexander transducidas con el vector vacío (pWPI) o con la ORF (*“open reading frame”*) de *SLC10A2* (ASBT). Todas las células fueron expuestas a los fármacos durante 6 h. Los valores expresados en tanto % respecto al control (células con DMSO) son media $\pm$ EEM de 4 experimentos realizados con n=3 réplicas. *, $p < 0.05$ comparado con las células sin transportador tratadas con los compuestos mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 12. Captación neta de NIRBAD1 por diferentes transportadores enterohepáticos. Captación de NIRBAD1 (10 μ M) en ausencia (barras negras) o en presencia de

taurocolato (TCA 100 μ M, barras blancas) empleado como inhibidor, en cultivos de células CHO *wild-type* (CHO K1), CHO transducidas con un vector vacío (CHO pWPI), transfectadas de manera estable con *SLCO1B1* (OATP1B1), transducidas con un vector conteniendo la ORF de *SLCO1B3* (OATP1B3) y transducidas con la ORF de *SLC10A1* (NTCP). Los resultados obtenidos por citometría de flujo se representan como media $\pm$ EEM de 4 cultivos diferentes. *, $p < 0.05$ comparando con las células *wild-type* o †, $p < 0.05$ comparando con el control de captación en cada grupo experimental mediante el test de la *t* de Student.

Fig. 13. Inhibición de la captación de CGamF (colilglicilamidofluoresceína) 1 μ M (barra blanca) por el transportador OATP1B3 (*SLCO1B3*) en presencia de 10 μ M de BATKI-1C, BATKI-1G, BATKI-2C, BATKI-2G y NIRBAD1 (barras negras). Los resultados obtenidos por citometría de flujo se representan como el porcentaje de captación neta de CGamF en cultivos de células CHO *wild-type* (CHO K1) transducidas con un plásmido con la ORF ("open reading frame") de *SLCO1B3* (OATP1B3) en ausencia de inhibidores (barra blanca) y corresponden a la media $\pm$ EEM de 4 cultivos diferentes. **, $p < 0.01$ comparando con el control de captación en cada grupo experimental mediante el test de Bonferroni.

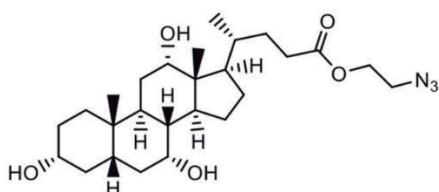
EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

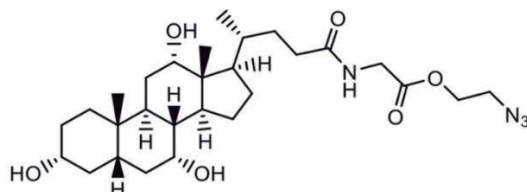
Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos de la invención BATKI-1C y BATKI-1G

Para la síntesis de los compuestos BATKIs fue necesaria la preparación de las azidas derivadas de los ácidos biliares, preferentemente del ácido cólico y del ácido glicocólico, que pueden obtenerse mediante el método descrito por Z. Zhang y colaboradores (Zhang Z et al, *Chemistry Letters*, **2007**, 36 (12):1450).

Azida derivada del ácido cólico:

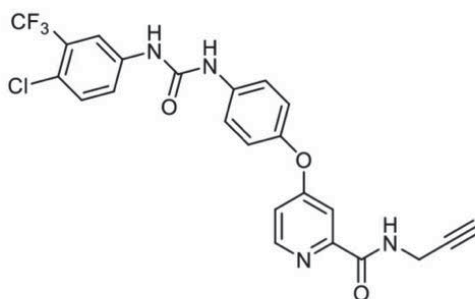


Azida derivada del ácido glicocólico:



Como inhibidor de receptor con actividad tirosina kinasa, en la realización de los compuestos designados como BATKI-1C y BATKI-1G, se empleó el erlotinib (CAS 183321-74-6) adquirido comercialmente y para los compuestos BATKI-2C y BATKI-2G se empleó un derivado acetilénico del sorafenib (CAS 284461-73-0).

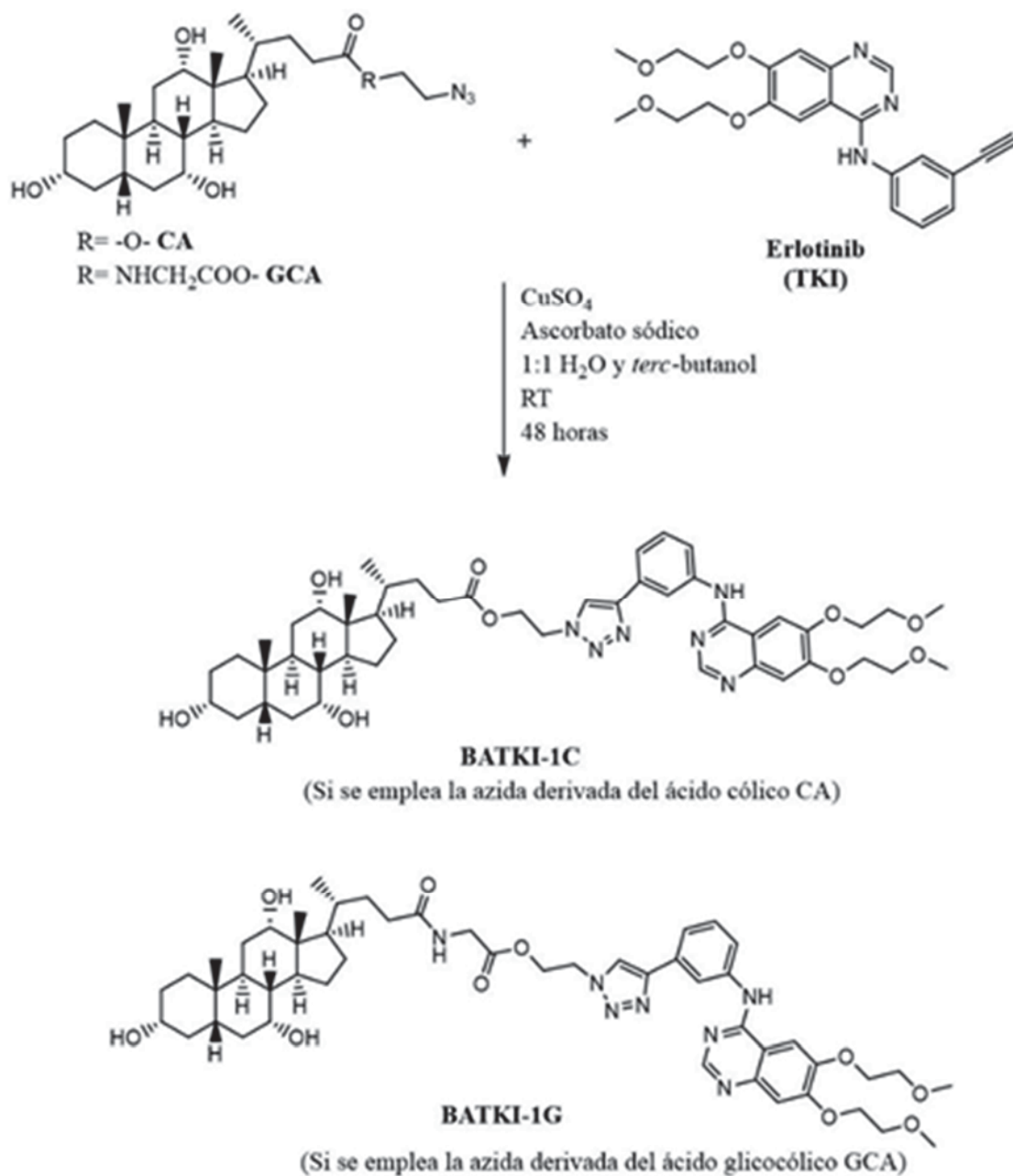
Para la preparación del derivado acetilénico de sorafenib, fue necesario utilizar como material de partida el éster metílico derivado del sorafenib en la posición 2 del anillo de piridina utilizando el método descrito en la bibliografía (Yao J et al, *Bioorg Med Chem*, **2012**, 1;20(9):2923-9). Posteriormente, la adición del acetileno se llevó a cabo mediante una reacción de aminolisis con propargilamina empleando 4 equivalentes respecto al éster metílico, durante 9 días a una temperatura de 4°C en THF, obteniendo el derivado apto para la *química click*, descrito en la patente: **WO 2018/200981 A1**:



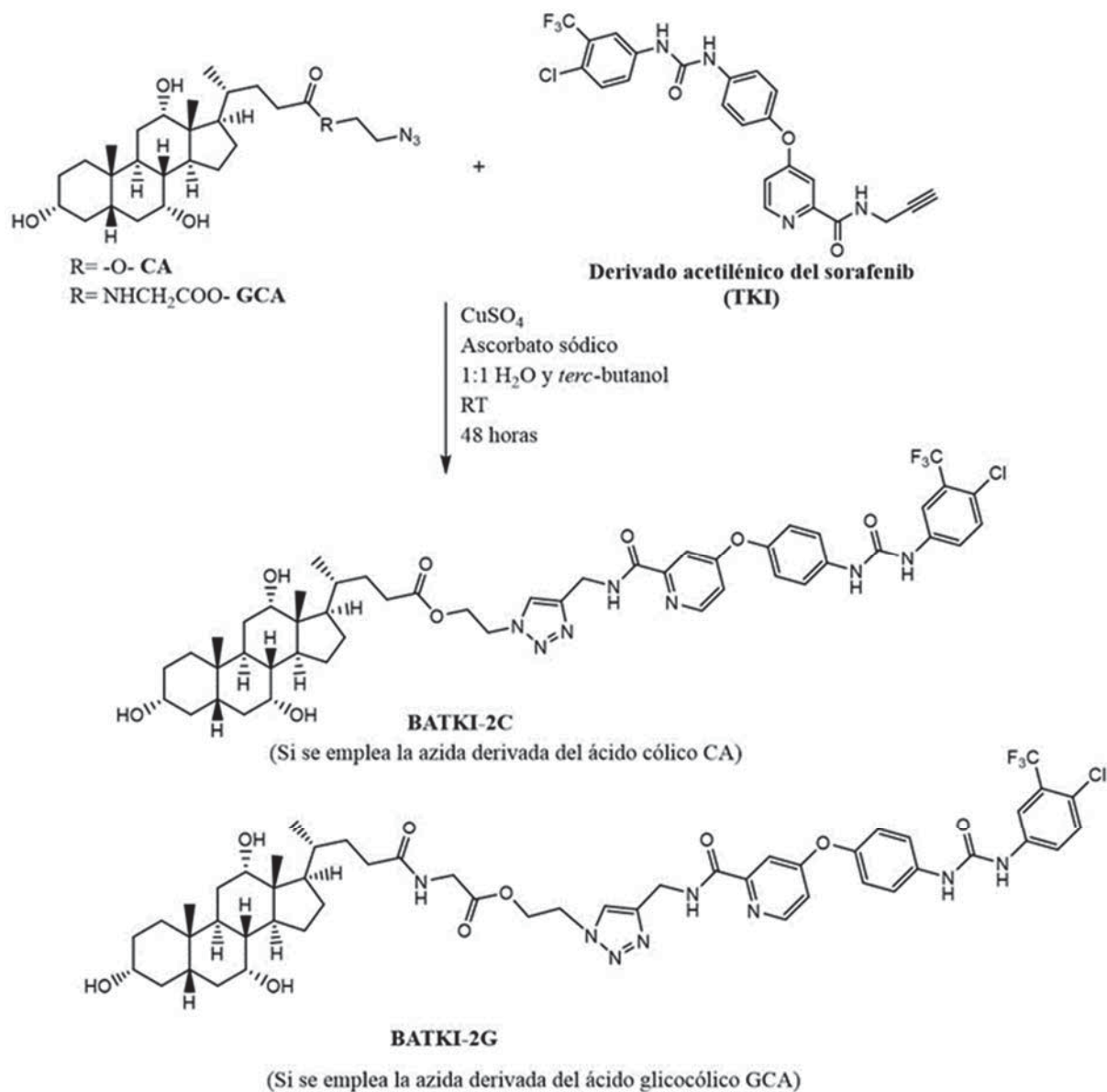
Para la síntesis de los compuestos BATKI-1C y BATKI-2C se utilizó una relación 1.2:1 de la azida obtenida a partir del ácido cólico respecto del derivado acetilénico del inhibidor de tirosina kinasa, empleando una mezcla de 1:1 de H₂O y *tert*-butanol como solvente, a temperatura ambiente (RT), mientras que para los compuestos BATKI-1G y BATKI-2G se empleó la azida derivada del ácido glicocólico.

Para que la reacción se llevara a cabo, fue necesario Cu (I) como catalizador; para ello se añadió CuSO₄·5H₂O y ascorbato de sodio en proporciones 0.1:1 respecto al TKI. La función del ascorbato de sodio es actuar como reductor, reduciendo el Cu(II) a Cu(I) y generando *in situ* el catalizador de la reacción (Rostovtsev VV et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, **2002** 15;41(14):2596-9).

Esquema 1. Síntesis de los compuestos BATKI-1C y BATKI-1G



Esquema 2. Síntesis de los compuestos BATKI-2C y BATKI-2G



5

Tras 48 horas de reacción a temperatura ambiente, se purificó el producto de reacción mediante cromatografía preparativa flash sobre gel de sílice, obteniéndose compuestos distintos a los de partida. Los RMN ^1H confirmaron la presencia mayoritaria de unos productos compatibles con los compuestos BATKI-1C, BATKI-1G, BATKI-2C y BATKI-2G.

10

Las señales correspondientes a los compuestos en RMN ^1H son:

BATKI-1C (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,45 (3H, s); 0,71 (3H, s); 0,82 (3H, d, J= 5,9 Hz); 0,79-2,24 (24H, m); 3,15 (1H, m); 3,35 (3H, s); 3,37 (3H, s); 3,58 (1H, m); 3,68 (1H, m); 3,74 (2H, t, J= 4 Hz); 3,78 (2H, t, J= 4 Hz); 3,93 (1H, s); 4,03 (1H, s); 4,29 (5H m); 4,46 (2H, t, J= 4 Hz); 4,69 (2H, t, J= 4 Hz); 7,22 (1H, s); 7,44 (1H, t, J= 8 Hz); 7,53 (1H, d, J= 8 Hz); 7,90 (1H, d, J= 8 Hz); 7,93 (1H, s); 8,29 (1H, s); 8,48 (1H, s); 8,58 (1H, s); 9,57 (1H, s).

BATKI-1G (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,51 (3H, s); 0,77 (3H, s); 0,86 (3H, d, J= 6,1 Hz); 0,79-2,24 (24H, m); 3,16 (1H, m); 3,35 (3H, s); 3,37 (3H, s); 3,56 (1H, m); 3,72 (1H, m); 3,74 (2H, t, J= 8Hz); 3,79 (4H, m); 3,96 (1H, s); 4,05 (1H, s); 4,29 (6H, m); 4,50 (2H, t, J= 4 Hz); 4,69 (2H, t, J= 4 Hz); 7,21 (1H, s); 7,45 (1H, t, J= 8 Hz); 7,56 (1H, d, J= 8 Hz); 7,90 (1H, d, J=8 Hz); 7,92 (1H, s); 8,23 (1H, t, J= 4 Hz); 8,29 (1H, s); 8,47 (1H, s); 8,59 (1H, s); 9,55 (1H, s).

BATKI-2C (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,45 (3H, s); 0,71 (3H, s); 0,83 (3H, d, J= 6,1 Hz); 0,79-2,24 (24H, m); 3,16 (1H, m); 3,58 (1H, m); 3,73 (1H, sa); 3,98 (1H, s); 4,07 (1H, s); 4,32 (1H, m); 4,36 (2H, t, J= 4 Hz); 4,50 (2H, d, J= 6 Hz); 4,57 (2H, t, J= 4 Hz); 7,15 (2H, AA'BB', J= 8,8 Hz); 7,16 (1H, dd, J= 2,5 y 5,6 Hz); 7,40 (1H, d, J= 2,5 Hz); 7,58 (2H, d, J= 8,8 Hz); 7,59 (2H, AA'BB', J= 8,8 Hz); 7,65 (1H, dd, J= 2,2 y 8,8 Hz); 7,94 (1H, s); 8,11 (1H, d, J= 2,2 Hz); 8,51 (1H, d, J= 5,6 Hz); 9,08 (1H, s); 9,20 (1H, t, J 6,0 Hz); 9,32 (1H,s).

BATKI-2G (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0,55 (3H, s); 0,79 (3H, s); 0,89 (3H, d, J= 6,2 Hz); 0,79-2,24 (24H, m); 3,17 (1H, m); 3,59 (1H, m); 3,73 (2H, t, J=8); 3,74 (1H, m); 3,99 (1H, s); 4,08 (1H, s); 4,31 (2H, d, J= 4Hz); 4,39 (2H, t, J= 4 Hz); 4,51 (2H, d, J= 6 Hz); 4,57 (2H, t, J= 4 Hz); 7,15 (2H, AA'BB', J= 8,8 Hz); 7,16 (1H, dd, J= 2,5 y 5,5 Hz); 7,40 (1H, d, J= 2,5 Hz); 7,59 (2H, AA'BB', J= 8,8 Hz); 7,60 (1H, d, J= 8,8 Hz); 7,64 (1H, dd, J= 2,2 y 8,8 Hz); 7,98 (1H, s); 8,11 (1H, d, J= 2,2 Hz); 8,19 (1H, t, J= 4 Hz); 8,50 (1H, t, J= 5,5 Hz); 9,20 (1H, t, J 6,0 Hz); 9,48 (1H, s); 9,79 (1H, s).

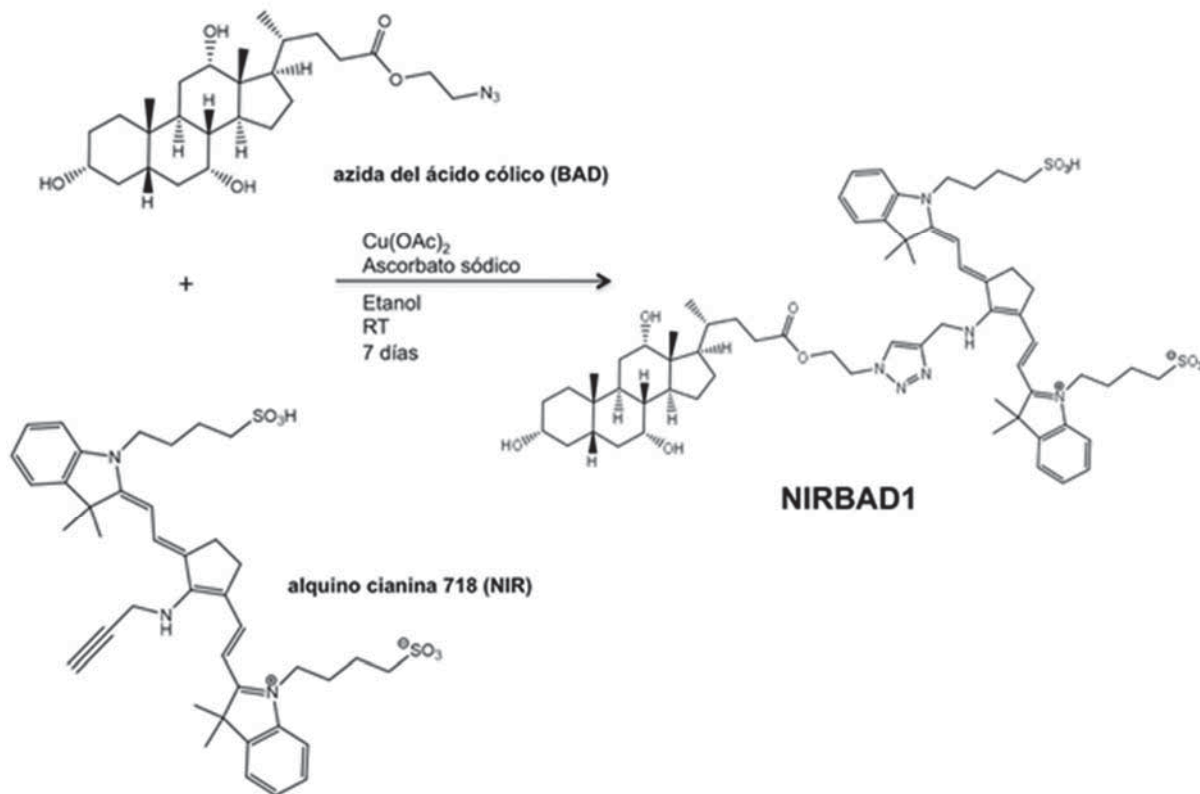
Los análisis por espectrometría de masas en polaridad positiva verificaron los siguientes resultados: se encontró una masa de 871.4991 (M+H) $^+$ para el compuesto BATKI-1C ($\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_9$ masa calculada de 871.4970), de 928.5143 (M+H) $^+$ para el BATKI-1G ($\text{C}_{50}\text{H}_{70}\text{N}_7\text{O}_{10}$ masa calculada de 928.5184), de 966.4136 (M+H) $^+$ para el BATKI-2C ($\text{C}_{49}\text{H}_{60}\text{O}_8\text{N}_7\text{ClF}_3$ calculada de 966.4144) y de 1045.4153 (M+Na) $^+$ para el BATKI-2G ($\text{C}_{51}\text{H}_{62}\text{O}_9\text{N}_8\text{ClF}_3\text{Na}$ calculada de 1045.4178).

Ejemplo 2. Actividad *in vitro* de los compuestos de la invención

- Para el estudio de la actividad antineoplásica de los compuestos sintetizados se realizaron experimentos *in vitro* de viabilidad a 72 horas, utilizando como modelo de vectorización enterohepática de fármacos, líneas celulares que sobreexpresaban los transportadores de aniones orgánicos OATP1B1 (*SLCO1B1*, Figuras 1 y 2) y OATP1B3 (*SLCO1B3*, Figuras 3 y 4). Como modelos vectorizados de cáncer hepático, se emplearon células PLC/PRF/5 o Alexander de hepatocarcinoma (Figura 5 y 6) y TFK-1 de colangiocarcinoma (Figura 7 y 8) que sobreexpresaban el transportador de ácidos biliares ASBT (*SLC10A2*). En ellas se ha podido comprobar que los compuestos de la invención (BATKI-1C, BATKI-1G, BATKI-2C, BATKI-2G) conservan la actividad antitumoral del principio activo de partida (erlotinib y sorafenib) en los ensayos de viabilidad a 72 horas (Figuras 1-8), así como en exposiciones a tiempos cortos (2, 4 y 6 horas, Figuras 9-11). Los BATKIs ejercen un efecto citotóxico superior en las líneas celulares que expresan los transportadores de entrada de los ácidos biliares, en comparación con las líneas que carecen de ellos, lo que demuestra su ventaja para entrar en la célula tumoral y, por tanto, su vectorización (Figuras 9-11).
- También se han llevado a cabo experimentos de captación por la técnica de citometría de flujo para evaluar de manera indirecta la actividad funcional de estas moléculas. Para ello, se han empleado como modelo *in vitro* las líneas celulares descritas anteriormente, y como moléculas sustrato derivados fluorescentes de ácidos biliares, entre ellos, una molécula de reciente síntesis en nuestro laboratorio denominada NIRBAD1, que puede servir de trazadora de la habilidad de las células para captar los BATKIs (**Solicitud de patente n°202031262**: Sondas para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real).

El compuesto NIRBAD1 se sintetizó mediante *química click* utilizando una relación 1.5:1 de la azida derivada del ácido cólico que se presenta en el siguiente esquema y la alquinocianina 718, empleando etanol como solvente. Como catalizador de la reacción se utilizó Cu(I), obtenido mediante la combinación de acetato de Cu(II) y ascorbato sódico en proporción 0.4:1.5 de equivalentes respecto de la alquinocianina 718, para la generación *in situ* de Cu(I).

Esquema 3. Síntesis del compuesto NIRBAD1

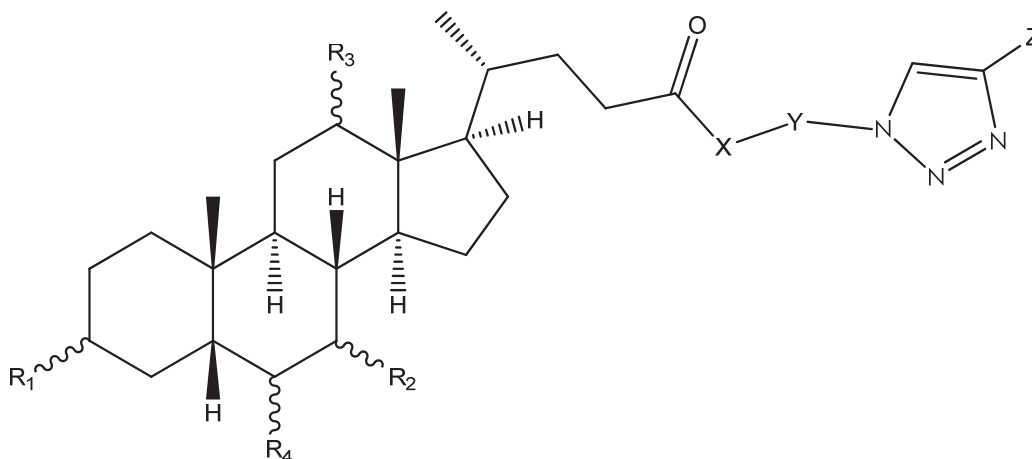


- 5 Mediante experimentos de citometría de flujo, se observó que moléculas con una estructura análoga a los BATKIs (BAD unido covalentemente a un fluorocromo en el IR cercano con la *química click*, NIRBAD1) pueden ser captadas por células que sobreexpresan el transportador OATP1B3, ya que, como se observa en la Figura 12, las células CHO 1B3 incubadas con la molécula trazadora presentan mayor captación neta
- 10 del fluorocromo que las líneas que no lo expresan (CHO pWPI) o que expresan otros transportadores de captación de ácidos biliares (NTCP y OATP1B1). Además, la captación de NIRBAD1 por OATP1B3 es inhibible por el ácido biliar natural taurocólico (TCA). Por otra parte, a su vez, los compuestos de la invención (BATKIs) son capaces de inhibir la captación de sustratos característicos de esta proteína de membrana, como
- 15 es el CGamF (colilglicilamidofluoresceína, Holzinger F et al., *Hepatology*, **1997** 26(5):1263-71), lo que indica que podrían ser sustratos de la misma y, por tanto, confirmaría su vectorización hepática (Figura 13).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

5



Fórmula (I)

donde R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de entre H y OH;

10 R_4 se selecciona de entre H, OH y CH_2CH_3 ;

X se selecciona de entre O, S, NR' , $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COO}$, O-CO, y HNSO_2 ;

Y es un espaciador que se selecciona entre $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n-$, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF_3 , alquilo C_1-C_6 , S-alquilo C_1-C_6 , halógeno, CN, O-alquilo C_1-C_6 , NO_2 , COO -alquilo C_1-C_6 , NHCO -alquilo C_1-C_6 , NH_2 y NH -alquilo C_1-C_6 ;

15

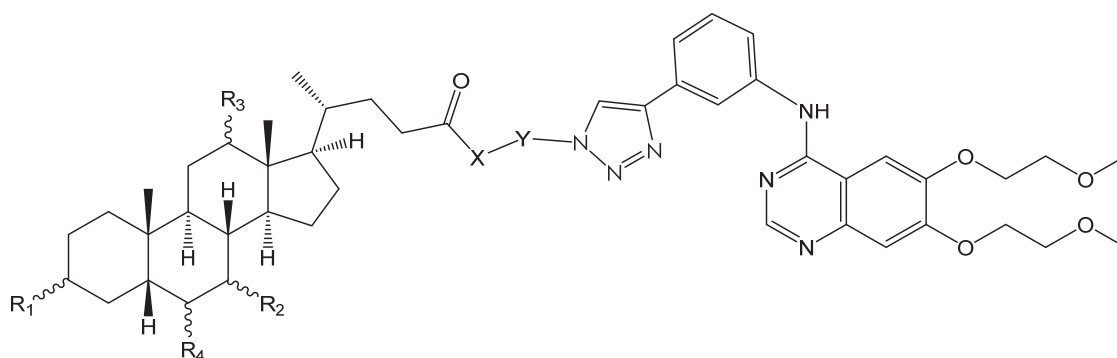
Z es un inhibidor de receptores con actividad tirosina kinasa;

n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C_1-C_6) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF_3 , halógeno, CN, y NO_2 .

20

2. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula (Ia), donde Z es erlotinib:

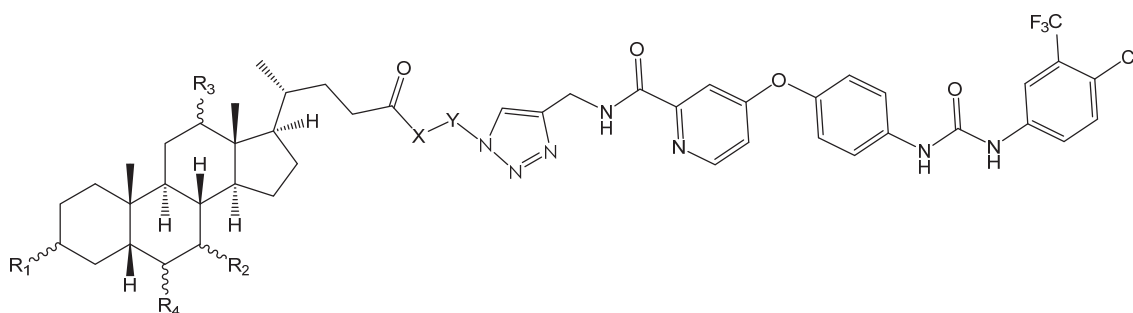


Fórmula (Ia)

donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X e Y se definen en la reivindicación 1.

5

3. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula (Ib), donde Z es sorafenib:



Fórmula (Ib)

10

donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , X e Y se definen en la reivindicación 1.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde R_1 , R_2 y R_3 es OH.

15

5. Compuesto según la reivindicación anterior donde los grupos hidroxilo en las posiciones R_1 , R_2 y R_3 se encuentran en posición α .

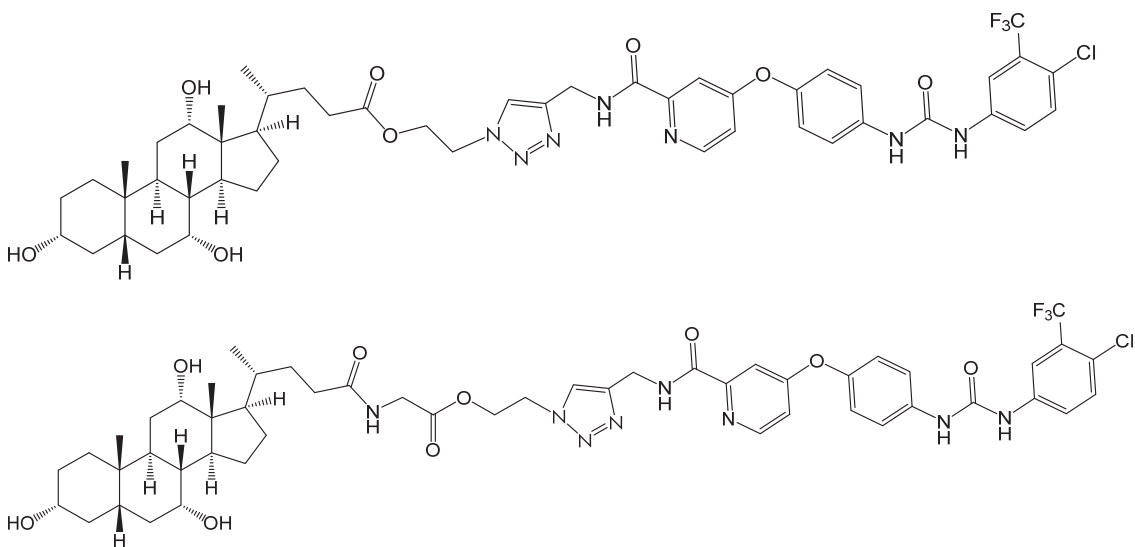
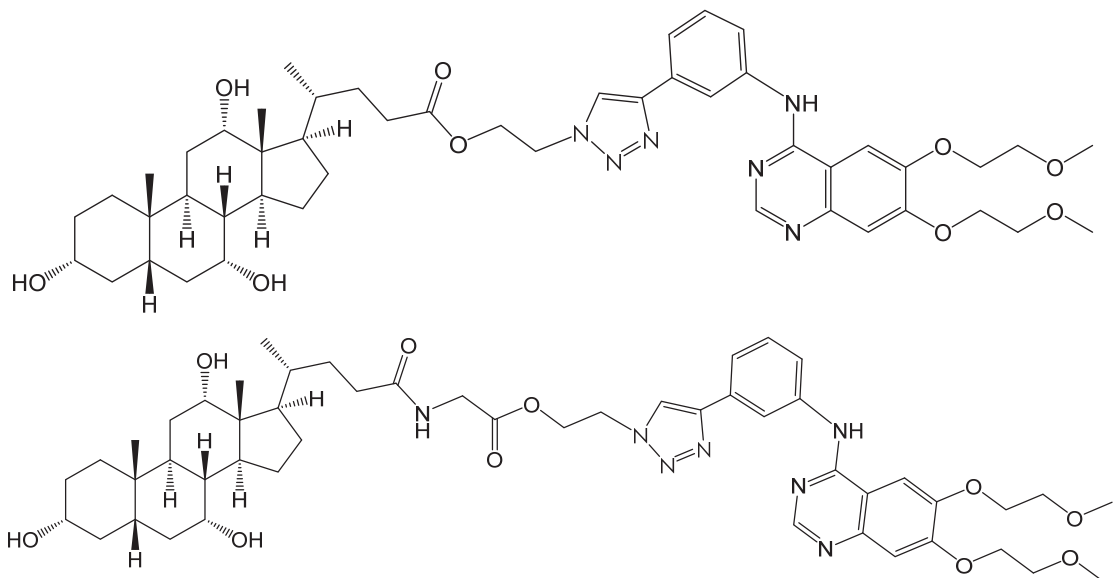
6. Compuesto cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde R_4 es H.

20

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde X es O o NHCH_2COO .

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde Y es $-(CH_2)_2-$

9. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



10 10. Composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Composición según reivindicación 10 caracterizada por estar configurada para poder administrarse de forma intravenosa, intraperitoneal u oral.

15

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de la composición

descrita según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, para su uso como medicamento.

5 13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, para su uso en el tratamiento de cáncer digestivo o hepático.

14. Compuesto o composición para su uso según la reivindicación 13, donde el cáncer digestivo es adenocarcinoma de estómago o colon.

10 15. Compuesto o composición para su uso según la reivindicación 13, donde el cáncer hepático es primario o metastásico.

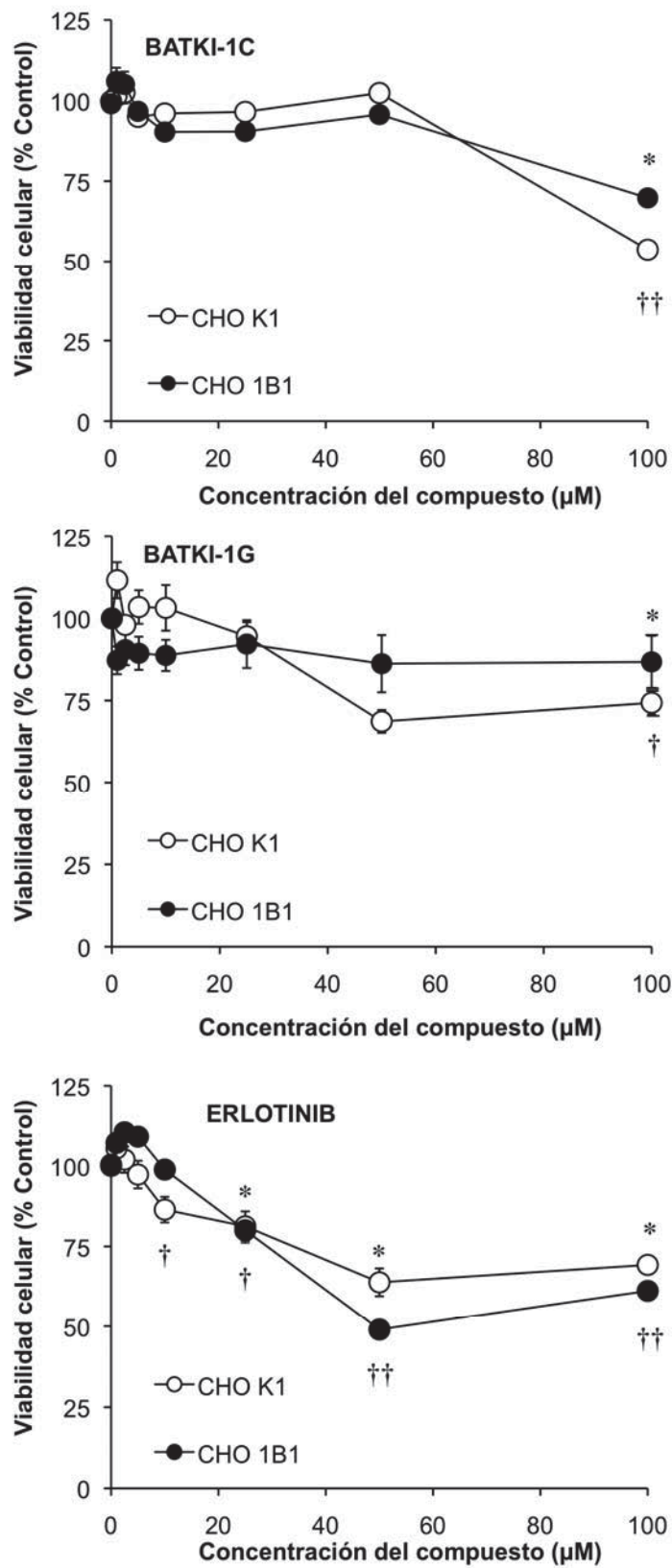


FIG. 1

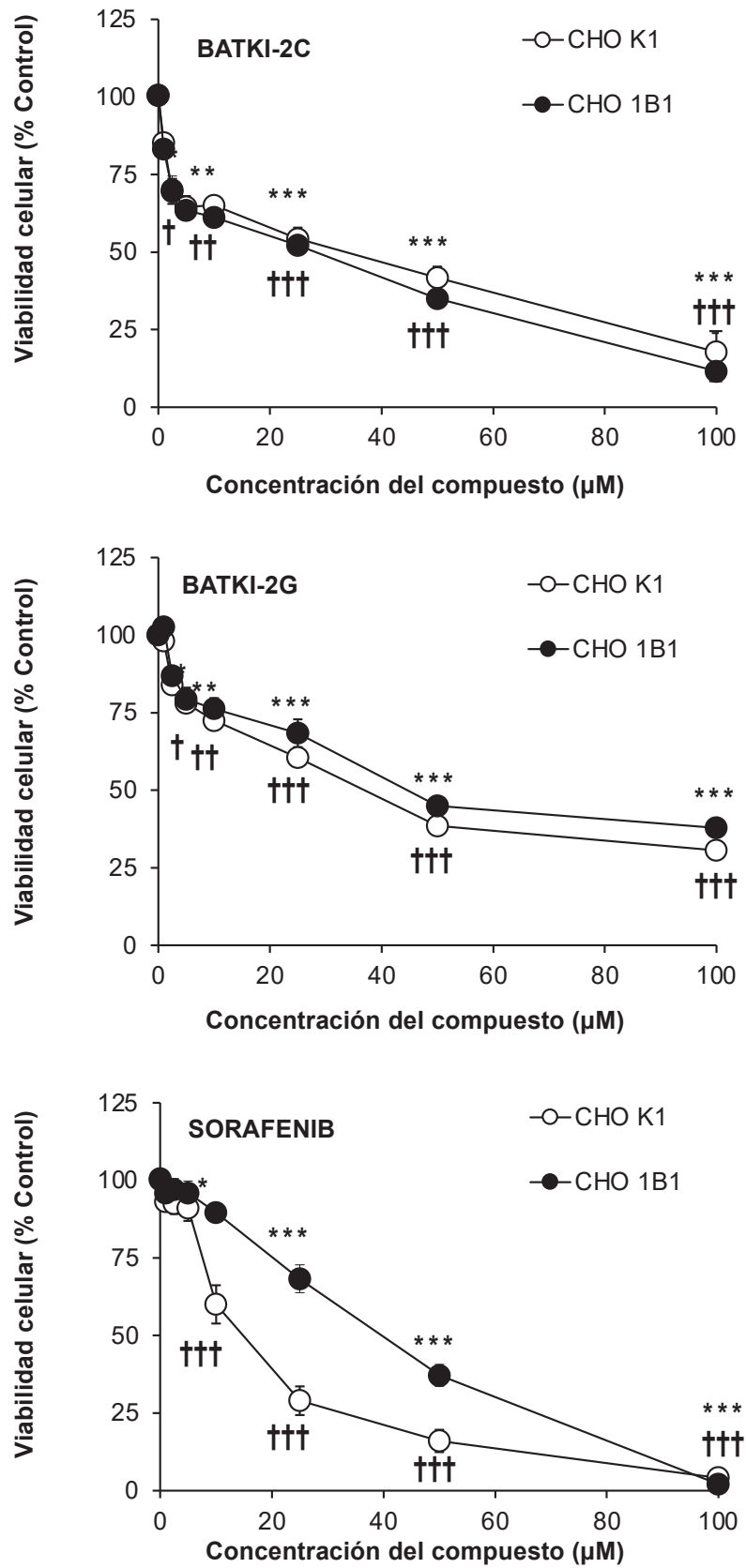


FIG. 2

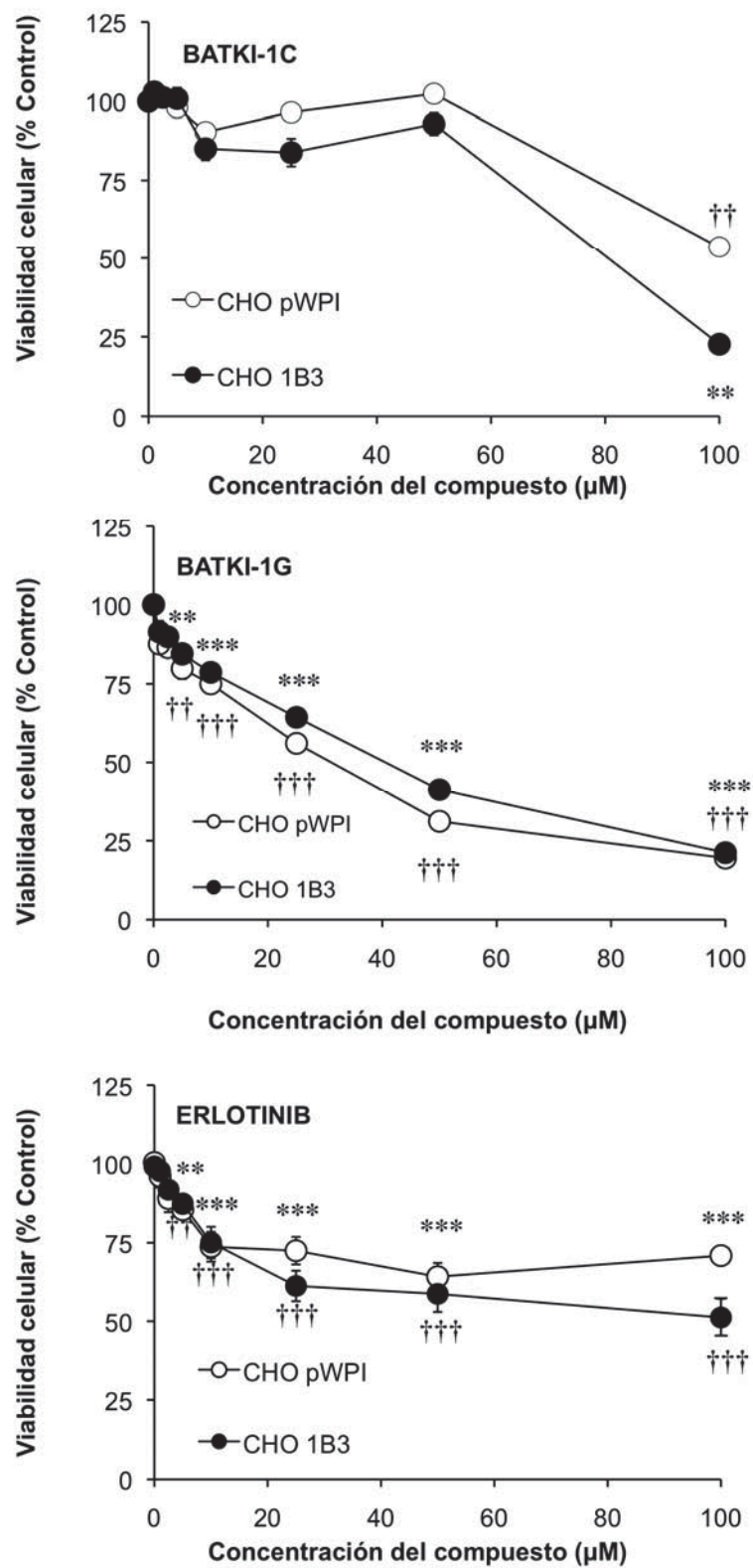


FIG. 3

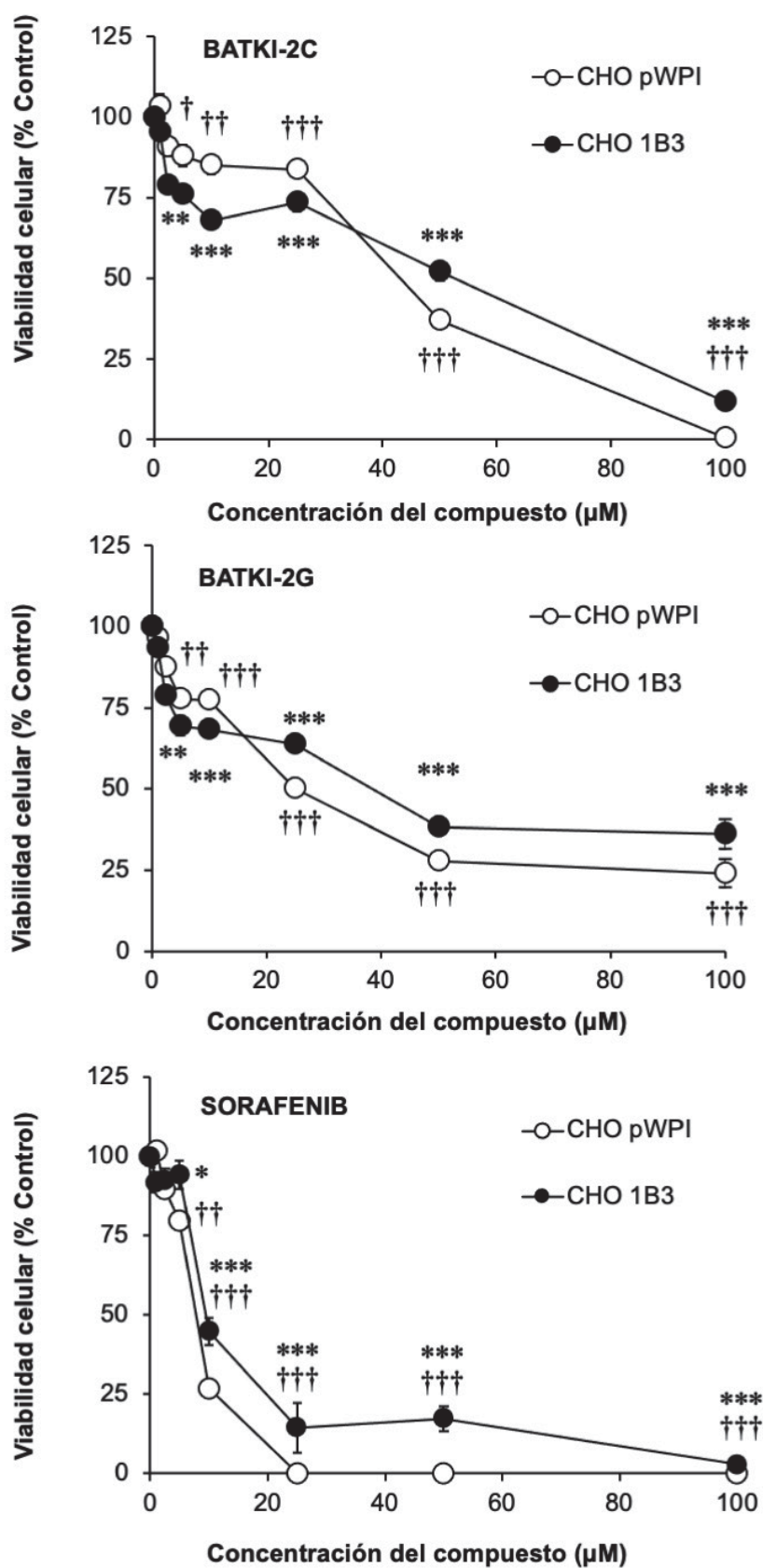


FIG. 4

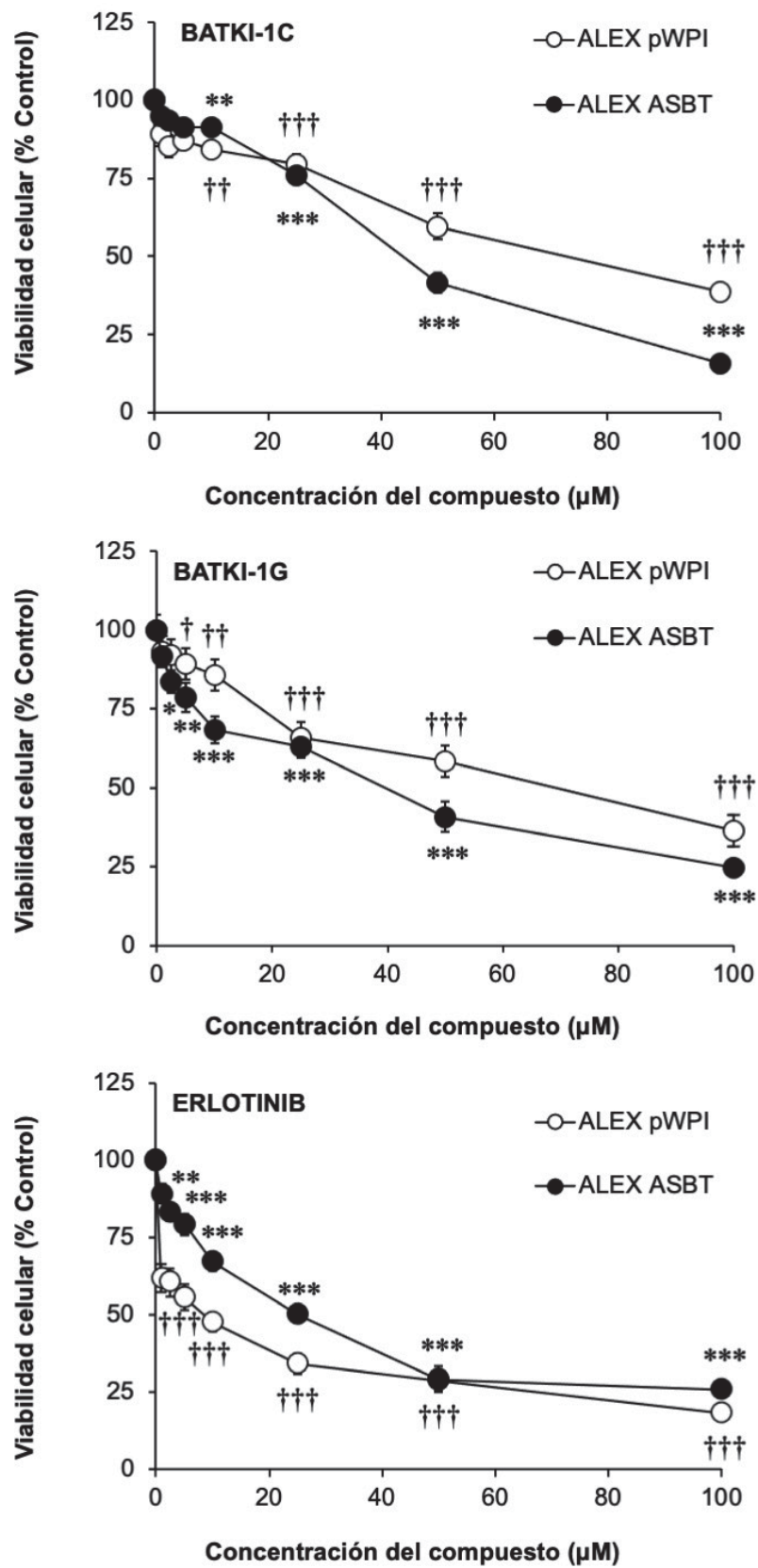


FIG.5

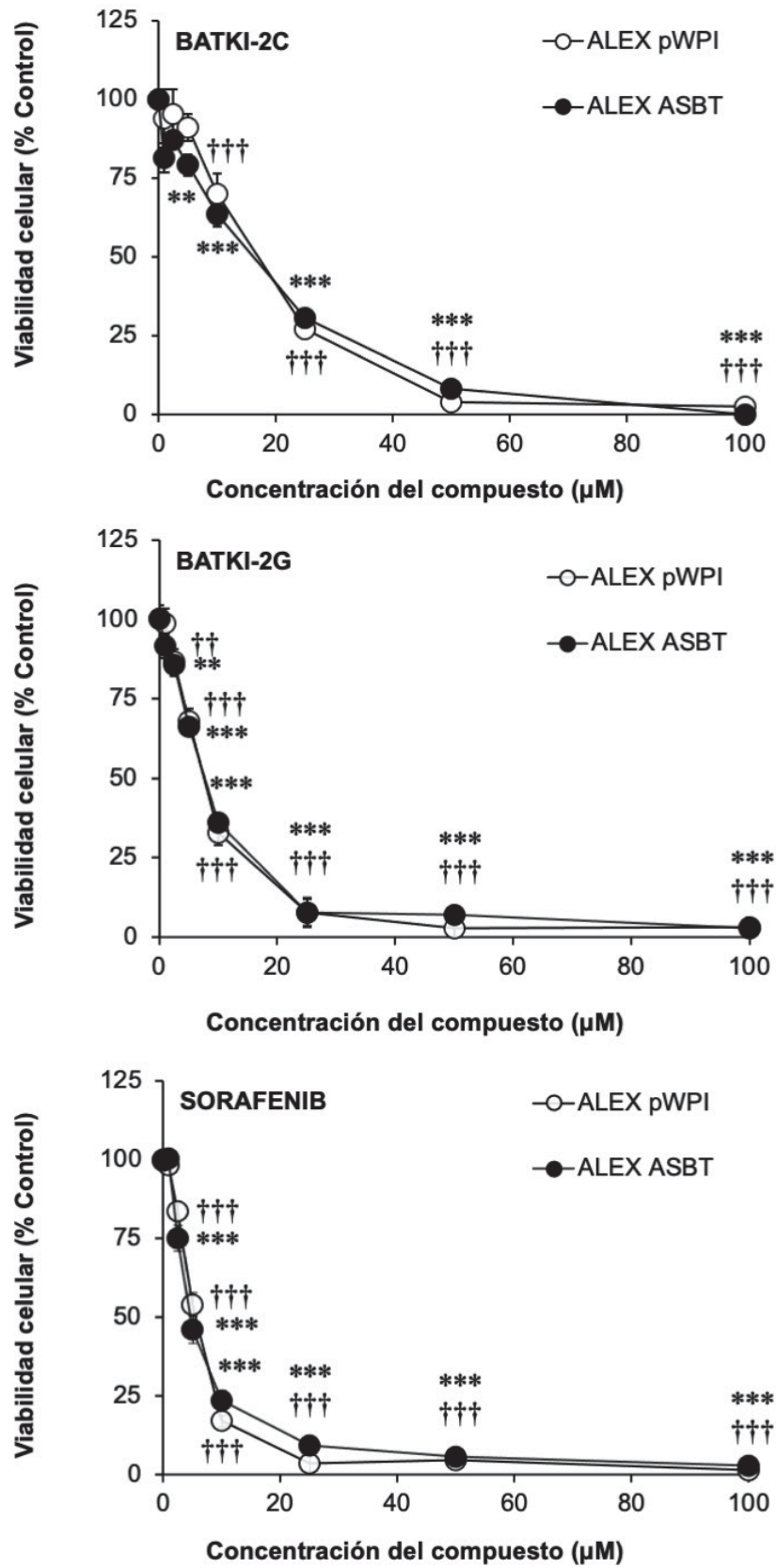


FIG. 6

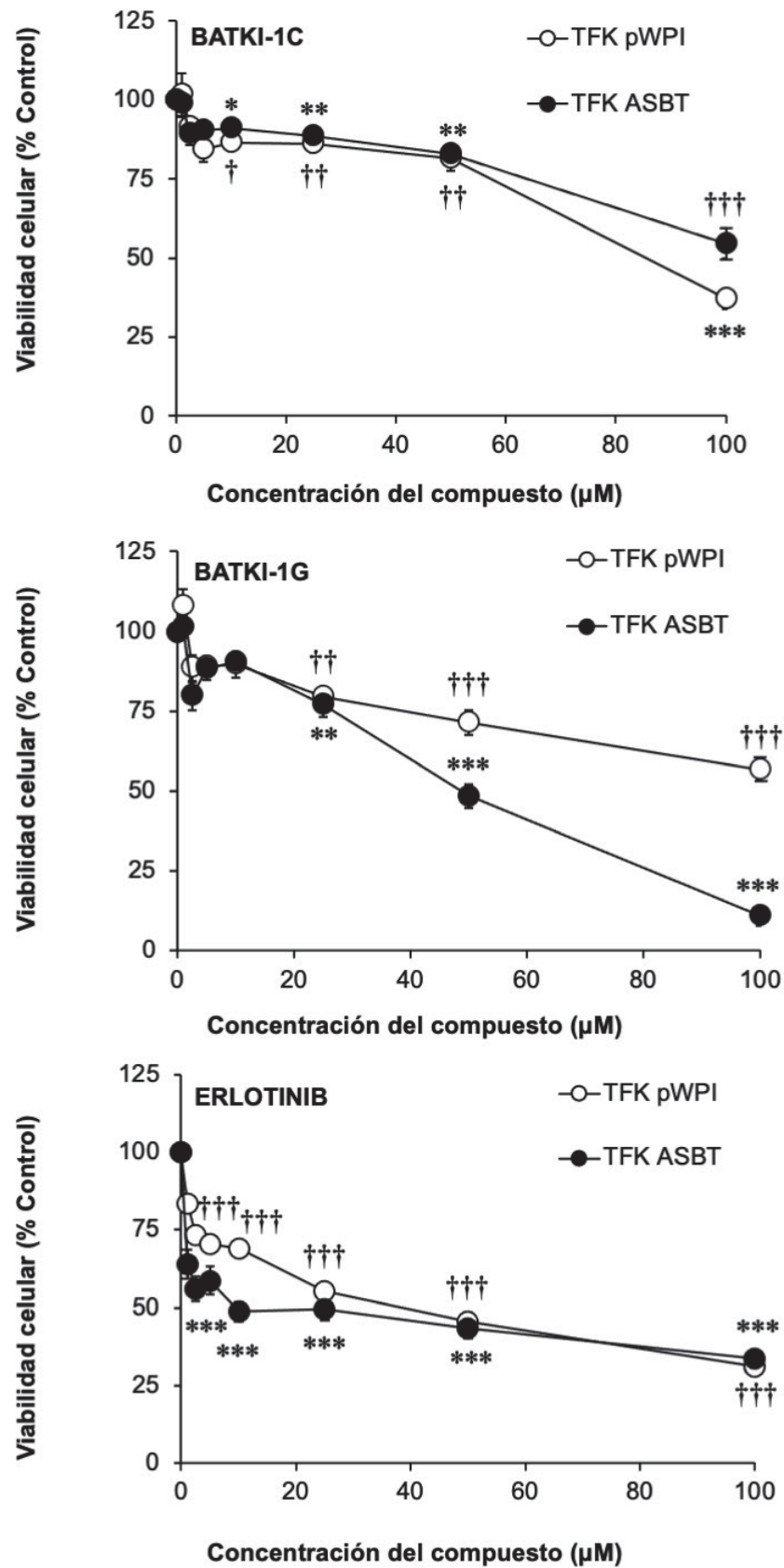


FIG. 7

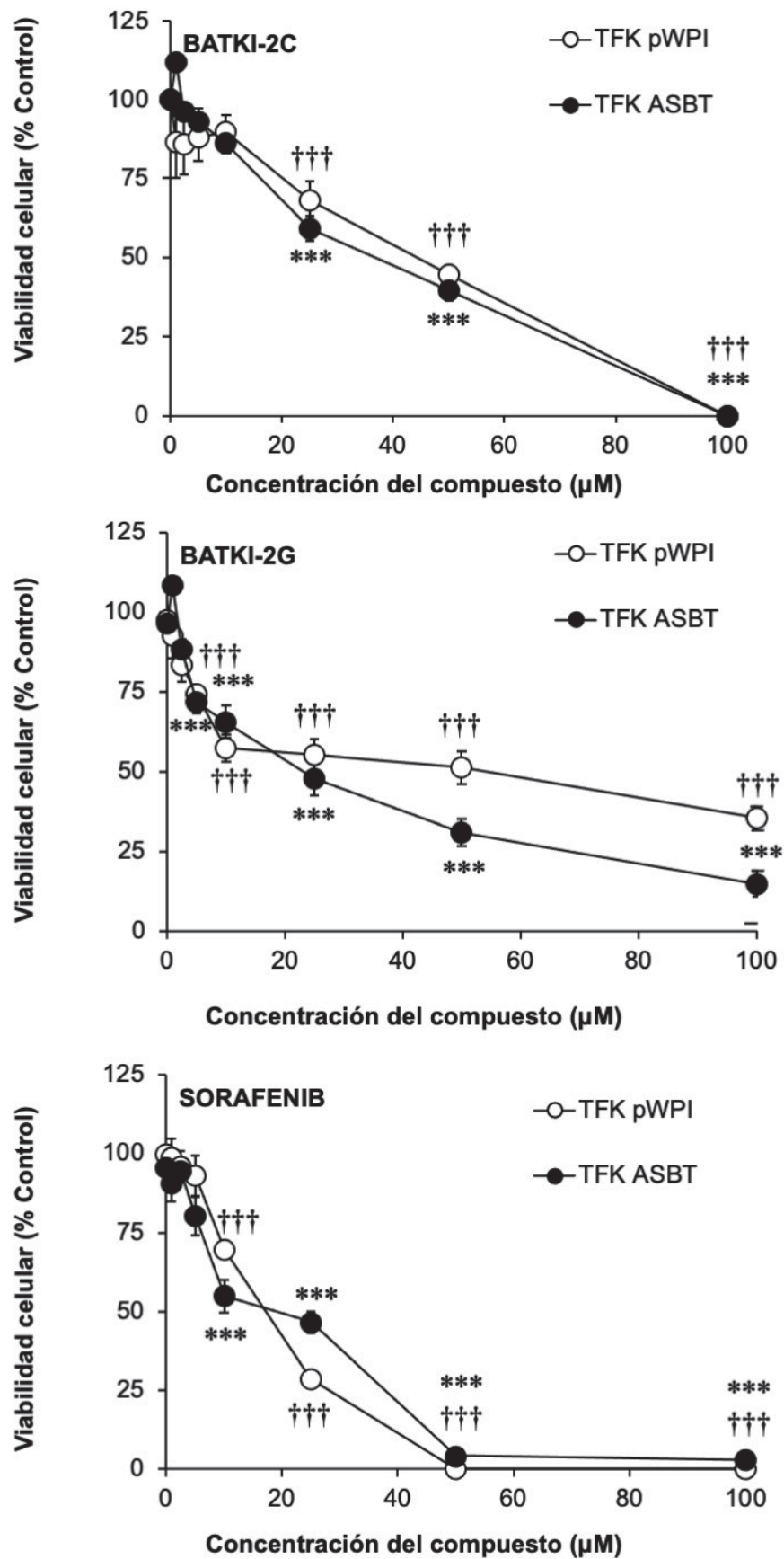


FIG. 8

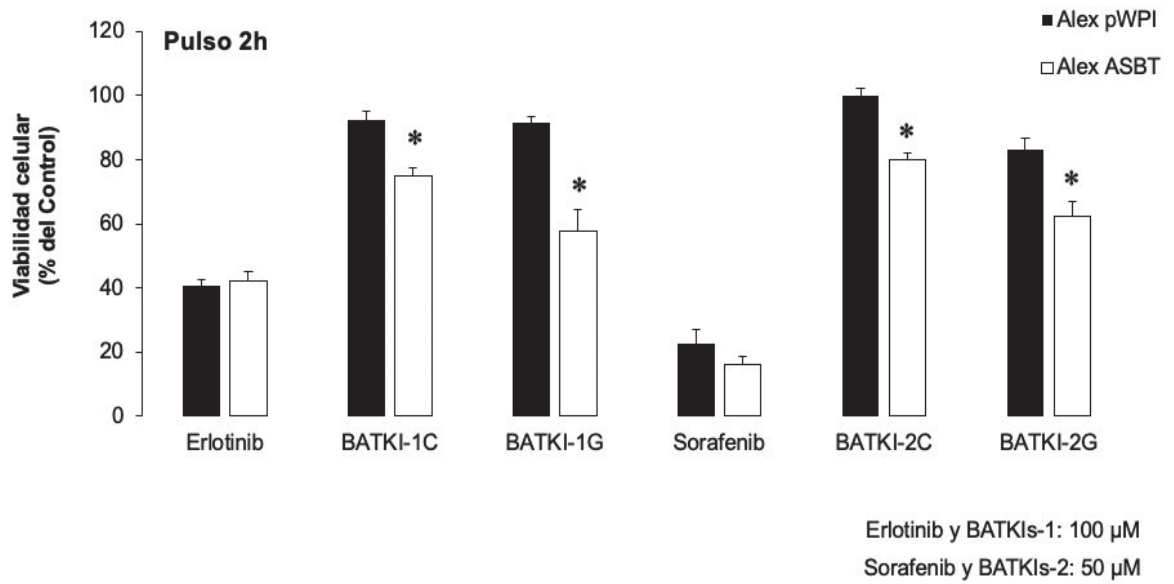


FIG. 9

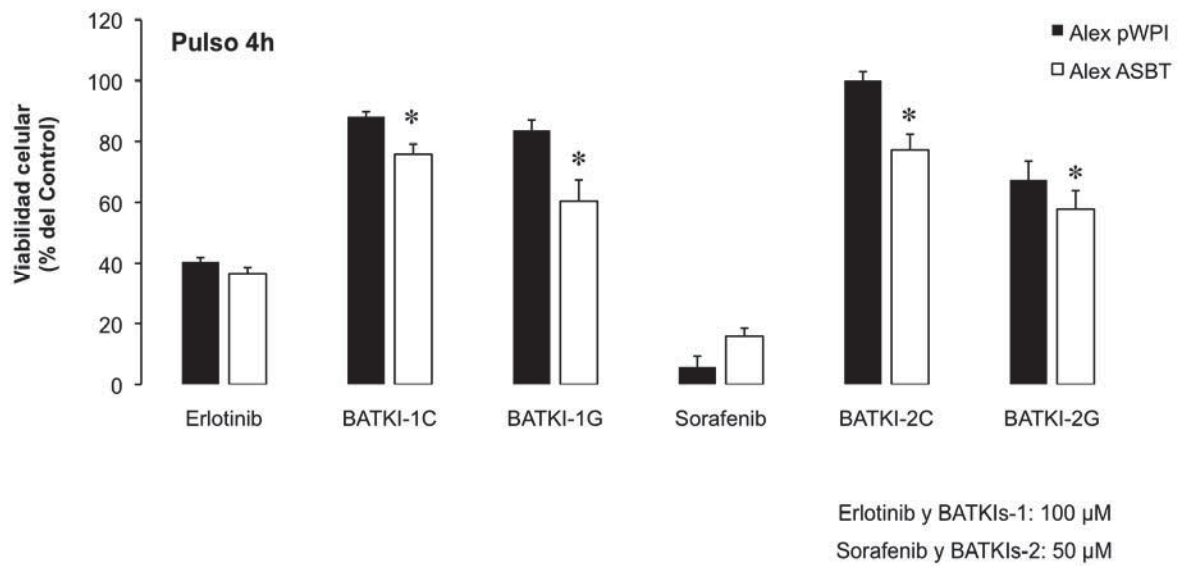


FIG. 10

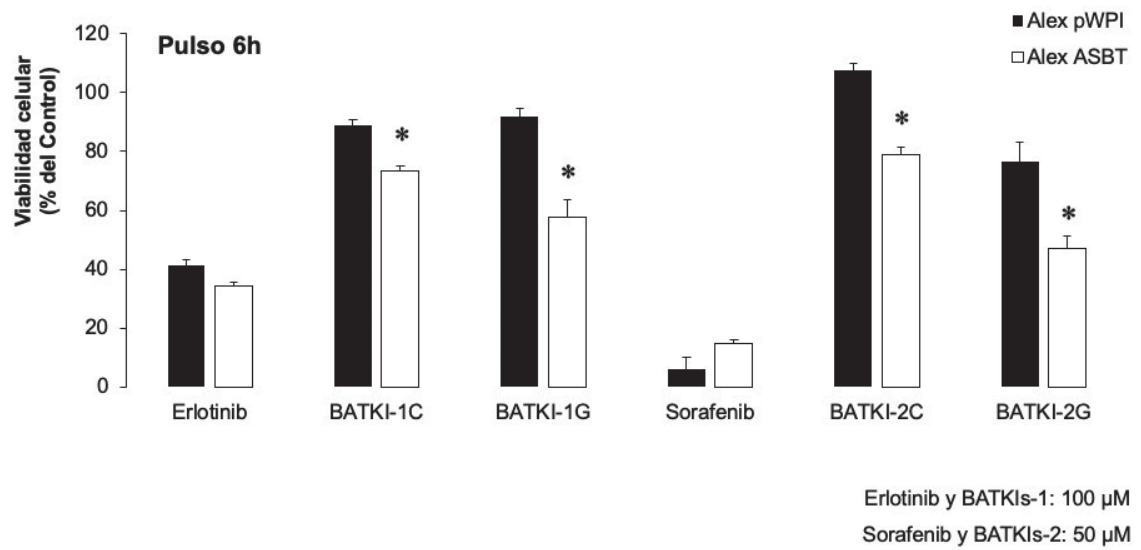


FIG. 11

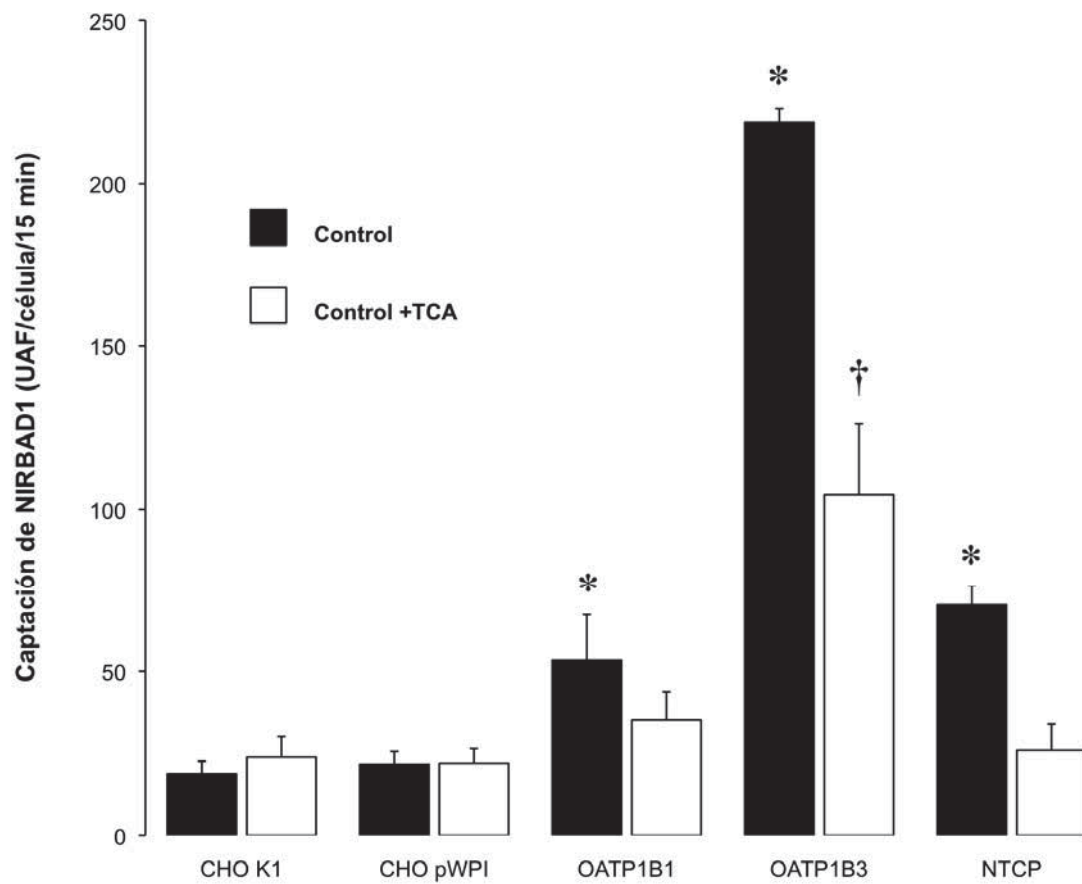


FIG. 12

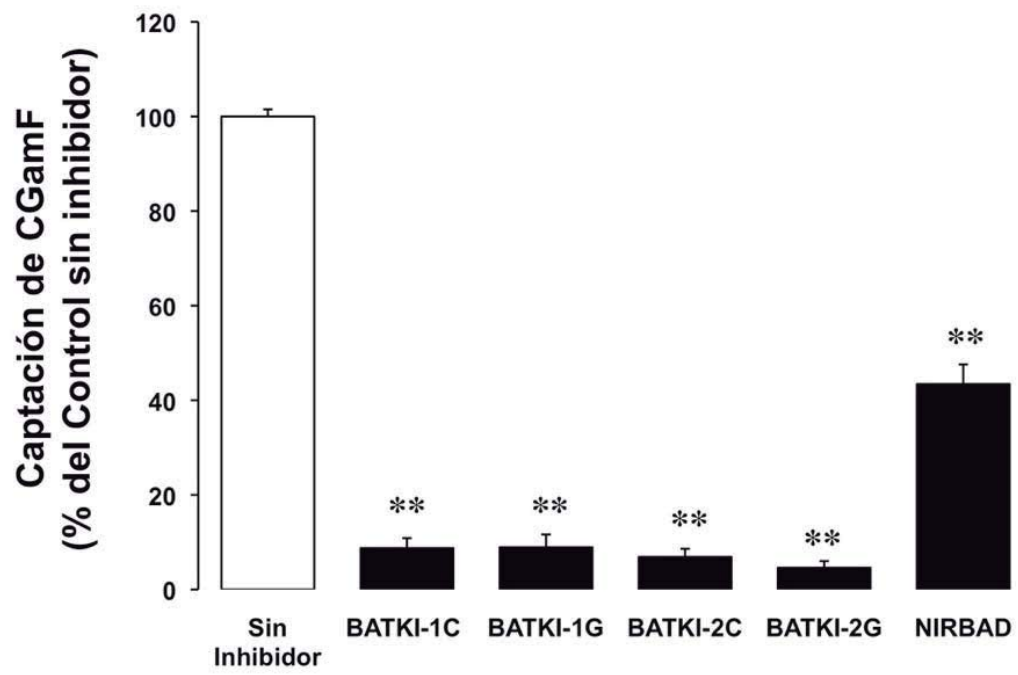


FIG. 13