

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 837**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4192 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

C07D 249/00 (2006.01)

C07D 405/04 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2017** **PCT/US2017/029921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017** **WO17189893**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2017** **E 17790459 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.12.2021** **EP 3448380**

54 Título: **1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos son inhibidores de las GTPasas Rac/Cdc42**

30 Prioridad:

27.04.2016 US 201662328282 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.04.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF PUERTO RICO (100.0%)
Carretera 1, Esquina Carretera 8838, Sector El
Cinco
San Juan 00926, US

72 Inventor/es:

VLAAR, CORNELIS P.;
DHARMAWARDHANE FLANAGAN,
SURANGANIE;
HERNANDEZ-O'FARRILL, ELIUD y
CASTILLO-PICHARDO, LINETTE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 907 837 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

1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos son inhibidores de las GTPasas Rac/Cdc42

Antecedentes

5 Se desvelan compuestos que inhiben las Rho GTPasas que son útiles para inhibir las enfermedades hiperprofesionales y neoplásicas. En concreto, los compuestos inhiben las GTPasas Rac y Cdc42, que están hiperactivas o sobreexpresadas en las vías de señalización del cáncer y la metástasis. Se desvelan los compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 Las Rho GTPasas Rac (sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras) y Cdc42 (homóloga de la proteína de control de la división celular 42) regulan las funciones celulares que rigen la malignidad del cáncer, que incluyen la polaridad celular, la migración y la progresión del ciclo celular. La familia Rho de GTPasas en los seres humanos consiste en 20 miembros diferentes, y el comportamiento aberrante de su actividad reguladora ha sido implicado en el cáncer y otras enfermedades. Se conocen más de 70 factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que activan específicamente una o varias de las GTPasas. A su vez, las GTPasas activadas pueden interactuar específicamente con más de 60 efectores descendentes. La desregulación de uno o más procesos celulares puede conducir a la liberación de células malignas de sus ubicaciones originales, que posteriormente se pueden establecer en nichos pre-metastásicos en, por ejemplo, el hueso o los pulmones. Se ha descubierto que los miembros de la familia de GTPasas Rho, incluidos Rac, Cdc42 y Rho, desempeñan funciones de señalización clave en estos procesos.

20 Las Rho GTPasas regulan la migración y la invasión, la organización del citoesqueleto, la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular, la apoptosis, el tráfico de vesículas y las adhesiones de célula a célula y de célula a matriz extracelular. Las Rho GTPasas Rac y Cdc42 son potentes inductores de la polimerización de la actina y de la extensión de las estructuras de actina en el borde anterior de las células móviles. Además, Cdc42 desempeña un papel fundamental en la polaridad celular y, por lo tanto, promueve la migración dirigida y persistente.

25 Los estudios han implicado a Rac y Cdc42 hiperactivos con el aumento de la supervivencia, proliferación e invasión de las células cancerosas, así como en la transformación mediada por Ras y otros oncogenes. Además, los receptores oncogénicos de la superficie celular, tales como tirosina quinasa, citoquina y receptores acoplados a la proteína G, activan Rac y Cdc42 a través de la regulación de sus GEF efectores corriente arriba. En consecuencia, las proteínas Rac y Cdc42 no suelen estar mutadas en el cáncer, sino sobreexpresadas o hiperactivadas. Aunque el ~9% de los melanomas contienen una mutación activadora de Rac(P29S), y la variante de empalme hiperactiva Rac1b se sobreexpresa en algunos cánceres, la mayoría de los Rac y Cdc42 en el cáncer humano se activan debido a los GEF regulados.

35 De los efectores descendentes directos de Rac y Cdc42, las quinasas activadas por p21 (PAK) están sobreexpresadas en un número de cánceres y contribuyen a la transformación y progresión del cáncer por medio de la regulación de funciones celulares clave, que incluyen la organización del citoesqueleto, la migración celular, la adhesión, el crecimiento y el desarrollo. Por lo tanto, se ha desarrollado un número de inhibidores de la PAK como terapéutica anticancerosa. Sin embargo, éstos se han visto limitados por la especificidad, la biodisponibilidad y la toxicidad, y aún no han completado con éxito los ensayos clínicos. El documento WO 2007/014198 A1 desvela inhibidores de 1,2,3-triazol para inhibir la polimerización de la tubulina que se pueden utilizar en el tratamiento de trastornos proliferativos.

40 Existe una necesidad de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas. Las GTPasas Rac y Cdc42 son importantes mediadores celulares que están hiperactivos o sobreexpresados en los tumores metastásicos. Es deseable el diseño de nuevos inhibidores de las actividades de Rac y/o Cdc42 con una actividad mejorada, un perfil farmacológico y una toxicidad reducida.

Sumario

45 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

50 En la presente memoria se desvela una serie de nuevos 1,2,3-triazoles 1,5-disustituidos. Los inventores desarrollaron el inhibidor de Rac EHOp-016 (IC₅₀, 1.100 nM) que inhibe la migración y viabilidad de las células cancerosas y reduce el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis *in vivo*. Se informó que el compuesto EHOp-016 inhibía la actividad de Rac1 a concentraciones <5 µM y con un IC₅₀ = 1,1 µM en las células metastásicas MDA-MB-435. A concentraciones más altas (>10 µM) EHOp-016 inhibe la actividad de Rac en un 100% y la de Cdc42 en un 75%. EHOp-016 inhibió la migración celular *in vitro*, y en un modelo *in vivo* de cáncer metastásico en ratones fue capaz de inhibir la metástasis y el crecimiento del tumor.

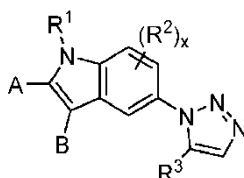
55 Algunos de los miembros son aproximadamente 10 veces más potentes inhibidores de Rac y Cdc42 que EHOp-016. El tratamiento de las células MDA-MB-435 con 150 nM de un ejemplo específico de esta serie (MBQ-167) durante 24 hs dio lugar a una reducción de la expresión de los oncogenes e inductores de la supervivencia c-Myc, Bcl-XL, Bcl-2, con un aumento concomitante de la proteína proapoptótica BAD. Los estudios de un número de tipos de

cáncer han demostrado que la señalización Rac/Cdc42/PAK puede inducir la supervivencia celular y evadir la apoptosis. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad celular y el aumento de la apoptosis por MBQ-167, a concentraciones que inhiben tanto Rac como Cdc42, se predice que se debe a la inhibición dual de la función de Rac y Cdc42.

MBQ-167 inhibe Rac y Cdc42 con IC₅₀ de 103 nM y 78 nM respectivamente, en células de cáncer de mama metastásico. En consecuencia, MBQ-167 disminuye significativamente la señalización de Rac y del efector descendente Cdc42 quinasa activada por p21 (PAK) y la actividad del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT3), sin afectar a las actividades de Rho, MAPK o Akt. El MBQ-167 también inhibe la migración de las células del cáncer de mama, su viabilidad y la formación de mamíferos. Además, el MBQ-167 afecta a las células cancerosas que han sufrido una transición epitelial a mesenquimal por medio de una pérdida de la polaridad celular, y la inhibición de las extensiones basadas en la actina de la superficie celular, para finalmente provocar el desprendimiento del sustrato. La incubación prolongada (120 hs) en MBQ-167 disminuye la viabilidad de las células cancerosas metastásicas con un IG₅₀ de ~130 nM, sin afectar a las células epiteliales mamarias no cancerosas. La pérdida de viabilidad de las células cancerosas se debe a la detención del ciclo celular G2/M mediada por MBQ-167 y a la posterior apoptosis, especialmente de las células desprendidas. *In vivo*, el MBQ-167 inhibe el crecimiento del tumor mamario y la metástasis en ratones inmunodeprimidos en un ~90%. En conclusión, MBQ-167 es 10 veces más potente que otros inhibidores de Rac/Cdc42 actualmente disponibles, y tiene potencial para ser desarrollado como un fármaco anticanceroso, así como una sonda inhibidora dual para el estudio de Rac y Cdc42.

Se contemplan las siguientes realizaciones numeradas:

1. Un compuesto de la fórmula (I),



en el que A y B, junto con el anillo al que están unidos, forman un arilo C₆-C₁₀ en el que cada átomo de hidrógeno del arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -CN, -OR⁴, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F;

R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵;

cada R² es independientemente deuterio, halógeno, -OH, -CN, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo C₆-C₁₀, -OR⁶, -C(O)OR⁶, -C(O)NR⁶R⁷, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, en el que cada átomo de hidrógeno de alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆ y arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -CN, -OR⁶, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F;

C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, -cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros;

R³ es independientemente deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F;

cada R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ es independientemente H, deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), heteroarilo, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -CF₃, -CHF₁, o -CH₂F, en el que cada hidrógeno en arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o -CH₂CN; y x es 0, 1, 2 o 3;

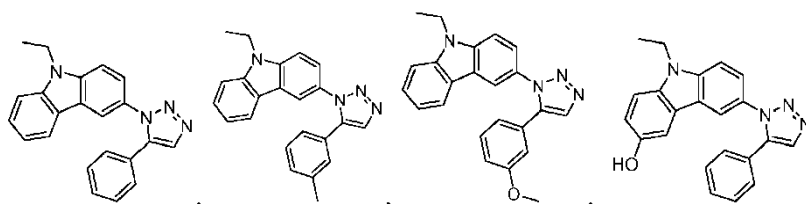
o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

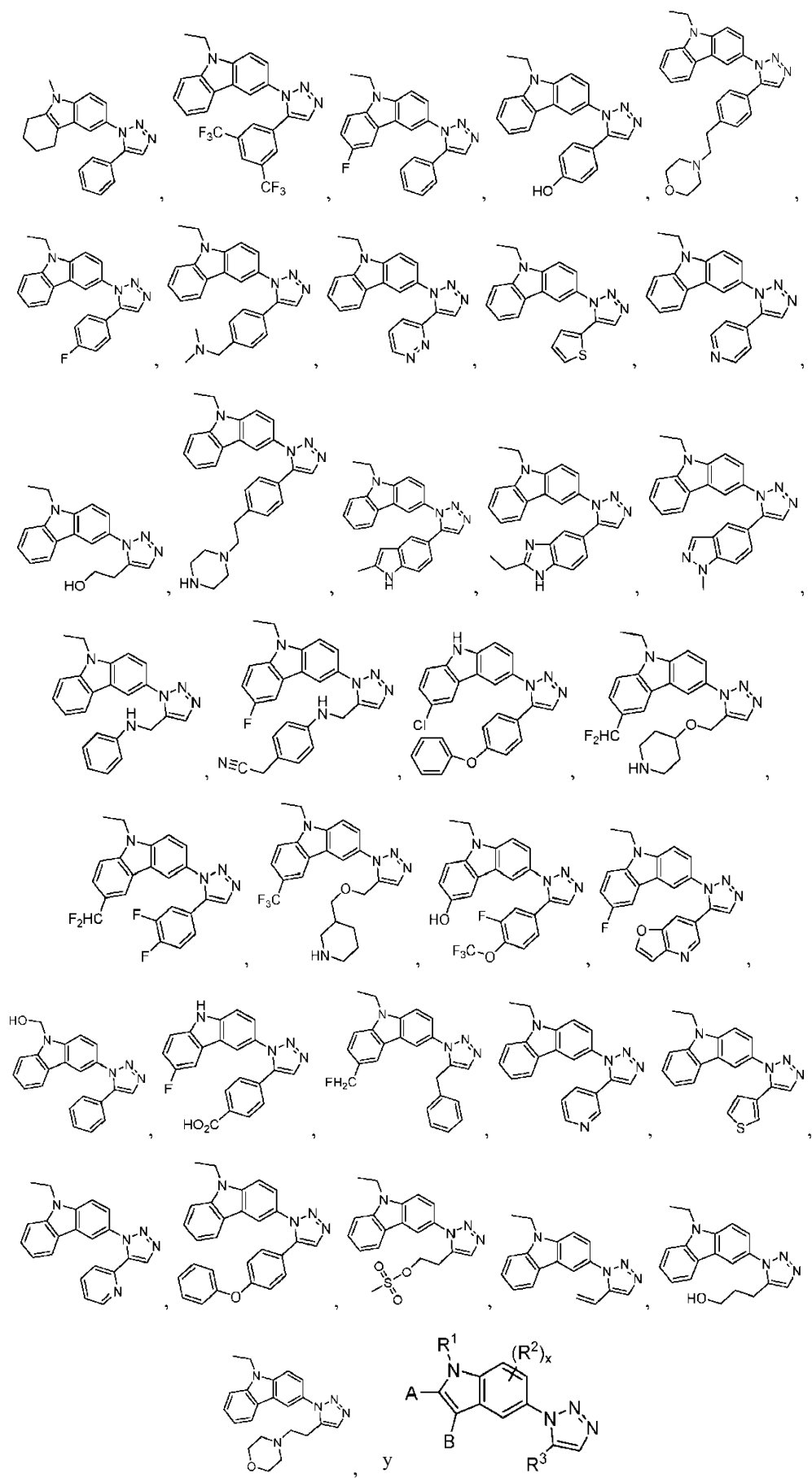
2. El compuesto de la cláusula 1, en el que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

3. El compuesto de la cláusula 1, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

4. El compuesto de la cláusula 1, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), o heteroarilo monocíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -OR⁸, -Oalquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

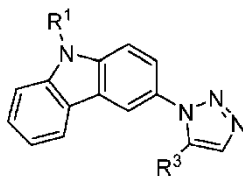
5. El compuesto de la cláusula 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en





, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

6. El compuesto de la cláusula 1, en el que el compuesto tiene la fórmula (III),



(III)

en la que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵

R³ es independientemente deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆), -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F; y

cada R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ es independientemente H, deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, heterocicloalquilo C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heteroarilo, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F, en el que cada hidrógeno en arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o -CH₂CN; o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

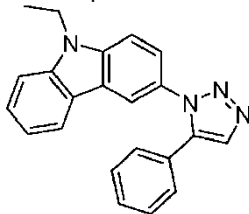
7. El compuesto de la cláusula 6, en el que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

8. El compuesto de la cláusula 6, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo

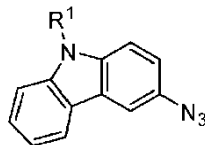
C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heterocicloalquilo, -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

9. El compuesto de la cláusula 6, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), o heteroarilo monocíclico; en los que cada átomo de hidrógeno de alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)Nalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Nalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heterocicloalquilo, -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

10. El compuesto de la cláusula 1, en el que el compuesto es de la fórmula



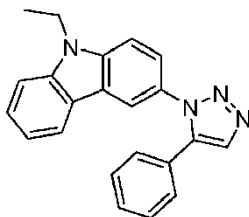
o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.



11. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente, en el que una cantidad eficaz de dicho compuesto se debe administrar al paciente que lo necesita, en el que la enfermedad es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer neuronal.

12. El compuesto para el uso de la cláusula 11, en el que (a) el compuesto inhibe la migración de las células cancerosas, induce la detención del ciclo celular de una célula enferma, induce la apoptosis de una célula enferma, reduce la expresión de una proteína Bcl-2, inhibe la formación de la mamosfera, o una combinación de las mismas; o (b) la cantidad efectiva del compuesto está en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente.

13. El compuesto para uso de acuerdo con la cláusula 11, en el que el compuesto es de la fórmula



o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Diseño y síntesis de MBQ-167. Síntesis de MBQ-167. Condiciones de reacción: (i) H₂SO₄ conc., NaNO₂, agua 0 a 5 °C, 1 hora; (ii) NaN₃, 0 °C, 1 hora, 76%; (iii) THF, **3**, 50 °C, 1 hora; (iv) NH₄Cl (aq), 86%.

FIG. 2(A, B, C). Fenotipo de las células de cáncer de mama tras el tratamiento con MBQ-167. **2A**, Panel superior, imágenes de campo brillante de células de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231 en respuesta a MBQ-167. Panel inferior, células MCF-7 en respuesta a MBQ-167. **2B, C**, Adherencias focales y citoesqueleto de actina tras el tratamiento con MBQ-167 que muestra micrografías de fluorescencia representativas de células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se trataron con 0, 250 o 500 nM de MBQ-167 durante 24 hs y se fijaron y tiñeron en **2B**, con anticuerpos fosfo-tirosina para las adhesiones focales (verde) y rodamina faloidina para la F-actina (rojo) y en **2C**, con anti vinculina (rojo). Flechas, invadopodios; puntas de flecha, adhesiones focales.

FIG. 3. (A, B, C). Efecto inhibitor de MBQ-167 sobre la activación de Rac y Cdc42. Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se trataron durante 24 hs con 250 nM de MBQ-167. A-C, Se recuperaron las poblaciones de células adheridas (A) y desprendidas (D) y se sometieron cantidades iguales de proteínas a ensayos desplegables mediante el uso del dominio de unión a p21 de PAK para aislar las proteínas Rac y Cdc42 unidas a GTP. Los lisados celulares se sometieron a western blot con anticuerpos contra Rac o Cdc42. Los resultados de las bandas positivas en los western blots se cuantificaron mediante el uso de image J. **3A-1**, izquierda, western blot representativo para Rac1/2; **3A-2** derecha, cuantificación de la activación de Rac a las 24 hs después de 0 o 250nM MBQ-167. **3B-1**, izquierda, Western blot representativo para Cdc42; **3B-2** derecha, cuantificación de la activación de Cdc42 tras 24 hs de tratamiento con 0 o 250 nM MBQ-167. La densidad integrada para Rac o Cdc42 activo (GTP) se dividió por el total de Rac o Cdc42 de los mismos lisados celulares. La actividad de Rac o Cdc42 para cada tratamiento con MBQ-167 se dividió por los controles del vehículo para cada experimento para obtener la actividad relativa de Rac o Cdc42. N=3, * = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$. Las barras de error representan $\pm$ S.E.M. C,D, Células MDA-MB-231 con control de vehículo (0,1% DMSO) o concentraciones variables de MBQ-167 (0 a 1000 nM) se trataron durante 24 hs. Los lisados celulares totales con poblaciones tratadas combinadas adheridas y desprendidas se sometieron al ensayo de activación de Rac1/2/3 o Cdc42 de G-LISA. Las curvas de IC₅₀ para el porcentaje de activación de Rac **3C** o Cdc42 **3D** son relativas al vehículo a partir de tres réplicas biológicas, cada una con dos réplicas técnicas. Las barras de error representan $\pm$ S.D. Se muestran las curvas dosis-respuesta de cuatro parámetros generadas con GraphPad Prism®.

FIG. 4 (A a G). El efecto de MBQ-167 en la señalización corriente abajo de Rac y Cdc42. **4A**, El efecto de MBQ-167 en la fosforilación de PAK1 y PAK2 medido por western blot para los niveles de pPAK1 (T423)/pPAK2 (T402), pPAK1 (S199)/pPAK2 (S192), y pPAK1 (S144) en células MDA-MB-231 después de 24 horas de tratamiento en 0 o 250 nM MBQ-167. Se muestran los datos de las poblaciones adjuntas (Att) y separadas (Det) por separado. **4A-1** Izquierda, western blots representativos (N=3) **4A-2**. A la derecha, actividad PAK relativa tras el tratamiento con MBQ-167. Las bandas positivas de todos los western blots se cuantificaron mediante el uso de image J. La densidad integrada de p-PAK se dividió por la de PAK total para el mismo lisado celular y se utilizó como medida de la actividad de PAK para cada residuo de fosfo PAK. La actividad PAK relativa se determinó en relación con los controles del vehículo para cada experimento. N=3, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Las barras de error representan $\pm$ S.E.M. **4B**, Efecto de MBQ-167 sobre los efectores descendentes de PAK LIMK y la fosforilación de cofilina. Las células MDA-MB-231 se incubaron durante 4, 12 o 24 hs en vehículo o 250 nM de MBQ-167, se separaron las poblaciones adheridas (A) y desprendidas (D), se lisaron y se utilizó la misma proteína para el western blotting. Se muestra un western blot representativo de LIMK1 total o p-LIMK1/2 (Y507/T508) tras 24 hs en 0 o 250 nM de MBQ-167 (N=2). **4C**, Western blot representativo de la cofilina total o p-cofilina (S3) de cantidades iguales de lisados de proteína total después de 4, 12, o 24 hs en 250nM MBQ-167 (N=3). Se muestran las poblaciones adheridas (A) y desprendidas (D) separadas para 12 y 24 hs de tratamiento con MBQ-167. **4D**, Efecto de MBQ-167 en la fosforilación y expresión de STAT3. Se muestra un western blot representativo de la expresión de pSTAT3 (Y705) y STAT3 total en las células GFP-HER2-BM tras 24 hs de tratamiento con vehículo o 100, 200 o 500 nM de MBQ-167. **4D-1** Western blot representativo (izquierda) **4D-2** y cuantificación (derecha). N=3, * = $P < 0,05$, las barras de error representan $\pm$ S.E.M. E, F, Efecto de MBQ-167 en la migración celular. **4E-1**, El efecto de MBQ-167 en la migración celular de MDA-MB-231 medida por un ensayo transwell. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **4E-2** El gráfico siguiente muestra la cuantificación de 20 campos microscópicos por tratamiento y por experimento de las células teñidas con PI que migraron a la parte inferior de la membrana a través de poros de 8 micrómetros de diámetro N=3,* = $P < 0,05$, las barras de error representan $\pm$ S.E.M. **4F**, El efecto de MBQ-167 sobre la migración celular en un ensayo de rascado. Las células MDA-MB-231 colocadas a igual densidad fueron sometidas a un raspado en el centro y tratadas con MBQ-167 a 0, 250 o 500 nM. Las micrografías se adquirieron digitalmente a las 0 y 24 hs y se cuantificó la distancia del araño para cada tratamiento y se presentó en relación con la distancia en el momento 0. Los resultados son una media de dos réplicas técnicas y dos réplicas biológicas para cada tratamiento $\pm$ D.S,* = $P < 0,05$. **4G**, El efecto de MBQ-167 en la eficiencia de formación de mamíferas en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 tratadas con 0 o 250 nM de MBQ-167 fueron sometidas a ensayos de mamíferas durante 4 días. Las células se trataron con MBQ-167 una sola vez antes de colocarlas en el medio de mamíferas. La eficiencia de formación de mamíferas se calculó como el porcentaje del número de mamíferas dividido por el número de células sembradas por pocillo. N=3, *** = $P < 0,001$, las barras de error representan $\pm$ S.D.

FIG. 5A a D. Efecto de MBQ-167 en la supervivencia de las células. **5A**, El efecto de MBQ-167 en la viabilidad de las células MDA-MB-231, GFP-HER2-BM y MCF10A. Se trataron números iguales de cada línea celular respectiva con el control del vehículo (0,1% DMSO) o con concentraciones variables de MBQ-167 (0 a 1000 nM) durante 120 hs. Las curvas IG₅₀ para el porcentaje de viabilidad celular son relativas al vehículo a partir de tres réplicas biológicas, cada una con dos réplicas técnicas. Se muestran las curvas dosis-respuesta de cuatro parámetros generadas con GraphPad Prism®. N=3, las barras de error representan $\pm$ S.E.M. **5B**, El efecto de MBQ-167 en la progresión del ciclo celular. Un número igual de células MDA-MB-231 en los grupos de control o de tratamiento con vehículo se trataron durante 24 hs con 0 o 250 nM de MBQ-167. Los gráficos representan el porcentaje de células de control frente a las tratadas con 250 nM MBQ-167 teñidas con PI en las fases G0/G1, S o G2/M del ciclo celular. **5B-1** Gráfico izquierdo, análisis representativo de citometría de flujo **5B-2**; gráfico derecho, cuantificación de la fase del ciclo celular. N=3, Barras de error $\pm$ S.E.M. **5C**, El efecto de MBQ-167 en la actividad de la caspasa3,-7. **5C-1** Gráfico de la izquierda, actividad de la caspasa3/7 de las células MDA-MB-231

y GFP-HER2-BM (incluidas las poblaciones adheridas y desprendidas) tras el uso del vehículo (0,1% DMSO) o de concentraciones variables de MBQ-167 (0 a 1000 nM) durante 24 hs. N=3, las barras de error representan $\pm$ S.E.M. **5C-2** Gráfico derecho, el efecto de MBQ-167 en la actividad de la caspasa-3,-7 de las células MDA-MB-231. Las células se trataron con 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs y se lisaron números iguales de células adheridas y desprendidas separadas y se utilizaron para los ensayos de caspasas 3/7. Se muestra la actividad de la caspasa-3,-7 en relación con un número igual de células adheridas de las células de control. N=3, las barras de error representan $\pm$ S.E.M. **5D**, El efecto de MBQ-167 en la regulación mitocondrial de la apoptosis. El efecto de MBQ-167 en la expresión de las proteínas pro-supervivencia Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 en las células MDA-MB-231 tras 24 hs de tratamiento. **5D-1** Panel de la izquierda, western blot representativo **5D-2**; panel de la derecha, cuantificación de la densidad integrada de bandas positivas mediante el uso de la imagen J. N=3, * = $P < 0,05$, *** = $P < 0,001$, Las barras de error representan $\pm$ S.E.M.

FIG. 6 (A a E). Eficacia *in vivo* de MBQ-167 en el cáncer de mama tipo HER2. Los tumores de la almohadilla grasa mamaria se establecieron en ratones desnudos por medio de la inoculación de 5×10^5 células GFP-HER2-BM. Después de una semana, los ratones se trataron con un vehículo de control o con 1,0 o 10,0 mg/kg de peso corporal (PC) de MBQ-167 3 veces por semana por medio de inyección i.p. **6A-1**, Panel izquierdo, tumores extirpados representativos después de 0, 1, 10 mg/kg BW MBQ-167. **6A-2** Panel derecho, crecimiento relativo promedio del tumor a partir de imágenes de fluorescencia *in situ* hasta 65 días después de 0, 1,0 o 10 mg/kg de MBQ-167 (3X por semana) (N=6). **6B**, Micrografías de fluorescencia representativas de pulmones, bazo y riñones de ratones tratados con vehículo o MBQ-167 tras la necropsia. **6C**, Peso de los ratones de 1 a 65 días. **6D**, **E**, Actividades de las enzimas hepáticas tras el tratamiento con MBQ-167. Tras la necropsia, los hígados se cosecharon, se lisaron y se sometieron a ensayos de actividad **6D**, ALP o **6E**, ALT. N=4, las barras de error representan $\pm$ S.E.M.

FIG. 7. El efecto de MBQ-167 sobre la actividad Rac de las células cancerosas metastásicas que expresan un Rac constitutivamente activo (Rac1G12V). Las células de cáncer metastásico humano MDA-MB-435 que expresan la forma Rac1 de tipo salvaje (WT) o Rac1(G12V) activada constitutivamente se trataron durante 24 hs con 250 nM de MBQ-167. Se recuperaron las poblaciones de células adheridas (A) y desprendidas (D) y se sometieron cantidades iguales de proteínas a ensayos desplegables mediante el uso del dominio de unión a p21 de PAK para aislar el Rac unido a GTP. Los lisados celulares se sometieron a un western blot con anticuerpos contra Rac. Los resultados de las bandas positivas en los western blots se cuantificaron mediante el uso de image J. Los resultados muestran que aunque MBQ-167 inhibió significativamente la actividad Rac de las células desprendidas que expresaban Rac de tipo salvaje, esta inhibición no se observó en las células que expresaban una forma de Rac1 unida a GTP constitutivamente activa.

FIG. 8(A, B). El efecto de MBQ-167 sobre la supervivencia y la actividad de PAK en las células de cáncer gástrico NCI-N87. **8A**. Un número igual de células NCI-N87 en los grupos de control o de tratamiento con vehículo se trataron durante 24 hs con 0 o 250 nM de MBQ-167. Las células se sometieron a ensayos de MTT para comprobar su viabilidad. Los resultados muestran que 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs reduce la viabilidad de las células NCI-N87 en un 50%. **8B**. Se lisó un número igual de células tratadas con 0, 250 o 500 nM de MBQ-167 y se llevó a cabo un western blot para fosfo (P)-PAK1^{T432} (forma activa) o PAK1 total, o fosfo (P)-PAK4^{S474} (forma activa) o PAK4 total. Un western blot representativo demuestra que MBQ-167 inhibe las actividades de PAK1 y PAK4 en las células de cáncer gástrico NCI-N87.

FIG. 9. Fenotipo de células cancerosas humanas tras el tratamiento con MBQ-167. Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-468), de páncreas agresivo (Mia PaCa-2), de ovario (SKOV3), de carcinoma gástrico (AGS y NCI-N87) y una línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) se trataron con 0, 250 o 500 nM de MBQ-167 durante 24 hs. Se muestran imágenes de campo claro representativas de cada línea celular.

FIG. 10 (A a C). Efecto del MBQ-167 sobre la actividad de la Rho GTPasa en las células GFP-HER2-BM. Las células GFP-HER2-BM se trataron durante 24 hs con 250 nM de MBQ-167. Se recuperaron las poblaciones de células adheridas y desprendidas y se sometieron cantidades iguales de proteínas a los ensayos G-LISA para **10A** Rac o Cdc42 **10B**, **10C** Las células de cáncer de mama humano GFP-HER2-BM se trataron con 0 o MBQ-167 durante 24 hs se lisaron (tanto las células adheridas como las desprendidas) y se incubaron con el dominio de unión a Rho de Rhotekin para aislar Rho activo. Los lisados celulares se sometieron a western blot con anticuerpos contra Rac, Cdc42 o Rho. Los resultados de las bandas positivas en los western blots se cuantificaron mediante el uso de image J. La densidad integrada para la Rho activa se dividió por la Rho total de los mismos lisados celulares. La actividad de Rac, Cdc42 o Rho para cada tratamiento con MBQ-167 se dividió por los controles del vehículo para cada experimento para obtener la actividad relativa.

FIG. 11. MBQ-167 no afecta a la actividad PAK en las células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron con 0 o 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs y se recuperaron por separado las células adheridas (A) y las desprendidas (D). Se analizaron cantidades iguales de proteína en SDS-PAGE y se llevó a cabo un western blot con un anticuerpo fosfo-PAK (T423) o PAK total. Se muestra un western representativo (N=2).

FIG. 12 (A, B). Efecto de MBQ-167 sobre la activación de STAT3 y la migración celular en células cancerosas metastásicas GFP-HER2-BM. **12A**, El efecto de MBQ-167 en la fosforilación de PAK1 y PAK2, medido por western blot para los niveles de STAT3 y p-STAT3 (Y705) en las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM después de 24 horas de tratamiento en 0 o 250 nM MBQ-167. Se muestran los datos de las poblaciones adheridas (A) y desprendidas (D) por separado. Western blots representativos (N=2). **12B**, El efecto de MBQ-167 sobre la migración de las células GFP-HER2-BM, medido por medio de un ensayo Transwell. El gráfico muestra la cuantificación de 20 campos microscópicos por tratamiento y por experimento de las células teñidas con PI

que migraron a la parte inferior de la membrana a través de los poros de 8 micrómetros de diámetro en 6 hs, N=3, * = $P < 0,05$, las barras de error representan $\pm$ S.E.M.

FIG. 13 (A, B). Señalización de MAPK y Akt en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se trataron con 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs y se sometieron a western blot cantidades iguales de proteínas de lisados de células adheridas y desprendidas para **13A**, fosfo (activo) p-38 y p-42/44 (ERK) MAPKs o **13B**, total y fosfo (s-473) Akt. Se muestran western blots representativos de N=3.

FIG. 14. Tinción de anexina V en respuesta a MBQ-167. Las células GFP-MDA-MB-231 que crecían en cubreobjetos se trataron con vehículo o MBQ-167 a 250 o 500 nM durante 6 hs. Las células se fijaron en formaldehído y se tiñeron con Anexina V-Cy3-18. Se muestran micrografías de fluorescencia representativas. La flecha indica la tinción roja fluorescente de Anexina V en las membranas de las células apoptóticas.

FIG. 15 (A a D). Efecto de MBQ-167 sobre la polaridad de las yemas en *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó un derivado haploide de la cepa de levadura BY4741 que expresa el transactivador tTA, bajo el control del promotor CMV, para integrarlo en el promotor de Cdc42 y eliminar condicionalmente la expresión del gen Cdc42 esencial. **15A** Arriba a la izquierda, micrografía representativa del fenotipo de brotación en ausencia de Doxiciclina. **15B** Arriba a la derecha, micrografía representativa de la misma cepa celular tras 24 horas en 25 μ M de MBQ-167. **15C** Abajo a la izquierda, micrografía representativa de células después de 10 μ g/ml de doxiciclina para eliminar Cdc42. **15D** Abajo a la derecha, micrografía representativa de células con Cdc42 knockdown y 25 μ M MBQ-167.

FIG. 16. Eficacia in vivo de MBQ-167 en el cáncer de mama triple negativo. Se establecieron tumores de almohadilla de grasa mamaria en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) mediante el uso de células de cáncer de mama marcadas con proteína verde fluorescente (GFP). Una semana después, los ratones se trataron con 0, 1,0, 5,0 o 10,0 mg/kg de peso corporal (PC) de MBQ-167 por medio de inyecciones intraperitoneales 3 veces por semana durante 50 días. El crecimiento del tumor mamario se cuantificó a partir del análisis de imágenes de GFP. Los resultados muestran el crecimiento promedio del tumor en 50 días en función del tamaño de cada tumor en el día 01. El control con vehículo (0 mg/kg BW MBQ-167) se representa como un crecimiento tumoral del 100%. La administración de 1,0 mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produjo una inhibición del 90% del crecimiento tumoral, el tratamiento con 5,0 mg/kg de peso corporal produjo una inhibición del 95% del crecimiento tumoral y el tratamiento con 10mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produjo una inhibición del 100% del crecimiento tumoral en 50 días.

Descripción detallada

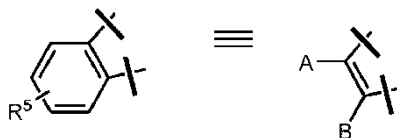
La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Dos compuestos que inhiben las Rho GTPasas, Rac y Cdc42, también se han utilizado como objetivos farmacológicos. El NSC23766 fue el primer inhibidor de Rac que demostró bloquear la interacción de Rac con los GEF Trio y Tiam1; sin embargo, sus altas concentraciones efectivas ($IC_{50} > 75 \mu$ M) limitan su uso terapéutico. Un panel de inhibidores putativos de Rac y Cdc42 condujo a la identificación de EHOp-016. EHOp-016 bloquea la interacción del GEF Vav2 con Rac, e inhibe la actividad de Rac a un IC_{50} de $\sim 1,1 \mu$ M, lo que lo hace $\sim 100X$ más potente que el NSC23766. EHOp-016 también inhibe la actividad de Cdc42 a concentraciones de $\geq 10 \mu$ M, sin afectar a la actividad de Rho.

A 25 mg/kg de peso corporal (PC), EHOp-016 reduce el crecimiento de los tumores mamarios, la metástasis y la angiogénesis sin toxicidad aparente en ratones desnudos. El análisis farmacocinético de EHOp-016, tras su administración oral e intraperitoneal (i.p.), demostró una biodisponibilidad de $\sim 30\%$ con una vida media promedio de $\sim 4,5$ hs, lo que indica su potencial como terapéutica oncológica en el cáncer de mama, y posteriormente en otros tipos de cáncer.

Aunque otros inhibidores de moléculas pequeñas, tal como el derivado del NSC23766 Aza-1 (inhibe tanto Rac como Cdc42) y el CID2950007/ML141 (selectivo para Cdc42) están actualmente disponibles, son efectivos en el intervalo micromolar. El objetivo de desarrollar un inhibidor de Rac/Cdc42 con actividades mejoradas condujo a la identificación de MBQ-167. En comparación con el EHOp-016, el MBQ-167 es un inhibidor 10 veces más potente de Rac y un inhibidor 100 veces más potente de Cdc42, lo que dio lugar a una mayor inhibición de la malignidad del cáncer.

De acuerdo con la invención, los sustituyentes A y B forman un sistema de anillos



En el que:

R^5 es independientemente H, deuterio, alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_6 , alquinilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} , alquilo C_1-C_6 -(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), heteroarilo, -S(O)₂alquilo C_1-C_6 , -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, en el que cada hidrógeno en el arilo C_6-C_{10} está opcionalmente sustituido

por cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros o -CH₂CN.

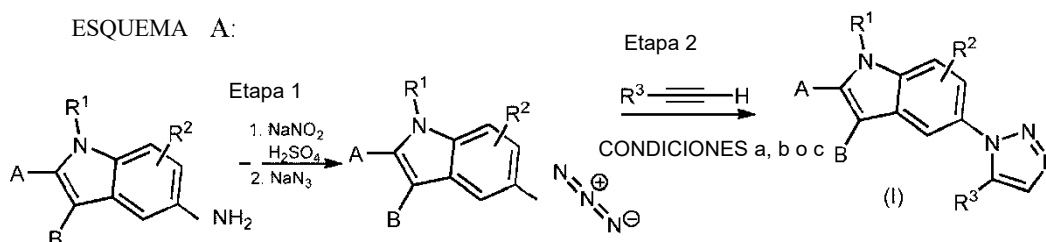
Los compuestos de acuerdo con la fórmula I se desvelan en la TABLA I.

Se desvela un procedimiento para inhibir la actividad de Rac y Cdc42 en una célula por medio del tratamiento con el compuesto I, en el que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R^a, R^b, y A y B se definen como arriba.

- 5 Se desvela un procedimiento para inhibir la actividad de Rac y Cdc42 en un paciente con cáncer de trastorno hiperproliferativo por medio del tratamiento con el compuesto I, en el que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R^a, R^b, y A y B se definen como arriba.

Compuestos y preparación

- 10 Los 1,5-triazoles disustituídos se pueden preparar en un proceso de dos etapas de acuerdo con el esquema A, que comprende la etapa 1) la formación de la azida a partir de la amina correspondiente; y la etapa 2) la formación del 1,5-triazol por medio de la reacción de la azida con un alquino en una de las condiciones descritas a continuación.



- 15 La etapa 1 se puede llevar a cabo por medio del contacto de una suspensión de la amina aromática apropiada en agua con ácido sulfúrico concentrado, seguido por la adición gota a gota de una solución acuosa de nitrito de sodio. Una vez completada la formación del diazo-derivado intermedio, se añade una solución acuosa de azida de sodio, lo que proporciona el producto de azida de la etapa 1.

La etapa 2 se puede llevar a cabo en diversas condiciones que proporcionen selectivamente los productos de 1,5-sustituídos de 1,2,3-triazol (en contraste con el producto de 1,4-sustituídos de 1,2,3-triazol más comúnmente preparado). Los procedimientos más empleados en la bibliografía incluyen:

- 20 a) Poner en contacto el alquino primario con un reactivo de Grignard, tal como el bromuro de etilmagnesio, que proporciona el bromuro de alquino. Posteriormente, al reaccionar el producto de bromuro de alquino-magnesio con la azida de la etapa 1, se obtiene selectivamente el 1,2,3-triazol 1,5-disustituído
- b) El contacto del alquino primario con la azida en presencia de cloruro de pentametilciclopentadienilo conduce regioselectivamente al 1,2,3-triazol 1,5-disustituído
- 25 c) Poner en contacto el alquino primario con la azida en presencia de dietilcinc y N-metilimidazol.

Muchos de los materiales de partida de aminas aromáticas y alquinos están disponibles comercialmente o se pueden preparar por medio de procedimientos publicados. Alternativamente, se pueden introducir modificaciones después de que se haya llevado a cabo la reacción de ciclización. En algunos casos, es necesario aplicar estrategias de protección de grupos.

- 30 Se dan a conocer compuestos que inhiben las RhoGTPasas y que, por lo tanto, son útiles para inhibir las enfermedades hiperprofesionales y neoplásicas. En concreto, los compuestos inhiben las GTPasas Rac y Cdc42, que están hiperactivas o sobreexpresadas en las vías de señalización del cáncer y la metástasis. Estos compuestos son útiles para el tratamiento del cáncer y las enfermedades hiperproliferativas.

- 35 Una serie de 1,2,3-triazoles 1,5-disustituídos como nuevos inhibidores de Rac y Cdc42. Un ejemplo concreto (MBQ-167) (antes EHOp-167) se estudió con gran detalle.

MBQ-167 inhibe la activación de Rac y Cdc42 en células cancerosas metastásicas

- Las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM se trataron durante 24 hs con vehículo o MBQ-167, y las células desprendidas y adheridas (~50% para cada población), fueron recuperadas y lisadas inmediatamente. Cantidades iguales de proteínas fueron sometidas a ensayos de activación de Rac o Cdc42. Tras el tratamiento con 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs, la población adherida de células MDA-MB-231 demostró una disminución del ~25% en la activación de Rac, mientras que las células desprendidas fueron más sensibles con una disminución del ~75% (**FIG. 3A**). En tiempos más tempranos (6 hs), el tratamiento con 250 o 500 nM de MBQ-167, indujo una inhibición del 10 a 20% en la actividad Rac en la población de células adheridas, mientras que la población desprendida demostró una inhibición de ~40 a 50%. Del mismo modo, la actividad de Cdc42 se inhibió en un 60% en las células adheridas y en un 78% en las células MDA-MB-231 desprendidas tras 250 nM de MBQ-167 durante 24 hs (**FIG. 3C**). Estos resultados indican que tanto la actividad de Rac como la de Cdc42 se inhiben mientras las células siguen adheridas al sustrato, pero las más sensibles se desprenden primero. La incubación de las células MDA-MB-231 con 500 nM

de MBQ-167 dio lugar a un desprendimiento de células de ~90% y a una disminución paralela de las actividades de Rac y Cdc42, lo que demuestra que la mayoría de las células respondieron a MBQ-167. De forma similar, la línea celular de cáncer de mama altamente metastásico GFP-HER2-BM respondió a MBQ-167 por medio de la inhibición de las actividades Rac y Cdc42 de forma significativa en las poblaciones celulares desprendidas (**FIGS. 10A, B**). Sin embargo, la línea celular MCF-7, más epitelial y no metastásica, que no respondió a MBQ-167 por el fenotipo de desprendimiento celular, también fue insensible al tratamiento con MBQ-167 en la inhibición de Rac (Tabla Supl. 2). Esto se puede deber a las diferencias en los GEF Rac y Cdc42 que se expresan y activan en las líneas celulares de cáncer de mama metastásico (MDA-MB-231) en comparación con la línea celular MCF-7, menos metastásica y más epitelial.

A continuación, como medida de la especificidad del MBQ-167 como inhibidor de Rac/Cdc42, también se determinaron los IC₅₀ para la activación de Rac y Cdc42 tras 24 hs en MBQ-167 mediante el uso de poblaciones combinadas adheridas y desprendidas. Los resultados muestran que MBQ-167 inhibe la actividad Rac 1/2/3 en las células MDA-MB-231 con una IC₅₀ de 103 nM, y la actividad Cdc42 con una IC₅₀ de 78 nM (**FIGS. 3D, E**). Dado que el IC₅₀ para la inhibición de Rac por EHOp-016 es de 1,1 µM y la inhibición de Cdc42 es de ~8 µM (16), MBQ-167 es 10 veces más potente que EHOp-016 para la inhibición de Rac y 100 veces más potente para la inhibición de Cdc42.

Para determinar indirectamente la especificidad de MBQ-167 para inhibir la activación de Rac por GEF, se determinó la actividad de Rac en células MDA-MB-435Br previamente caracterizadas que expresaban un vector de control o constitutivamente activo (Rac1G12V). Sin embargo, el MBQ-167 no afectó a la actividad Rac de esta línea celular que expresa un Rac1(G12V) (**FIG. 7**), lo que indica que la activación constitutiva de Rac1 desensibiliza las células a la inhibición por MBQ-167. Además, como se demostró en los ensayos de activación de Rac, Cdc42 y Rho de las poblaciones celulares adheridas y desprendidas, MBQ-167 no afectó a la activación de la GTPasa Rho relacionada en ambas poblaciones celulares de las células cancerosas metastásicas MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM (Tabla 1, **FIG. 10**).

MBQ-167 inhibe los efectores descendentes Rac y Cdc42

Para investigar el efecto de MBQ-167 en la señalización Rac/Cdc42, se investigó su efecto en el principal efector descendente de Rac/Cdc42, PAK. El estado de fosforilación de diversos residuos de PAK se analizó por medio de western blotting, como medida de su actividad. A 250 nM, el tratamiento de 24 hs con MBQ-167 inhibió la fosforilación de PAK1 y PAK2 en los residuos T423/T402 y S199/S192 en la población desprendida de células MDA-MB-231. Excepto en el caso de PAK1T423, la fosforilación de todos estos residuos también disminuyó significativamente en la población adherida. Aunque la fosforilación de PAK1T423 no se inhibió en las células adheridas, la reducción de los sitios de fosforilación homólogos de PAK2 indica una inhibición preferente de PAK2 en las células adheridas (**FIGS. 4A, B**). Curiosamente, el MBQ-167 indujo un dramático aumento de la fosforilación del PAK1^{S144} (**FIG. 4A**). Sin embargo, la actividad general de PAK es inhibida por MBQ-167, porque la fosforilación activadora (Y507/T508) del sustrato directo de PAK, la cinasa LIM (LIMK), y la fosforilación inactivadora (S3) de la cofilina (factor de despolimerización de la actina), un efector posterior de LIMK, se redujeron tras el tratamiento con MBQ-167. La disminución de la fosforilación de la cofilina fue evidente tras 12 hs después de 250 nM de MBQ-167 (**FIG. 4C**), lo que indica la activación de la cofilina, que explica la reestructuración del citoesqueleto de actina observada (**FIG. 2B**). Además, en la línea celular MCF7, que no respondió a MBQ-167 por medio del desprendimiento de células o la inhibición de la activación de Rac, MBQ-167 tampoco afectó a la actividad PAK. Del mismo modo, en la línea celular de cáncer gástrico metastásico humano NCI-N87, MBQ-167 inhibió la viabilidad y la actividad de las isoformas PAK1 y PAK4, que han sido implicadas en la malignidad del cáncer gástrico (**FIG. 8B**).

También se ha demostrado que la actividad de Rac estimula directamente la actividad del factor de transcripción, STAT3 (30). Como se ve en la **FIG. 4D** y la **FIG. 12A**, MBQ-167 disminuyó la actividad de STAT3 tras 24 hs de exposición tanto en las poblaciones adheridas como en las desprendidas de las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM. Sin embargo, el MBQ-167 no afectó a las actividades de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), ni a la p38-MAPK ni a la p42/44 MAPK, así como a las actividades de Akt, como se demostró por medio de western blotting con anticuerpos fosfoespecíficos (**FIG. 13**).

MBQ-167 afecta a la polaridad de las células cancerosas

Las células de cáncer de mama humano se visualizaron por medio de microscopía de campo brillante tras el tratamiento con MBQ-167. A ≥100 nM, a partir de las seis horas, MBQ-167 indujo una pérdida de polaridad en las células de cáncer de mama metastásico. El tratamiento con 500 nM de MBQ-167 durante 24 hs dio lugar a un redondeo de las células y a su desprendimiento del sustrato en las células MDA-MB-231 metastásicas (**FIG. 2A** panel superior). Además, MBQ-167 indujo este fenotipo en múltiples tipos de células cancerosas mesenquimales, que incluyen las células de cáncer de mama humano GFP-HER2-BM, MDA-MB-468 y Hs578t, así como las células de cáncer de páncreas Mia-PaCa-2, las células de cáncer de ovario SKOV3, las células de cáncer gástrico AGS y NCI-N87 y las células de neuroblastoma SH-SY5Y (**FIG. 9**). Por otro lado, las células epiteliales mamarias no cancerosas MCF10A y las células epiteliales de cáncer de mama MCF-7 fueron resistentes al MBQ-167 y permanecieron polarizadas y adheridas entre sí y al sustrato (**FIG. 2A**, panel inferior). Esto indica que el MBQ-167 sólo afecta a las líneas celulares cancerosas que han pasado por la transición epitelial-mesenquimal (EMT), y no afecta a las líneas celulares epiteliales no cancerosas ni a las líneas celulares epiteliales cancerosas.

Para investigar más a fondo el efecto de MBQ-167 en las células MDA-MB-231, se llevó a cabo una microscopía de inmunofluorescencia después de 0 a 500 nM de MBQ-167 para detectar la dinámica de la actina (por medio de faloidina de rodamina) y las adhesiones focales (por medio de anti-p-tirosina y anti-vinculina). El MBQ-167 reordenó el citoesqueleto de actina y las adhesiones focales para dar lugar a la pérdida de la polaridad celular y la adhesión a la matriz extracelular (ECM), con una marcada reducción tanto de los lamellipodia/invadopodia regulados por Rac como de los microspikes y filopodia inducidos por Cdc42 (**FIG. II**). Además, en las células tratadas con MBQ-167, las adhesiones focales se redujeron desde el borde de la célula y se reordenaron desde el citoesqueleto hacia el centro de las células desprendidas redondeadas.

Por lo tanto, el MBQ-167 inhibe la polarización celular, la extensión de lamellipodia y filopodia, y la formación de adhesiones focales en el borde celular principal (**FIG. 2B, C**).

El crecimiento de las células de levadura que sólo expresan Cdc42 y no Rac también fue inhibido por MBQ-167 con una pérdida característica de la polaridad de las yemas (**FIG. 15**).

MBQ-167 inhibe la migración celular y la formación de mamíferas

Rac/Cdc42 y su efector descendente PAK regulan directamente la migración celular. Se investigó el efecto de MBQ-167 sobre la migración de las células MDA-MB-231. Las dos poblaciones celulares (desprendidas y adheridas) se recuperaron después de 18 hs en MBQ-167 y se utilizó un número igual de células (tratadas con vehículo y poblaciones adheridas y desprendidas tratadas con MBQ-167) para un ensayo Transwell durante 6 hs. Este corto tiempo de incubación no es suficiente para la división de las células MDA-MB-231 (tiempo de duplicación de ~38 hs) o la inhibición de la viabilidad celular (**FIG. Supl. 8B, C**). Por lo tanto, el ensayo sólo mide la eficiencia de la migración celular.

El tratamiento con MBQ-167 redujo la migración dirigida de la población celular MDA-MB-231 adherida en un ~60 a 70% a 250 y 500 nM. En la población desprendida, el MBQ-167 (250 y 500 nM) inhibió la migración celular en un ~90% de forma estadísticamente significativa (**FIG. 4E**). En la línea celular GFP-HER2-BM más metastásica, 250 y 500 nM de MBQ-167 inhibieron la migración celular en un 80 a 90% tanto en las células adheridas como en las desprendidas. Estos resultados se confirmaron en un ensayo de cicatrización de heridas en el que el tratamiento con 250 y 500 nM de MBQ-167 durante 24 hs produjo una inhibición estadísticamente significativa de ~80 y 90 % del cierre de la herida, respectivamente (**FIG. 4F**). Las actividades de STAT3 y Rac han sido implicadas en el aumento de las propiedades de las células madre del cáncer de mama y en la resistencia a la terapia. La capacidad de MBQ-167 para dirigirse a las poblaciones de células madre del cáncer mediante el uso de un ensayo de formación de mamíferas. La adición de MBQ-167 una vez durante cuatro días redujo la eficiencia de formación de mamíferas de las células MDA-MB-231 en un ~50% tras 24 hs de tratamiento con MBQ-167 (**FIG. 4F**).

El MBQ-167 inhibe la supervivencia de las células

El MBQ-167 induce un fenotipo caracterizado por el redondeo de las células, la pérdida de lamellipodia y el eventual desprendimiento del sustrato superficial (**FIG. 2**). Por lo tanto, se probó el potencial del MBQ-167 para inducir la anoikis: apoptosis debida a la disolución de las uniones entre la célula y la ECM mediadas por la integrina. Se debe destacar que las células cancerosas metastásicas que se desprenden en respuesta a MBQ-167 tras 24 hs de tratamiento son viables, como demuestra la exclusión del azul tripán de las células vivas (**FIG. 8A Supl.**). Estas células desprendidas también tienen la capacidad de volver a crecer cuando se replantean sin MBQ-167 (datos no mostrados). Como se muestra en la **FIG. 8B**, las células MDA-MB-231 son 100% viables a concentraciones $\leq$ 300 nM durante 24 hs. A las 24 hs de tratamiento con MBQ-167, ~75% de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, GFP-HER2-BM y MCF-7, así como las células epiteliales mamarias MCF-10 son viables incluso a 5 μ M de MBQ-167. El tratamiento prolongado durante 48, 96 y 120 hs con MBQ-167 provoca el desprendimiento de las células del sustrato y la pérdida de su viabilidad.

La **FIG. 5A** muestra un ensayo de MTT tras el tratamiento con MBQ-167 durante 120 hs para las células cancerosas metastásicas MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM y las células epiteliales mamarias no cancerosas MCF10A, cuando se obtuvo un ~100% de muerte celular para todos los tipos de células a altas concentraciones (1000 nM) de MBQ-167. Este ensayo incluye tanto las células desprendidas como las adheridas en el caso de las células cancerosas metastásicas. MBQ-167 a las 120 hs disminuyó la viabilidad de las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM con un IG_{50} de 110 nM y 150 nM respectivamente. Sin embargo, el IG_{50} para las células epiteliales MCF10A a 350 nM de MBQ-167 fue ~3 veces mayor (**FIG. 5A**). Se debe destacar que el MBQ-167 inhibe las actividades de Rac y Cdc42 con IC_{50} en el intervalo de ~100 nM a las 24 hs cuando las células MDA-MB-231, GFP-HER2-BM, MCF-7 y MCF-10 aún son viables. A continuación, se determinó si el efecto de MBQ-167 sobre la viabilidad celular se debe a la detención del ciclo celular por medio de citometría de flujo. Como se muestra en la **FIG. 5B**, MBQ-167 detuvo significativamente el ciclo celular de las células MDA-MB-231 en la fase G2/M.

Para evaluar si la detención del ciclo celular iba acompañada de un aumento de la apoptosis, la actividad de las caspasas efectoras 3/7 en poblaciones celulares enteras (tanto adheridas como desprendidas). Se observó un aumento dependiente de la dosis de la actividad de la caspasa-3/7 en las líneas celulares MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM después de 24 hs en MBQ-167 (**FIG. 5C**, panel izquierdo). Para determinar si MBQ-167 induce la anoikis,

se analizaron los niveles relativos de las actividades de la caspasa-3/7 en las poblaciones de células MDA-MB-231 adheridas y desprendidas tras 24 hs a 250 nM de MBQ-167. Hubo un aumento significativo de ~15 veces en la actividad de la caspasa-3/7 en la población desprendida en comparación con la población adherida de células MDA-MB-231 (**FIG. 5C**, panel derecho), el efecto de MBQ-167 sobre la apoptosis se validó que muestra un aumento de la tinción de Anexina V en las células MDA-MB-231 tras 250 o 500 nM de MBQ-167 (**FIG. 14**). En 500 nM de MBQ-167, las células también demostraron el clásico ampollado asociado a la apoptosis. Por último, para explorar el efecto de MBQ-167 sobre la apoptosis mitocondrial, se examinó la expresión de las proteínas pro-supervivencia Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 por medio de western blotting. Se encontró una disminución significativa en la expresión de proteínas pro-supervivencia después de 24 hs con 250 nM de MBQ-167 (**FIG. 5D**).

MBQ-167 inhibe la progresión tumoral mamaria del cáncer de mama tipo HER2 en ratones inmunocomprometidos

Para probar el efecto de MBQ-167 en la progresión de los tumores mamarios, se utilizaron ratones desnudos para establecer tumores de la almohadilla grasa mamaria a partir de células GFP-HER2-BM. Una semana después del establecimiento del tumor mamario, los ratones se trataron 3 veces por semana con 0, 1 o 10 mg/kg BW de MBQ-167 por vía i.p. durante 65 días. Los ratones tratados con vehículo demostraron un aumento lineal del crecimiento tumoral, mientras que los ratones tratados con MBQ-167 demostraron una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral (**FIG. 6A**). En el momento del sacrificio, 1,0 mg/kg de peso corporal de MBQ-167 dio lugar a una reducción de ~80% del crecimiento tumoral, y el tratamiento con 10 mg/kg de peso corporal de MBQ-167 dio lugar a una reducción de ~95% del crecimiento tumoral. Dado que el EHOp-016 sólo ejerce una reducción del crecimiento tumoral del ~40% a 10 mg/kg de peso corporal, el MBQ-167 es 10 veces más eficaz que el EHOp-016 (**FIG. 6A**).

El % óptimo de cambio en el tamaño del tumor, que tiene en cuenta el crecimiento individual del tumor para cada tratamiento, mostró que los tumores de los ratones tratados con 1mg/kg BW MBQ-167 demostraron un cambio de crecimiento del 58% en comparación con los controles (100%), mientras que los tumores de los ratones tratados con 10 mg/kg BW MBQ-167 demostraron sólo un aumento del 9% en el tamaño del tumor (Tabla Supl. 3). Estos datos indican que aunque no hubo regresión tumoral durante el tiempo de estudio, hubo una reducción drástica del crecimiento tumoral en los ratones tratados con 10 mg/kg BW de MBQ-167.

Cuando se cuantificó el retraso del crecimiento del tumor, los ratones de control se duplicaron en 8 días, y los ratones tratados con MBQ-167 demostraron tiempos de duplicación similares para ambos tratamientos (10 y 11 días). Sin embargo, en la segunda duplicación (2²), hubo un retraso en el crecimiento tumoral de los ratones tratados con MBQ-167, en el que los tumores de los ratones tratados con el control alcanzaron los 2² en 14,5 días, mientras que los tumores de los ratones tratados con 1 y 10mg/kg de BW fueron similares al alcanzar los 2¹ en 30 días. En la 3^a duplicación, también hubo una disparidad entre los dos tratamientos con MBQ-167, en el que los tumores de los ratones de control alcanzaron los 2³ en 27 días, los tumores tratados con 1 mg/kg BW de MBQ-167 tardaron 57 días en alcanzar el mismo tamaño, y los tumores tratados con 10mg/kg BW nunca alcanzaron el 2³ en el crecimiento tumoral. Asimismo, sólo los tumores del control alcanzaron los 2⁴ en 33 días, mientras que los tumores de los dos ratones tratados con MBQ-167 (1 y 10 mg/kg de peso corporal) nunca alcanzaron este tamaño. Este resultado demuestra una inhibición significativa del crecimiento tumoral iniciada tras 24 días de tratamiento con MBQ-167 (**FIG. 6A**). Esta drástica reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con MBQ-167 dio lugar a la ausencia de metástasis en todos los órganos analizados (**FIG. 6B**).

MBQ-167 inhibe la progresión del tumor mamario del cáncer de mama triple negativo en ratones inmunocomprometidos. Se establecieron tumores de almohadilla de grasa mamaria en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) mediante el uso de células de cáncer de mama marcadas con proteína verde fluorescente (GFP). Una semana después, los ratones se trataron con 0, 1,0, 5,0 o 10,0 mg/kg de peso corporal (PC) de MBQ-167 por medio de inyecciones intraperitoneales 3 veces por semana durante 50 días. El crecimiento del tumor mamario se cuantificó a partir del análisis de imágenes de GFP. Los resultados muestran el crecimiento promedio del tumor en 50 días en función del tamaño de cada tumor en el día 01. El control con vehículo (0 mg/kg BW MBQ-167) se representa como un crecimiento tumoral del 100%. La administración de 1,0 mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produjo una inhibición del 90% del crecimiento tumoral, el tratamiento con 5,0 mg/kg de peso corporal produjo una inhibición del 95% del crecimiento tumoral y el tratamiento con 10mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produjo una inhibición del 100% del crecimiento tumoral en 50 días (**FIG. 16**).

MBQ-167 no es tóxico para los ratones inmunodeprimidos

Los ratones de este estudio también fueron examinados una vez a la semana para comprobar su potencial toxicidad. Los ratones tratados con vehículo o MBQ-167 no mostraron ninguna pérdida de peso significativa ni cambios fenotípicos durante el estudio de 65 días (**FIG. 6C**). En la necropsia, se recolectaron los hígados, se lisaron y se sometieron a ensayos de enzimas hepáticas como prueba de posibles efectos tóxicos. La **FIG. 6D** muestra que el MBQ-167 no afecta a la actividad de la ALP en los hígados de los ratones desnudos tratados con MBQ-167 (1 y 10 mg/kg de peso corporal). Sin embargo, los niveles de ALT en el hígado aumentaron significativamente con el tratamiento con 10 mg/kg de MBQ-167, lo que indica un posible metabolismo del MBQ-167 a concentraciones más altas (**FIG. 6E**).

Las moléculas que funcionan como inhibidores de la familia Ras-homóloga (Rho) de pequeñas GTPasas (por ejemplo, Rac y Cdc42) y su uso para tratar cánceres, incluidos los de mama, páncreas, ovario, próstata, gástrico y neuroblastoma, en los que estas GTPasas están sobreexpresadas o hiperactivadas, y las enfermedades en las que la activación de las Rho GTPasas desempeña un papel fundamental están mediadas por estas proteínas.

5 La caracterización bioquímica de MBQ-167, que inhibe la activación de Rac y Cdc42. Rac y Cdc42 son intermediarios de señalización fundamentales cuya desregulación se ha implicado en la transformación oncogénica, la progresión del cáncer, la metástasis y múltiples enfermedades. Estudios recientes, incluidos los propios de los inventores, han demostrado que dirigirse a Rac y Cdc42 tiene potencial para la terapia del cáncer metastásico. Sin embargo, las pequeñas moléculas inhibidoras actuales de Rac y Cdc42 sólo son eficaces a concentraciones micromolares.

10 Para desarrollar un nuevo inhibidor más potente de Rac y Cdc42 con un $IC_{50} < 1,0 \mu M$, el nuevo derivado MBQ-167 muestra una eficacia mejorada en células de cáncer de mama metastásico al inhibir la actividad de Rac con un IC_{50} de ~ 103 nM, y de Cdc42 con un IC_{50} de 78 nM. Esta respuesta dependiente de la concentración de las células de cáncer de mama a MBQ-167 demuestra que MBQ-167 está inhibiendo específicamente la activación bioquímica de Rac y Cdc42. Sin embargo, el MBQ-167 no inhibió la actividad Rac de las células que expresaban Rac1(G12V) predominantemente activo, lo que indica que el MBQ-167 inhibe específicamente la activación de Rac1. Además, nuestros datos muestran que MBQ-167 no afecta a la activación de la GTPasa relacionada Rho. Por lo tanto, se espera que esta nueva molécula sea útil como herramienta para sondear la función de Rac y Cdc42 en tipos de células sensibles.

20 El MBQ-167 fue un eficaz inhibidor del efector descendente Rac y Cdc42 PAK. Curiosamente, MBQ-167 indujo un aumento de la autofosforilación de S144 (PAK1), cuya activación no es esencial, pero contribuye a la actividad del dominio quinasa PAK. Este resultado se puede deber a un mecanismo de retroalimentación que compensa la inhibición de Rac/Cdc42. Sin embargo, las fosforilaciones en los dominios quinasa de PAK, así como los efectores de PAK LIMK y cofilina, un potente regulador de la dinámica de los filamentos de actina durante la migración celular, fueron significativamente inhibidas por MBQ-167. Por lo tanto, se concluyó que, en general, MBQ-167 inhibe la actividad de PAK, lo que contribuye a una reducción de las extensiones del citoesqueleto de actina y de la migración celular. Dado que Rac y Cdc42 también regulan a los miembros de la familia de la proteína del síndrome de Wiskott Aldrich (WASP) que contribuyen a la dinámica de la actina, MBQ-167 puede ejercer efectos inhibidores adicionales en el citoesqueleto.

30 Además, la Cdc42 regula la polaridad celular a través de las proteínas defectuosas de porción de polaridad (PAR6, 3), que estabilizan los microtúbulos durante la migración dirigida. Mediante el uso de un derivado haploide de la cepa de levadura BY4741, en el que el gen esencial Cdc42 se eliminó condicionalmente a través de un promotor inducible por tetraciclina, el MBQ-167 ejerce un fenotipo similar al de las células con expresión reducida de Cdc42. La supresión de Cdc42 suprime la polaridad celular, por lo que las yemas de levadura (células hijas) no se alinean simétricamente con las células madre. También se observó un efecto no polar similar en la brotación de células de levadura en presencia de MBQ-167. Este fenotipo mutante fue más pronunciado en las células de levadura tanto con la eliminación de Cdc42 como con el tratamiento con MBQ-167, lo que demuestra que MBQ-167 puede inhibir el altamente conservado Cdc42 de la levadura para regular la polaridad celular. Como se esperaba, el tratamiento con MBQ-167 también potenció los efectos inhibidores del crecimiento de la eliminación de Cdc42.

40 La regulación de la dinámica de los microtúbulos por las actividades de Rac y Cdc42 también es crítica para la progresión del ciclo celular, en el que Cdc42, y por lo tanto PAK, controla la formación del huso mitótico y la progresión del ciclo celular en G2/M (41, 42). Por lo tanto, la detención del ciclo celular del cáncer de mama metastásico mediada por MBQ-167 en la fase G2/M puede ser una consecuencia de la inhibición de Rac/Cdc42/PAK por MBQ-167.

45 La disminución de las actividades Rac/Cdc42/PAK, la viabilidad celular, la pérdida de polaridad celular y el desprendimiento del sustrato en respuesta a MBQ-167 se limita a las células cancerosas que han sufrido la transición epitelial a mesenquimal (EMT), pero no a las células epiteliales cancerosas o no cancerosas. Esta respuesta selectiva al MBQ-167 se puede deber a la expresión y actividades diferenciales de los GEF Rac y Cdc42 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, en el que se espera que sólo un subconjunto de los ~ 80 GEF Rac y Cdc42 conocidos se expresen y activen en las líneas celulares de cáncer de mama metastásico que se investigaron. Además, los inhibidores de Rac/Cdc42 actualmente disponibles sólo inhiben un subconjunto de GEF Rac/Cdc42. Por ejemplo, el NSC23766 sólo inhibe la activación de Tiam-1/y Trio de Rac, mientras que el EHOp-016 es un inhibidor específico de la interacción Vav/Rac. Por lo tanto, MBQ-167 puede inhibir sólo un subconjunto de GEF Rac/Cdc42 que se expresan/activan preferentemente en las líneas de células cancerosas más metastásicas de tipo mesenquimal.

60 Además, la relativa insensibilidad de las células de tipo epitelial a MBQ-167 se puede deber a que los hemidesmosomas en las células epiteliales están regulados principalmente por uniones mediadas por $\alpha\beta 4$ -integrinas al citoesqueleto de filamentos intermedios, que no están reguladas directamente por Rac y Cdc42. En cambio, las adhesiones focales en las células mesenquimales, que están reguladas por múltiples subunidades de integrinas para formar uniones con el citoesqueleto de actina, están bajo la regulación Rac/Cdc42/PAK. Por lo tanto,

la reducción y reorganización de las adhesiones focales observada en las células cancerosas tratadas con MBQ-167 puede reflejar la inhibición del ensamblaje de adhesiones focales mediado por integrinas y regulado por Rac/Cdc42/PAK en el borde anterior de la célula.

Las adhesiones focales no sólo son importantes para la migración dirigida, las interrupciones en la regulación adecuada de la adhesión celular a la MEC pueden dar lugar a la anoikis, apoptosis inducida por interacciones inadecuadas o inapropiadas entre la célula y la matriz. En este contexto, se ha demostrado que Rac1 confiere resistencia a la anoikis. Los datos revelados con los ensayos de caspasas y la reducción de las proteínas pro-supervivencia Bcl2-homología validan la hipótesis de que el MBQ-167 actúa como agente anticanceroso por medio de la inducción de la anoikis. Los datos muestran que sólo las células de cáncer de mama desprendidas responden al aumento de las actividades de la caspasa3/7 de MBQ-167, lo que indica que el desprendimiento de las células precede a la señalización de la apoptosis, como se predeciría durante la anoikis. Además, se demostró que MBQ-167 disminuye selectivamente la viabilidad de las líneas celulares cancerosas que han sufrido EMT, sin afectar a la línea celular no cancerosa MCF10A. Esta especificidad de la línea celular se podría deber a las diferencias en la dependencia de la señalización Rac/Cdc42/PAK y el compromiso de la integrina que la acompaña y el ensamblaje de la adhesión focal, en las células mesenquimales más migratorias en comparación con las células epiteliales. Además, el MBQ-167 puede tener efectos similares en otros múltiples tipos de cáncer, que incluyen un número de líneas celulares de ovario, estómago, páncreas y neuroblastoma que han sufrido EMT. Dado que la EMT se asocia con más propiedades similares a las de las células madre, la resistencia a la terapia y la recurrencia de la enfermedad, el MBQ-167 tiene potencial para reducir la resistencia a la terapia. Además, el hecho de que MBQ-167 sea eficaz contra la línea celular MIAPaCa-2, mutante de KRAS, demuestra su capacidad de dirigirse a los cánceres oncogénicos dependientes de RAS.

MBQ-167 también inhibe la fosforilación de STAT3, un factor de transcripción regulado por Rac que ha demostrado estar activo en diversos tipos de cáncer. Dado que la actividad de STAT3 aumenta la expresión de diversos genes implicados en la progresión del ciclo celular, su disminución de la actividad puede contribuir a la detención del ciclo celular observada por el tratamiento con MBQ-167. Es importante destacar que STAT3 regula transcripcionalmente los tres genes de la familia Bcl-2 pro-supervivencia analizados en este estudio. Además, diversos informes muestran que las propiedades similares a las de las células madre del cáncer dependen de la actividad de STAT3. En consecuencia, el MBQ-167 disminuye la eficiencia de formación de mamóferas de las células MDA-MB-231 en un ~ 50%. Estos resultados sugieren que el MBQ-167 puede ser más eficaz como terapéutico anticanceroso al dirigirse a poblaciones similares a las células madre del cáncer, quizás por medio de la inhibición específica de la actividad de las células madre del cáncer.

Por último, el MBQ-167 reduce el tamaño del tumor de la almohadilla de grasa mamaria a partir de las 3 semanas posteriores al tratamiento, con una reducción del 91% a los 2 meses a una concentración no tóxica de 10 mg/kg de peso corporal. La drástica reducción de los tumores mamarios también dio lugar a una inhibición del 100% de las metástasis en todos los órganos probados, probablemente porque los tumores pequeños desprendieron menos células. Como demuestran los datos *in vitro*, se prevé que la reducción del tamaño del tumor en respuesta al tratamiento con MBQ-167 se debe a la inhibición de la señalización Rac/Cdc42/PAK, que en última instancia conduce a una pérdida de la viabilidad, el crecimiento y la polaridad de las células, lo que hace que éstas se desprendan del tumor y sufran anoikis. Dado que no se observó ninguna metástasis en los ratones tratados con MBQ-167, las células desprendidas del tumor primario probablemente pasen por anoikis y no sobrevivan en la circulación.

De manera similar, en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con tumores mamarios MDA-MB-231, MBQ-167 inhibió el crecimiento del tumor en un 90%, 95% y 100% a dosis de 1, 5 y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente (FIG. 16).

En conjunto, MBQ-167 es un inhibidor eficaz de Cdc42 y Rac que disminuye significativamente la señalización descendente y las funciones celulares promotoras del cáncer para, en última instancia, reducir el crecimiento de los tumores mamarios con una potencia 10 veces mayor que el primer inhibidor de Rac descrito, EHop-016. Sin embargo, los efectos de MBQ-167 sobre el fenotipo de las células cancerosas metastásicas, en el que las células se desprenden del sustrato para acabar sufriendo apoptosis por mecanismos de anoikis, se pueden deber a efectos adicionales de MBQ-167 sobre la señalización de las integrinas o a mecanismos alternativos. No obstante, el espectacular efecto del MBQ-167 sobre el crecimiento de los tumores mamarios de ratón justifica un mayor desarrollo del MBQ-167 como terapia anticancerosa.

Ejemplos

Datos de MBQ-167 (9-etil-3-(5-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)-9H-carbazol)

FIG. 1. El 3-azido-9-etilcarbazol recién preparado se hizo reaccionar con fenilacetiluro de magnesio para generar el intermedio 4-halomagnesiotriazol, que se apagó con cloruro de amonio al 10% para obtener 9-etil-3-(5-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)-9H-carbazol (MBQ-167) en un 86% de rendimiento.

FIG. 2A; FIG. 2B. El MBQ-167 afecta a la polaridad de las células cancerosas metastásicas sin afectar a las células

cancerosas no metastásicas. A ≥ 100 nM, a partir de las seis horas MBQ-167 induce una pérdida de polaridad y desprendimiento del sustrato en las células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 pero no en las células de cáncer de mama humano no metastásico MCF-7. 250nM MBQ-167 hace que el ~70% de las células pierdan la polaridad y asuman un fenotipo redondeado. Las concentraciones más altas de MBQ-167, es decir, 500nM durante 24 hs, provocan una pérdida de polaridad celular de ~90% y se desprenden del sustrato.

FIG. 2A; FIG. 9. Este dramático redondeo y desprendimiento en respuesta a MBQ-167 se demuestra en las células de cáncer de mama mesenquimal de tipo HER2 y triple negativo (MDA-MB-231, Hs578t, MDA-MB-468 y HER2-BM), así como en otras líneas celulares de cáncer metastásico: Cáncer de páncreas Mia-PaCa-2 (con mutación G12C kRas), cáncer de ovario SKOV3, cáncer gástrico NCI-N87 y neuroblastoma SH-SY5Y. Este efecto fue menor en las células de cáncer de mama MCF-10A y MCF-7, más epiteliales, y en las células primarias de cáncer gástrico AGS.

FIG. 15. En *Saccharomyces cerevisiae* (levadura en ciernes) que sólo expresa Cdc42, que regula la polaridad y la división celular, el tratamiento con 100 microM de MBQ-167 inhibió la polaridad de los brotes de levadura y el crecimiento, lo que sugiere que el efecto sobre la polaridad celular puede ser a través de la inhibición de Cdc42 por MBQ-167.

FIG. 2B. La tinción de la F-actina con faloidina de rodamina muestra una pérdida de invadopodios y filopodios, estructuras móviles basadas en la F-actina y reguladas por Rac y Cdc42, en respuesta a MBQ-167.

FIGS. 2B, C. La inmunotinción con un anticuerpo anti fosfotirosina o vinculina, para las adhesiones focales que se forman por el compromiso de los receptores de integrina con la MEC, demuestran una dramática reordenación de las adhesiones focales durante el redondeo celular, en el que las adhesiones focales se desplazan desde el borde de la célula hacia el centro de la misma y aparecen más desorganizadas.

FIG. 3. MBQ-167 inhibe la actividad Rac 1/2/3 en la línea celular de cáncer de mama metastásico humano MDA-MB-231 con un IC_{50} de 103 nM, y la actividad Cdc42 con un IC_{50} de 78 nM.

Tabla 1. A 250 nM MBQ-167 inhibe las actividades Rac y Cdc42 de las células MDA-MB-231 sin afectar a la actividad de la isoforma cercana Rho.

FIG. 10. MBQ-167 también inhibe las actividades Rac y Cdc42 de las células humanas de cáncer de mama metastásico GFP-HER2-BM. El MBQ-167 no afecta a la actividad de Rho.

Tabla 2. MBQ-167 (250 nM) no afecta a la actividad Rac de MCF-7, una línea celular de cáncer de mama humano no metastásico.

FIG. 7. MBQ-167 tampoco inhibe la actividad Rac de una línea celular de cáncer metastásico constitutivamente activa (MDA-MB-435-Rac1G12V), lo que indica que MBQ-167 inhibe la carga de GTP a Rac.

FIG. 3, FIG. 10. En las células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM, las actividades de Rac, Cdc42 y el efector descendente de Rac y Cdc42, la quinasa activada por p21 PAK, se redujeron en un 75, 85 y 90%, respectivamente, en las células desprendidas en comparación con los controles con vehículo, mientras que estas actividades se redujeron menos (~25%) en la población adherida.

FIG. 8. En las células de cáncer gástrico NCI-N87, MBQ-167 disminuye significativamente la actividad (pero no la expresión) del efector descendente Rac y Cdc42 quinasa activada por p21 (PAK 1, 2, 4), como se demostró por medio de western blotting con anticuerpos contra residuos fosfóricos totales y activos.

FIG. 11. MBQ-167 no inhibe las actividades PAK de la línea celular primaria de cáncer de mama MCF-7.

FIGS. 4B, 4C. En las células MDA-MB-231, 250 nM de MBQ-167 inhibe la señalización descendente de PAK, como se evidencia por medio de western blot para la fosforilación activadora (Y507/T508) del sustrato directo de PAK, la LIM quinasa (LIMK), y la fosforilación inactivadora (S3) del sustrato de LIMK, la cofilina (factor de despolimerización de la actina).

FIG. 4D, FIG. 12A. En las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM, MBQ-167 reduce la actividad del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT3). Sin embargo, el MBQ-167 no afecta a las actividades de la cinasa activada por mitógenos (MAPK) p42/44, p38-MAPK o Akt de las células MDA-MB-231.

FIG. 4E, 4F; FIG. 12B. La inhibición de la señalización Rac/Cdc42 mediada por MBQ-167 da lugar a una inhibición del 80 a 90% de la migración de las células MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM, como demuestran los ensayos Transwell y de curación de heridas.

FIG. 4G. La eficiencia de formación de mamíferas de las células MDA-MB-231 se reduce significativamente en un ~50%, tras un tratamiento de 4 días con MBQ-167.

FIG. 5A. Las células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 y GFP-HER2-BM incubadas en 1000 nM de MBQ-167 durante 120 hs experimentan una muerte celular de ~100% con un IG_{50} de 110 nM para las células MDA-

MBQ-231 y un IG_{50} de 150 nM para las células GFP-HER2-BM. El MBQ-167 tampoco afecta a la viabilidad de las células de cáncer de mama no metastásico MCF7 o de las células epiteliales mamarias MCF-10A a estas concentraciones. El IG_{50} para las células epiteliales MCF10A a 350 nM de MBQ-167 es ~3 veces mayor que el de las células de cáncer de mama metastásico.

- 5 **FIG. 8A. Viabilidad NCI-N87.** 250 nM de MBQ-167 redujeron la viabilidad de las células NCI-N87 en un 55%, de acuerdo con lo analizado en un ensayo de MTT.

FIG. 5B. El tratamiento con MBQ-167 durante 24 hs a células MDA-MB-231 combinadas adheridas y desprendidas produce una detención de la fase G2/M.

- 10 **FIG. 5C; FIG. 14.** Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 desprendidas responden a MBQ-167 por medio del aumento de las actividades de la caspasa 3/7. Las células adheridas inician la apoptosis en respuesta a 250 a 500 nM de MBQ-167 a las 6 hs, como muestra la tinción de Anexina V.

FIG. 5D. El tratamiento con MBQ-167 de las células MDA-MB-231 durante 24 hs produce una reducción de la expresión de las proteínas mitocondriales pro-supervivencia de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1).

- 15 **FIG. 6A, 6B. Tablas 3, 4.** En ratones desnudos con tumores de almohadilla de grasa mamaria establecidos con células GFP-HER2-BM, 1,0 mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produce una reducción de ~80% en el crecimiento del tumor, y el tratamiento con 10mg/kg de peso corporal de MBQ-167 produce una reducción de ~95% en el crecimiento del tumor en 65 días. Los datos indican una reducción drástica del crecimiento tumoral en los ratones tratados con 10 mg/kg BW de MBQ-167, con una inhibición significativa del crecimiento tumoral iniciada tras 24 días de tratamiento con 1 o 10 mg/kg BW de MBQ-167.

- 20 **FIG. 16. MB-231 Crecimiento del tumor mamario.** En ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) portadores de tumores de almohadilla de grasa mamaria GFP-MDA-MB-231, el tratamiento con 1,0 mg/kg de peso de MBQ-167 produjo una inhibición del 90% del crecimiento tumoral, el tratamiento con 5,0 mg/kg de peso produjo una inhibición del 95% del crecimiento tumoral y el tratamiento con 10mg/kg de peso de MBQ-167 produjo una inhibición del 100% del crecimiento tumoral en 50 días.

- 25 **FIG. 6B.** Debido a esta drástica reducción del crecimiento del tumor, MBQ-167 inhibe la metástasis, a todos los órganos probados (pulmones, huesos, corazón, bazo, riñón, hígados), en un 100%.

FIG. 6C. MBQ-167 no ejerce efectos tóxicos sobre el peso o el fenotipo de los ratones inmunocomprometidos desnudos o SCID.

- 30 **FIG. 6D, 6E.** El MBQ-167 no afecta significativamente a la actividad de la fosfatasa alcalina hepática (ALP), pero aumenta la actividad de la alanina transaminasa hepática (ALT).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

- 35 Como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Se señala además que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base previa para el uso de terminología exclusiva como “únicamente”, “sólo” en relación con la recitación de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación “negativa”.

- 40 Como se utilizan en la presente memoria, los términos “que incluye”, “que contiene” y “que comprende” se utilizan en su sentido abierto y no limitante.

- 45 Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en la presente memoria no están calificadas con el término “sobre”. Se entiende que, tanto si se utiliza el término “aproximadamente” de forma explícita como si no, toda cantidad indicada en la presente memoria se refiere al valor real dado, y también se refiere a la aproximación a dicho valor dado que podría inferirse razonablemente basándose en los conocimientos ordinarios de la técnica, que incluyen las equivalencias y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado. A condición de que se indique un rendimiento en porcentaje, dicho rendimiento se refiere a una masa de la entidad para la que se indica el rendimiento con respecto a la cantidad máxima de la misma entidad que se podría obtener en las condiciones estequiométricas particulares. Las concentraciones que se indican como porcentajes se refieren a las relaciones de masas, a menos que se indique lo contrario.

Salvo que se indique lo contrario, los procedimientos y técnicas de las presentes realizaciones se llevan a cabo generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo Loudon, *Organic Chemistry*, Cuarta Edición, Nueva York: Oxford University Press,

2002, págs. 360 a 361, 1084 a 1085 Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta Edición, Wiley-Interscience, 2001.

La nomenclatura química de los compuestos descritos en la presente memoria se ha obtenido generalmente mediante el uso del programa comercial ACD/Name 2014 (ACD/Labs) o ChemBioDraw Ultra 13.0 (Perkin Elmer).

- 5 Se aprecia que ciertas características de la divulgación, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden ser proporcionadas en combinación en una sola realización. A la inversa, varias características de la divulgación, que se describen, por brevedad, en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones relativas a los grupos químicos representados por las variables están específicamente comprendidas en la presente divulgación y se desvelan en la presente memoria como si todas y cada una de las combinaciones se desvelaran individual y explícitamente, en la medida en que dichas combinaciones abarcan compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que se pueden aislar, caracterizar y someter a pruebas de actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de los grupos químicos enumerados en las realizaciones que describen dichas variables también se incluyen específicamente en la presente divulgación y se desvelan en la presente memoria como si todas y cada una de dichas subcombinaciones de grupos químicos se desvelaran individual y explícitamente en la presente memoria.

Definiciones

- 20 Como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" incluye una cadena de átomos de carbono, opcionalmente ramificada, que contiene de 1 a 20 átomos de carbono. Se debe entender además que en ciertas realizaciones, el alquilo puede ser ventajosamente de longitud limitada, que incluyen C₁-C₁₂, C₁-C₁₀, C₁-C₉, C₁-C₈, C₁-C₇, C₁-C₆, y C₁-C₄. Ilustrativamente, tales grupos alquilo de longitud particularmente limitada, que incluyen C₁-C₈, C₁-C₇, C₁-C₆, y C₁-C₄, se pueden denominar como "alquilo inferior". Los grupos alquilos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo,. Los alquilos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Los grupos sustituyentes típicos incluyen cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, hidroxi, alcoxi, arilo, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonilo, oxo, (=O), tiocarbonilo, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, C-carboxi, O-carboxi, nitro, y amino, o como se describe en las diversas realizaciones en la presente memoria previstas. Se entenderá que el "alquilo" se puede combinar con otros grupos, tales como los previstos anteriormente, para formar un alquilo funcionalizado. A modo de ejemplo, la combinación de un grupo "alquilo", como se describe en la presente memoria, con un grupo "carboxi" se puede denominar grupo "carboxialquilo". Otros ejemplos no limitantes incluyen hidroxialquilo, aminoalquilo.

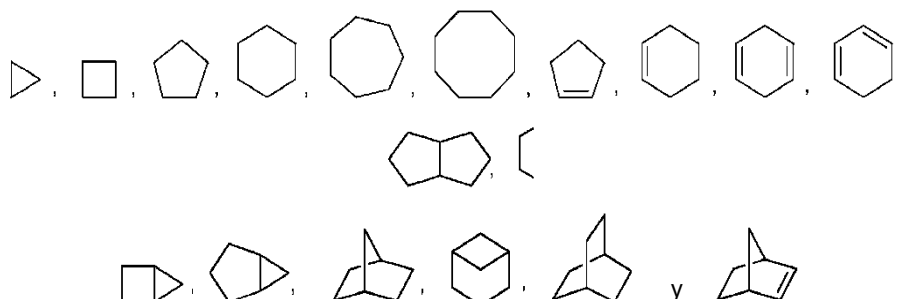
- 35 Como se utiliza en la presente memoria, el término "alquenilo" incluye una cadena de átomos de carbono, opcionalmente ramificada, que contiene de 2 a 20 átomos de carbono, y también incluye al menos un doble enlace carbono-carbono (es decir, C=C). Se entenderá que en ciertas realizaciones, el alquenilo puede ser ventajosamente de longitud limitada, que incluyen C₂-C₁₂, C₂-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄. Ilustrativamente, tales grupos alquenilo de longitud particularmente limitada, que incluyen C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆, y C₂-C₄ se pueden denominar como alquenilo inferior. El alquenilo puede estar sin sustituir, o sustituido como se describe para el alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-, 2-, o 3-butenilo.

- 40 Como se utiliza en la presente memoria, el término "alquinilo" incluye una cadena de átomos de carbono, que es opcionalmente ramificada, y contiene de 2 a 20 átomos de carbono, y también incluye al menos un triple enlace carbono-carbono (es decir, C≡C). Se entenderá que en ciertas realizaciones, los alquilos pueden ser ventajosamente de longitud limitada, que incluyen C₂-C₁₂, C₂-C₉, C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆ y C₂-C₄. Ilustrativamente, tales grupos alquinilo de longitud particularmente limitada, que incluyen C₂-C₈, C₂-C₇, C₂-C₆, y C₂-C₄ se pueden denominar como alquinilo inferior. El alquenilo puede estar sin sustituir, o sustituido como se describe para el alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. Los grupos alquenilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, etilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-, 2-, o 3-butilo.

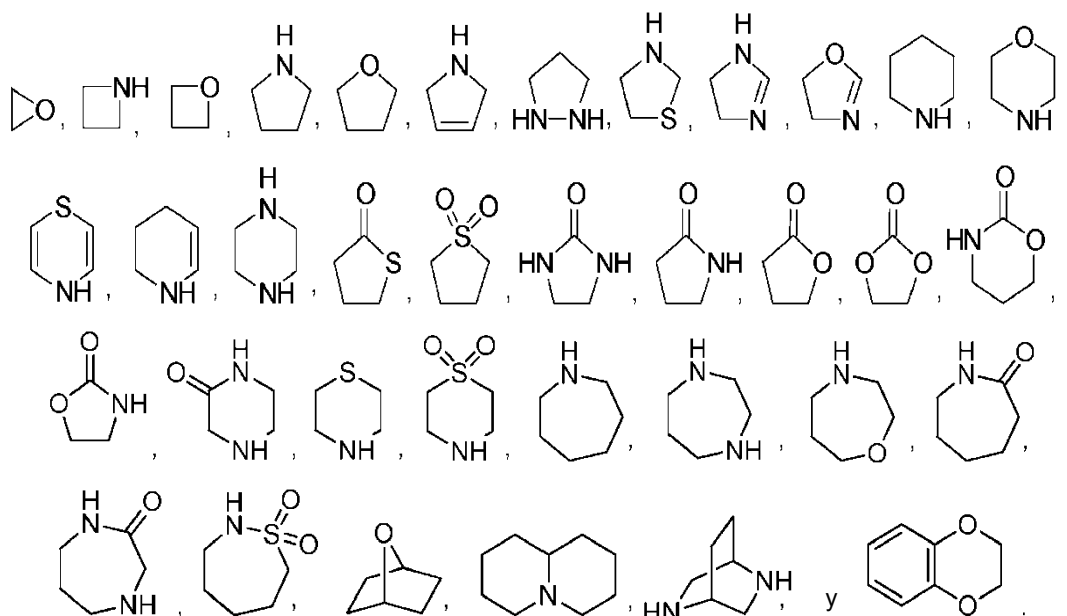
- 50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un grupo monocíclico de 6 a 12 átomos de carbono o a un grupo policíclico de anillos fusionados que tiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en ciertas realizaciones, el arilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado, tal como el arilo C₆-C₁₀. Los grupos arilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftenilo y antraceno. El grupo arilo puede estar sin sustituir, o sustituido como se describe para los alquilos o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria.

- 55 Como se utiliza en la presente memoria, el término "cicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico de 3 a 15 miembros, que incluyen un anillo bicíclico fusionado de 5 miembros/6 miembros o 6 miembros/6 miembros, o un grupo de anillos multicíclicos fusionados (un sistema de anillos "fusionados" significa que cada anillo en el sistema comparte un par adyacente de átomos de carbono con cada uno de los otros anillos en el sistema), en el que uno o más de los anillos pueden contener uno o más dobles enlaces pero el cicloalquilo no contiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. Se entenderá que en ciertas realizaciones, los cicloalquilos pueden ser

ventajosamente de tamaño limitado tales como C_3-C_{13} , C_3-C_9 , C_3-C_6 y C_4-C_6 . El cicloalquilo puede estar sin sustituir, o sustituido como se describe para el alquilo o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. Los grupos cicloalquilos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, adamantilo, norbornilo, norbornenilo, 9H-fluoren-9-ilo. Entre los ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilos que aparecen en las representaciones gráficas se encuentran las siguientes entidades, en forma de motivos debidamente enlazados

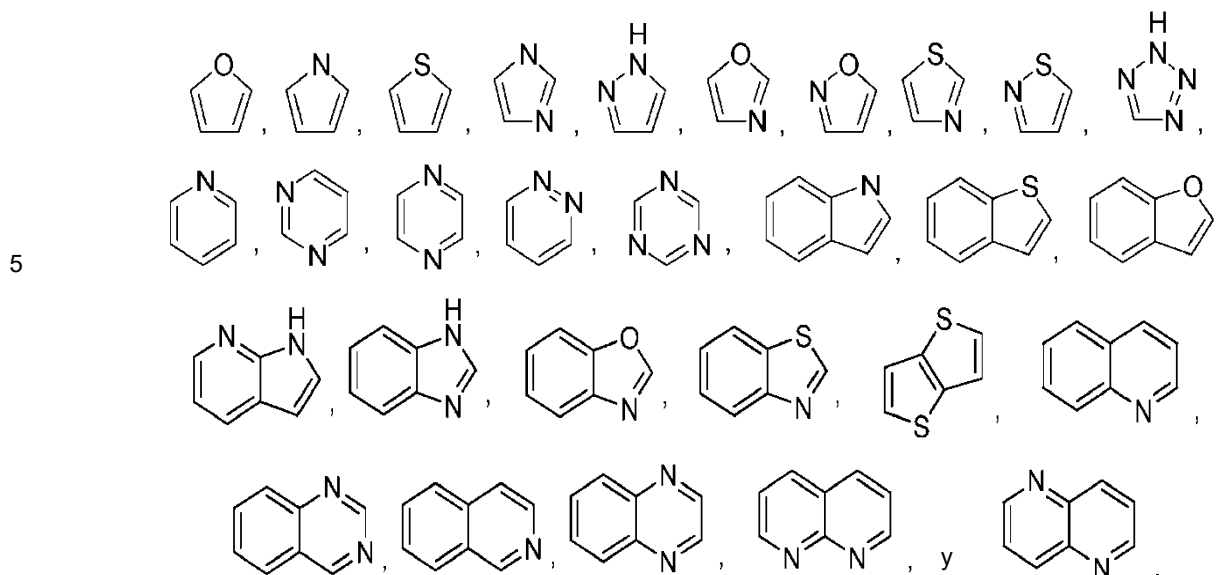


Como se utiliza en la presente memoria, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo monocíclico o de anillo fusionado que tiene en el/los anillo(s) de 3 a 12 átomos de anillo, en el que al menos un átomo de anillo es un heteroátomo, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre, los restantes átomos de anillo son átomos de carbono. Los heterocicloalquilos pueden contener opcionalmente 1, 2, 3 o 4 heteroátomos. Los heterocicloalquilos también pueden tener uno o más dobles enlaces, incluidos los dobles enlaces al nitrógeno (por ejemplo, $C=N$ o $N=N$), pero no contienen un sistema de electrones π completamente conjugado. Se entenderá que en ciertas realizaciones, el heterocicloalquilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado, tal como el heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, el heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros. Los heterocicloalquilos pueden estar sin sustituir o sustituidos como se describe para los alquilos o como se describe en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. Los grupos heterocíclicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, oxiranilo, tianarilo, azetidino, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranoilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, morfolinilo, 1,4-ditianoilo, piperazinilo, oxepanilo, 3,4-dihidro-2H-piranilo, 5,6-dihidro-2H-piranilo, 2H-piranilo, 1, 2, 3, 4-tetrahidropiridinilo. Entre los ejemplos ilustrativos de grupos heterocicloalquilos que aparecen en las representaciones gráficas se encuentran las siguientes entidades, en forma de motivos debidamente enlazados:



Como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo de anillos monocíclicos o fusionados de 5 a 12 átomos de anillo que contienen uno, dos, tres o cuatro heteroátomos de anillo seleccionados de entre nitrógeno, oxígeno y azufre, los restantes átomos de anillo son átomos de carbono, y que también tienen un sistema de electrones π completamente conjugado. Se entenderá que en ciertas realizaciones, el heteroarilo puede ser ventajosamente de tamaño limitado, tal como el heteroarilo de 3 a 7 miembros, el heteroarilo de 5 a 7 miembros. El heteroarilo puede estar sin sustituir, o sustituido como se ha descrito para el alquilo o como se ha descrito en las diversas realizaciones proporcionadas en la presente memoria. Los grupos heteroarilo ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, pirrolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirimidinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, purinilo, tetrazolilo, triazinilo, pirazinilo, tetrazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, tienilo, isoxazolilo,

isotiazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzisoxazolilo, benzisotiazolilo y carbazoloilo. Los ejemplos ilustrativos de grupos heteroarilo mostrados en representaciones gráficas, incluyen las siguientes entidades, en forma de motivos debidamente enlazados:



Como se utiliza en la presente memoria, “hidroxi” o “hidroxilo” se refiere a un grupo -OH.

10 Como se utiliza en la presente memoria, "alcoxi" se refiere tanto a un grupo -O-(alquilo) como a un grupo -O-(cicloalquilo no sustituido). Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclopropiloxi, ciclobutiloxi, ciclopentiloxi, ciclohexiloxi.

Como se utiliza en la presente memoria, “ariloxi” se refiere a un grupo -O-arilo o a un grupo -O-heteroarilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, fenoxi, piridiniloxi, furaniloxi, tieniloxi, pirimidiniloxi, piraziloxi.

Como se utiliza en la presente memoria, “mercapto” se refiere a un grupo -SH.

15 Como se utiliza en la presente memoria, “alquilito” se refiere a un grupo -S-(alquilo) o a un grupo -S-(cicloalquilo no sustituido). Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, metiltio, etiltio, propiltio, butiltio, ciclopropiltio, ciclobutiltio, ciclopentiltio, ciclohexiltio.

Como se utiliza en la presente memoria, "arilitio" se refiere a un grupo -S-arilo o -S-heteroarilo. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, feniltio, piridiniltio, furaniltio, tieniltio, pirimidiniltio.

20 Como se utiliza en la presente memoria, “halo” o “halógeno” se refiere al flúor, cloro, bromo o yodo.

Como se utiliza en la presente memoria, “ciano” se refiere a un grupo -CN.

El término “oxo” representa un oxígeno de carbonilo. Por ejemplo, un ciclopentilo sustituido con oxo es la ciclopentanona.

Como se utiliza en la presente memoria, “enlace” se refiere a un enlace covalente.

25 El término “sustituido” significa que el grupo o la fracción especificada lleva uno o más sustituyentes. El término “no
sustituido” significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. Cuando se utiliza el término “sustituido” para
describir un sistema estructural, se entiende que la sustitución se produce en cualquier posición de valencia
permitida en el sistema. En algunas realizaciones, “sustituido” significa que el grupo o la fracción especificada lleva
uno, dos o tres sustituyentes. En otras realizaciones, “sustituido” significa que el grupo o la fracción especificada
30 lleva uno o dos sustituyentes. En otras realizaciones, “sustituido” significa que el grupo o la fracción especificada
lleva un sustituyente.

35 Como se utiliza en la presente memoria, “opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir pero no necesariamente, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, “donde cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está independientemente sustituido opcionalmente por alquilo C₁-C₆” significa que un alquilo puede estar presente, pero no necesariamente, en cualquiera de los alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico por medio

de la sustitución de un átomo de hidrógeno por cada grupo alquilo, y la descripción incluye situaciones en las que el alquilo C₁-C₆, el alquenilo C₂-C₆, el alquinilo C₂-C₆, el cicloalquilo C₃-C₆, el heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, el arilo C₆-C₁₀ o el heteroarilo monocíclico o bicíclico están sustituidos con un grupo alquilo y situaciones en las que el alquilo C₁-C₆, el alquenilo C₂-C₆, el alquinilo C₂-C₆, el cicloalquilo C₃-C₆, el heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, el arilo C₆-C₁₀ o el heteroarilo monocíclico o bicíclico no están sustituidos con el grupo alquilo.

Como se utiliza en la presente memoria, "independientemente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente se debe leer por sí mismo en relación con otros eventos o circunstancias similares. Por ejemplo, en una circunstancia en la que diversos grupos de hidrógeno equivalentes están opcionalmente sustituidos por otro grupo descrito en la circunstancia, el uso de "independientemente opcionalmente" significa que cada instancia de un átomo de hidrógeno en el grupo puede ser sustituido por otro grupo, en el que los grupos que sustituyen a cada uno de los átomos de hidrógeno pueden ser iguales o diferentes. O, por ejemplo, cuando existen múltiples grupos que se pueden seleccionar de un conjunto de posibilidades, el uso de "independientemente" significa que cada uno de los grupos se puede seleccionar del conjunto de posibilidades por separado de cualquier otro grupo, y los grupos seleccionados en la circunstancia pueden ser los mismos o diferentes.

Como se utiliza en el presente la presente memoria, el término "sal aceptable para uso farmacéutico" se refiere a aquellas sales que contrarrestan los iones que se pueden utilizar en los productos farmacéuticos. Véase, en general, S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1 a 19. Las sales aceptables para uso farmacéutico preferidas son aquellas que son farmacológicamente efectivas y adecuadas para el contacto con los tejidos de los sujetos sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebidas. Un compuesto descrito en la presente memoria puede poseer un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico, ambos tipos de grupos funcionales, o más de uno de cada tipo, y en consecuencia reaccionar con un número de bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal aceptable para uso farmacéutico. Dichas sales incluyen:

(1) las sales de adición de ácido, que se pueden obtener por medio de reacción de la base libre del compuesto parental con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido málico (D) o (L), ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico; o

(2) las sales que se forman cuando un protón ácido presente en el compuesto original se sustituye por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio, o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trimetamina o N-metilglucamina.

Las sales aceptables para uso farmacéutico son bien conocidas por los expertos en la técnica, y cualquier sal aceptable para uso farmacéutico se puede contemplar en relación con las realizaciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos de sales aceptables para uso farmacéutico incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrógeno-fosfatos, dihidrógeno-fosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butileno-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, metilsulfonatos, propilsulfonatos, besilatos, xilenosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ-hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos y mandelatos. Las listas de otras sales aceptables para uso farmacéutico adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ma Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985.

Para un que contiene un nitrógeno básico, una sal aceptable para uso farmacéutico se puede preparar por medio de cualquier procedimiento adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido fosfórico, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaléico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido valérico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido láurico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa-hidroxiácido, tal como ácido mandélico, ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido naftóico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido laurilsulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico o ácido etanosulfónico, o cualquier mezcla compatible de ácidos tales como los que se dan como ejemplos en la presente memoria, y cualquier otro ácido y mezcla de los mismos que se consideren equivalentes o sustitutos aceptables a la luz del nivel ordinario de conocimientos en esta tecnología.

La divulgación también se refiere a profármacos aceptables para uso farmacéutico de los compuestos y procedimientos de tratamiento que emplean dichos profármacos aceptables para uso farmacéutico. El término "profármaco" se refiere a un precursor de un compuesto designado que, tras su administración a un sujeto, produce el compuesto *in vivo* por medio de un proceso químico o fisiológico, tales como la solvólisis o la escisión enzimática, o en condiciones fisiológicas (por ejemplo, un profármaco al ser llevado a pH fisiológico se convierte en el compuesto de acuerdo con la presente divulgación). Un "profármaco aceptable para uso farmacéutico" es un

profármaco no tóxico, biológicamente tolerable y biológicamente adecuado para su administración al sujeto. Se describen procedimientos ilustrativos para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados, por ejemplo, en *"Design of Prodrugs"*, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Cualquier fórmula representada en la presente memoria pretende representar un compuesto de esa fórmula estructural, así como ciertas variaciones o formas. Por ejemplo, una fórmula dada en la presente memoria pretende incluir una forma racémica, o uno o más isómeros enantioméricos, diastereoméricos o geométricos, o una mezcla de los mismos. Además, cualquier fórmula dada en la presente memoria pretende referirse también a un hidrato, solvato o polimorfo de dicho compuesto, o a una mezcla del mismo. Por ejemplo, se apreciará que los compuestos representados por una fórmula estructural que contenga el símbolo



incluyen ambos estereoisómeros para el átomo de carbono al que se une el símbolo



, concretamente ambos enlaces



y



se engloban en el significado de



Cualquier fórmula dada en la presente memoria también pretende representar formas no etiquetadas así como formas etiquetadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en la presente memoria, excepto que uno o más átomos se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa seleccionados. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la divulgación incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl y ^{125}I , respectivamente. Dichos compuestos marcados isotópicamente son útiles en estudios metabólicos (preferentemente con ^{14}C), estudios cinéticos de reacción (con, por ejemplo, ^2H o ^3H), técnicas de detección o imagen [tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT)], que incluyen ensayos de distribución tisular de fármacos o sustratos, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio (es decir, ^2H), puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la vida media *in vivo* o una reducción de las necesidades de dosificación. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente divulgación y los profármacos de los mismos se pueden preparar generalmente por medio de la realización de los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritos a continuación, por medio de la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible por un reactivo no marcado isotópicamente.

Cualquier disustituyente al que se haga referencia en la presente memoria pretende abarcar las diversas posibilidades de unión cuando se permite más de una de dichas posibilidades. Por ejemplo, la referencia al disustituyente -A-B-, en el que $A \neq B$, se refiere en la presente memoria a dicho disustituyente con A unido a un primer miembro sustituido y B unido a un segundo miembro sustituido, y también se refiere a dicho disustituyente con A unido al segundo miembro sustituido y B unido al primer miembro sustituido.

Materiales y procedimientos

Síntesis de MBQ-167

Todos los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemical Company. La síntesis del 3-Azido-9-etil-9H-carbazol **3** es la siguiente (FIG. 1).

Etapa 1: A una solución de 2,10 g (10,0 mmol) de 9-etil-9H-carbazol-3-il-amina **1** en 20 mL de agua, se añadieron 2,0 mL (40,0 mmol) de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Cuando toda la amina se convirtió en sulfato (precipitado verde), se añadieron 10 mL más de agua y la suspensión se enfrió a 0 a 5 °C en un baño de agua helada. Se añadió gota a gota una solución de 0,828 g (12,0 mmol) de nitrito de sodio (NaNO_2) en 5 mL de agua y se agitó la mezcla durante 1 hora. A continuación, se añadió gota a gota una solución de 0,780 g (12,0 mmol) de azida de sodio (NaN_3) en 5 mL de agua y se agitó continuamente durante 2 a 8 hs. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se calentó a 25 °C, se añadieron 30 mL de acetato de etilo y 20 mL de agua destilada y, tras mezclar enérgicamente, se separaron las capas. La capa orgánica se extrajo con 10 mL de salmuera, se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. Tras la cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexanos/acetato de etilo 3:1 como eluyente, se obtuvo el 3-Azido-9-etil-9H-carbazol **3** como un

sólido blanquecino en un rendimiento de 1,79 g (7,58 mmol = 76%). El producto se identificó con TLC y espectroscopia de RMN. R_f 0,82 (3:1, Hexano/Acetato de Etilo); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,43 (t, J = 7,19 Hz, 3H), 4,37 (q, J = 7,19 Hz, 2H), 7,14 (dd, J = 2,17, 8,63 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 7,13 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,64 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,24 Hz, 1H), 7,49 (t, J = 7,14 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,19 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 7,80 Hz, 1H); ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14,1, 38,0, 109,0, 109,8, 110,7, 117,5, 119,3, 120,9, 122,5, 124,2, 126,6, 131,4, 137,8 140,9.

Etapa 2: Síntesis del 1-(9-Etil-9H-carbazol-3-il)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol 6 (MBQ-167). En un matraz de fondo redondo de 3 mL que contenía fenilacetileno 0,11 g (1,1 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota una solución de bromuro de etilmagnesio en THF 1,1 mL (1,1 mmol) a 25 °C. Después de añadir el reactivo de Grignard, la mezcla se calentó a 50 °C durante 15 minutos y se enfrió a 25 °C. Se añadió gota a gota una solución de 0,24 g (1,0 mmol) de azida 3 en THF (1,0 M) y se calentó a 50 °C durante 1 hora. Después de apagar con cloruro de amonio al 10%, los productos se extrajeron con acetato de etilo (3X). La capa orgánica se lavó con 10 mL de salmuera, se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un rotavapor para obtener el material bruto (0,33 g). El aceite crudo se purificó por medio de cromatografía en gel de sílice para obtener 0,29 g (0,86 mmol = 86%) de 1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol **MBQ-167** como un sólido blanco. La pureza ($\geq 98\%$) se verificó por medio de TLC, espectroscopia de RMN y GC/MS: R_f 0,26 (3:1, hexano/acetato de etilo); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,47 (t, J = 7,22 Hz, 3H), 4,38 (q, J = 7,22 Hz, 2H), 7,26 a 7,33 (m, 6H), 7,36 (dt, J = 1,76, 8,60 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,84 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 8,32 Hz, 1H), 7,53 (t, J = 7,32 Hz, 1H), 7,93 (s, 1H), 8,20 (d, J = 7,84 Hz, 1H), 8,15 (d, J = 1,80 Hz, 1H); ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 13,8, 37,9, 108,7, 108,9, 117,9, 119,5, 120,8, 122,5, 123,0, 123,2, 126,6, 127,1, 128,3, 128,5, 128,8, 129,0, 133,1, 138,0, 139,8, 140,7. LRGC-MS m/z (% rel): $[\text{M}]^+ 338$ (37), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+ 310$ (55), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}]^+ 295$ (100), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2]^+ 281$ (34), $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3]^+ 179$ (34).

9-etil-3-(5-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol(I-1).

Etapa 1: Síntesis de 3-Azido-9-etil-9H-carbazol: A una suspensión de 2,10 g (10,0 mmol) de 9-etil-9H-carbazol-3-il amina en 20 mL de agua, se añadieron 2,0 mL (40,0 mmol) de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Cuando toda la amina se ha convertido en sulfato (precipitado verde), se añaden 10 mL más de agua y se enfría la suspensión a 0 a 5 °C en un baño de agua helada. Se añadió gota a gota una solución de 0,828 g (12,0 mmol) de nitrito de sodio (NaNO_2) en 5 mL de agua, y se agita la mezcla durante 1 hora. Con fuerte agitación, se añadió gota a gota una solución de 0,780 g (12,0 mmol) de azida de sodio (NaN_3) en 5 mL de agua y se continúa agitando durante 2 a 8 hs. Después de que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente, se añadieron 30 mL de acetato de etilo y 20 mL de agua destilada y, tras mezclar energicamente, se separaron las capas con la ayuda de un embudo de separación. La capa orgánica se extrajo con 10 mL de salmuera, se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio para obtener un aceite marrón crudo. Tras la cromatografía en gel de sílice mediante el uso de 3 : 1 hexanos/acetato de etilo como el eluyente, se obtuvo el 3-Azido-9-etil-9H-carbazol 2 como un compuesto puro en un rendimiento de 1,79 g (7,58 mmol = 76% del material crudo). El producto se identificó con TLC, RMN y GC/MS. R_f 1,00 (3:1, hexano/acetato de etilo); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,43 (t, J = 7,26 Hz, 3H), 4,37 (q, J = 7,24 Hz, 2H), 7,14 (dd, J = 2,17, 8,63 Hz, 1H), 7,24 (t, J = 7,13 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,64 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,24 Hz, 1H), 7,49 (t, J = 8,17 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,19 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 7,80 Hz, 1H); ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 13,7, 37,6, 109,2, 108,6, 109,4, 110,3, 117,1, 118,9, 120,2, 120,6, 122,1, 123,8, 126,2, 131,0, 137,5, 140,5.

Etapa 2: Síntesis del 1-(9-Etil-9H-carbazol-3-il)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol (I-1). A un matraz de fondo redondo de 3 mL que contenía fenilacetileno 0,11 g (1,1 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota una solución de bromuro de etilmagnesio (EtMgBr) en THF 1,1 mL (1,1 mmol) a temperatura ambiente. Después de añadir el bromuro de etilmagnesio, la mezcla se calentó a 50 °C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de 0,24 g (1,0 mmol) de azida 2 en THF (1,0 M) y se calentó la mezcla a 50 °C durante 1 hora. Tras el enfriamiento con una solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) al 10%, los productos se extrajeron con acetato de etilo (3X). La capa orgánica se lavó con 10 mL de salmuera, se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un rotavapor para obtener el material bruto (0,1104 g). El aceite crudo se purificó por medio de cromatografía en gel de sílice para obtener 0,29 g (0,86 mmol = 86%) de 1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol (**I-1**). El producto se identificó como esencialmente puro por TLC y RMN: R_f 0,26 (3:1, hexano/acetato de etilo); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,45 (t, J = 6,64 Hz, 3H), 4,38 (q, J = 7,24 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 5,5, 1H), 7,27-7,29 (m, 4H), 7,31 (t, J = 1,7 Hz, 1H), 7,36 (dd, J = 1,9, 8,6 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 7,2 Hz, 1H); ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 13,8, 37,8, 53,4, 108,7, 108,9, 117,8, 119,5, 120,7, 122,0, 122,9, 123,1, 126,6, 127,0, 128,3, 128,5, 128,7, 128,9, 133,0, 138,0, 139,7, 140,6. LRGC-MS m/z (% rel): $[\text{M}]^+ 338$ (37), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+ 310$ (55), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}]^+ 295$ (100), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2]^+ 281$ (34), $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3]^+ 179$ (34).

Etapa 2: Síntesis del 1-(9-Etil-9H-carbazol-3-il)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol (I-1). A un matraz de fondo redondo de 3 mL que contenía fenilacetileno 0,11 g (1,1 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió gota a gota una solución de bromuro de etilmagnesio (EtMgBr) en THF 1,1 mL (1,1 mmol) a temperatura ambiente. Después de añadir el bromuro de etilmagnesio, la mezcla se calentó a 50 °C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de 0,24 g (1,0 mmol) de azida 2 en THF (1,0 M) y se calentó la mezcla a 50 °C durante 1 hora. Tras el enfriamiento con una solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) al 10%, los productos se extrajeron con acetato de etilo (3X). La capa orgánica se lavó con 10 mL de salmuera, se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un rotavapor para obtener el material bruto (0,1104 g). El aceite crudo se purificó por medio de cromatografía en gel de sílice para obtener 0,29 g (0,86 mmol = 86%) de 1-(9-etil-9H-carbazol-

3-*il*)-5-fenil-1H-1,2,3-triazol (**I-1**). El producto se identificó como esencialmente puro por TLC y RMN: R_f 0,26 (3:1, hexano/acetato de etilo); RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,45 (t, J = 6,64 Hz, 3H), 4,38 (q, J = 7,24 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 5,5, 1H), 7,27 a 7,29 (m, 4H), 7,31 (t, J = 1,7 Hz, 1H), 7,36 (dd, J = 1,9, 8,6 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 7,2 Hz, 1H); ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 13,8, 37,8, 53,4, 108,7, 108,9, 117,8, 119,5, 120,7, 122,0, 122,9, 123,1, 126,6, 127,0, 128,3, 128,5, 128,7, 128,9, 133,0, 138,0, 139,7, 140,6. LRGC-MS m/z (% rel): $[\text{M}]^+$ 338 (37), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ 310 (55), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}]^+$ 295 (100), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_2]^+$ 281 (34), $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3]^+$ 179 (34).

Cultivo de células

MDA-MB-231, MCF-7 (ATCC), variante metastásica ósea marcada con proteína verde fluorescente (GFP) de MDA-MB-435 (GFP-HER2-BM) (caracterizada en (25), del Dr. Danny Welch, Centro de Cáncer de la Universidad de Kansas), y células epiteliales mamarias MCF10A (ATCC) se cultivaron y mantuvieron como se describió previamente (16). Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 se obtuvieron en 2000, la línea celular MCF-10A se adquirió en 2013, y la línea celular GFP-HER2-BM fue un regalo del Dr. Danny Welch en 2008. Las líneas celulares fueron autenticadas por el ATCC en 2015.

Ensayos de activación de Rac y Cdc42

Para las curvas de IC_{50} : La activación de Rac1/2/3 y Cdc42 se determinó como se describe (16), mediante el uso de un kit G-LISA (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO). Se prepararon lisados de células MDA-MB-231 de 24 hs de tratamiento con MBQ-167 por medio de la combinación de poblaciones de células adheridas y desprendidas ($N=3$). Se ajustaron curvas de IC_{50} de cuatro parámetros dosis-respuesta mediante el uso de la función de regresión no lineal de GraphPad Prism®.

Además, se determinó la activación de Rac, Cdc42 o Rac, por medio de ensayos desplegables mediante el uso del dominio de unión a P21 (PBD) de PAK, o el dominio de unión a Rho de Rhotekin, como se describe en (2, 16). El GTP unido a Rac, Cdc42 o Rho activos se detectó por Western blot ($N=3$).

Análisis de Western blot

Los lisados celulares totales o los ensayos desplegables se sometieron a Western blot mediante el uso de procedimientos de rutina. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Rac (Rac1,2,3), Cdc42, Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, PAK1, PAK2, fosfo (p) -PAK1(T423)/PAK2(T402), p-PAK1(S199/204)/PAK2(S192/197), p-PAK1(S144/204)/PAK2(S141), LIM quinasa (LIMK1), p-LIMK1/2(Tyr507/Thr508), Cofilin, p-cofilin(S3), STAT3, p-STAT3(Y705), p-P-38 MAPK (T180/Y182), p-ERK (T202/Y204), p-Akt (S473), y Akt (Cell Signaling Technology, Inc.) y β -actina (Sigma).

Microscopía de fluorescencia

Las células MDA-MB-231 se trataron con vehículo o MBQ-167 a 250 o 500 nM durante 24 hs. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con rodamina faloidina para visualizar la F-actina, y con p-tirosina o vinculina para visualizar las adhesiones focales, como se describe en (2). Las micrografías de fluorescencia se adquirieron a 600X en un microscopio de fluorescencia Olympus BX40 mediante el uso de una cámara digital Spot.

Ensayos de migración celular

Ensayo Transwell:

Como se describe en (2), las células MDA-MB-231 quiescentes se trataron con vehículo o MBQ-167 (250 nM) durante 24 hs. Se separaron las poblaciones adheridas y desprendidas y se colocaron exactamente 2×10^5 células en el pozo superior de las cámaras Transwell con 5% de FBS en el pozo inferior. Se cuantificó el número de células que migraron a la parte inferior de la membrana tras una incubación de 7 hs, después de teñir las células fijadas con yoduro de propidio (PI). Para cada tratamiento ($N=3$), se cuantificaron las células en 20 campos microscópicos.

Ensayo de cicatrización de heridas por raspado:

Las células MDA-MB-231 colocadas en placas de 6 pocillos a igual densidad celular se incubaron en FBS al 10% hasta que conflúan. Se cambió el medio a un 2% de FBS y se hizo un solo rasguño en el centro del cultivo en monocapa con una punta de pipeta. Se añadió MBQ-167 a 0, 250 o 500 nM inmediatamente después de la herida. Las imágenes se adquirieron digitalmente en un microscopio Olympus (con un aumento de 4X) a las 0, 8, 12 y 24 horas y se cuantificó la distancia del araño en Adobe Photoshop. $N=3$ réplicas biológicas (con 2 réplicas técnicas cada una).

Ensayo de formación de mamíferos

Como se ha descrito (26), se sembraron números iguales de células MDA-MB-231 tratadas con vehículo o MBQ-167 en placas de fijación ultrabaja (Corning) a una densidad de 500 células/pocillo en medio basal de epitelio mamario sin suero (Lonza). Se contaron las mamoesferas después de 4 días de incubación en 0 o 250 nM de MBQ-167 a 37 °C, 5% de CO_2 . La eficiencia de formación de mamoesferas se calculó como el número de mamoesferas dividido por

el número de células sembradas por pocillo y se expresó en relación con los controles del vehículo.

Ensayos de viabilidad celular

Como se describe en (16), se incubaron números iguales de células MDA-MB-231, GFP-HER2-BM o MCF-10A en 0-1 μ M MBQ-167 durante 120 hs. Se utilizó el ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® (Promega, Fitchburg, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo permite cuantificar la viabilidad de las células adheridas y desprendidas en el mismo pozo. El IG_{50} se determinó como $100 \times (T - T_0) / (C - T_0) = 50$ (T = la densidad óptica del tratamiento con el fármaco después de 120 hs, T_0 = la densidad óptica a tiempo cero, y C = la densidad óptica de las células no tratadas). Las curvas se ajustaron mediante el uso de los modelos de regresión logística no lineal de cuatro parámetros en el software GraphPad Prism.

Progresión del ciclo celular

Las células MDA-MB-231 se incubaron con 0 o 250 nM de MBQ-167 durante 48 hs y todas las células (desprendidas y adheridas) se tiñeron con PI, como en (27). La fase del ciclo celular se analizó mediante el uso de un citómetro de flujo de cuatro colores (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA). Se analizó un total de 20.000 eventos para cada muestra. Los archivos en modo lista se recolectaron con el software Cell Quest 3.3 y se analizaron con el software Flow Jo vX.0,7 (BD Biosciences, San Jose, CA).

Ensayo de apoptosis

La apoptosis se midió mediante el uso de un kit de ensayo de luminiscencia Caspase-Glo3/7 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Corp., Madison, WI, USA). Tras el tratamiento de igual número de células con vehículo o MBQ-167 durante 24 hs, se añadió el reactivo Caspase-3/7 Glo y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. La actividad de la caspasa-3/7 se determinó por medio de la cuantificación de la luminiscencia.

Tinción de anexina V

Las células apoptóticas se detectaron por medio de microscopía de fluorescencia de células teñidas con Anexina V-Cy3-18 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Brevemente, las células GFP-MDA-MB-231 cultivadas en cubreobjetos se trataron con vehículo, o 250 o 500 nM de MBQ-167 durante 6 hs y teñidas con Anexina V-Cy3-18 en tampón de unión (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,5, 0,14 M NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$) durante 15 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron en tampón de unión y se fijaron con paraformaldehído al 3,7% antes de la microscopía de fluorescencia. Las imágenes se adquirieron digitalmente en un microscopio de fluorescencia invertido Olympus.

Protocolo de animales

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo bajo el protocolo aprobado #A8180112 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, de acuerdo con la *Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*. Los ratones hembra nu/nu y los ratones con inmunodeficiencia combinada grave Crl:SHO-Prkdc SCID Hairless de 4 a 5 semanas de edad (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en jaulas con filtro HEPA.

Establecimiento del tumor

Se inyectaron células GFP-HER2-BM ($\sim 5 \times 10^5$) o células GFP-MDA-MB-231 (1×10^5) en Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) en la cuarta almohadilla de grasa mamaria derecha bajo inhalación de isoflurano (1 a 3% en oxígeno mediante el uso de una cámara de inhalación a 2L/min) para producir tumores primarios ortotópicos. Tras el establecimiento del tumor (1 semana después de la inoculación), los animales se dividieron aleatoriamente en grupos de tratamiento ($n=6$).

Administración del MBQ-167

Los ratones se trataron con el vehículo (12,5% de etanol, 12,5% de Cremophor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 75% de PBS 1X pH 7,4), o 1 o 10 mg/kg BW de MBQ-167 por inyección i.p. en un volumen de 100 μ L 3 veces a la semana. Los tratamientos continuaron hasta el sacrificio en el día 65.

Análisis de imágenes de fluorescencia de todo el cuerpo

El crecimiento del tumor mamario se cuantificó como cambios en la densidad integrada de la fluorescencia GFP, como en (28). Se tomaron imágenes de los ratones el día 1 de la administración del tratamiento y, posteriormente, una vez a la semana durante 65 días, mediante el uso del sistema de imágenes *in vivo* para animales pequeños FluorVivo (INDEC Systems, Inc., Santa Clara, CA). Las intensidades de fluorescencia del tumor se analizaron con el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El crecimiento tumoral relativo se calculó como la densidad integrada de fluorescencia de cada tumor en cada día de obtención de imágenes en relación con la densidad integrada de fluorescencia del mismo tumor en el día 1 de tratamiento, como se describe en (17). Como en (29), el crecimiento óptimo del tumor se calculó como $\%T/C = (\delta T / \delta C) \times 100$ cuando $\delta T > 0$, δT = tamaño promedio del

tumor en el día 65 de los ratones tratados- tamaño promedio del tumor en el día 01 de los ratones tratados. δC = tamaño promedio del tumor en el día 65 de los ratones de control- tamaño promedio del tumor en el día 01 de los ratones de control. El retraso en el crecimiento del tumor se calculó como el porcentaje en el que el tamaño del tumor del grupo tratado se retrasa en alcanzar un número específico de duplicaciones (desde el día 1) en comparación con los controles mediante el uso de: $[(T-C)/C] \times 100$, en el que T y C son los tiempos medios en días para que los grupos tratados y de control dupliquen el tamaño del tumor.

Análisis de las metástasis

Tras el sacrificio, se extirparon los pulmones, riñones, hígados, huesos y bazo y se almacenaron inmediatamente en N_2 líquido. Los órganos almacenados se descongelaron y se analizaron por medio de microscopía de fluorescencia, como se describió.

Pruebas de enzimas hepáticas

Los hígados almacenados congelados se descongelaron y homogeneizaron para medir las actividades de la fosfatasa alcalina (ALP) y la alanina transaminasa (ALT) mediante el uso de kits de ensayo colorimétrico de Abcam y Cayman Chemicals respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos utilizaron Microsoft Excel y GraphPad Prism, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P \leq 0,05$.

Tabla 1A

Los compuestos que no están comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son sólo a título ilustrativo.

TABLA I

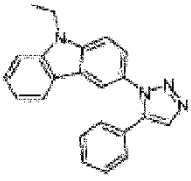
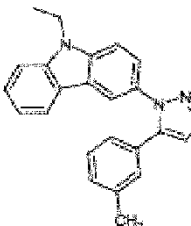
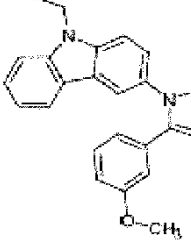
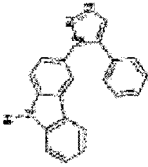
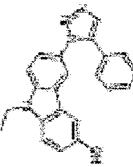
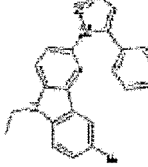
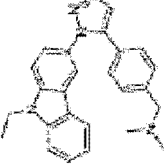
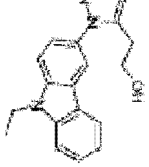
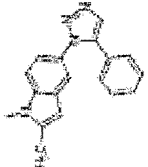
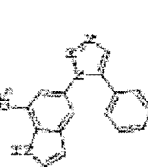
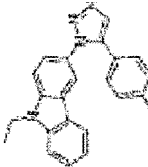
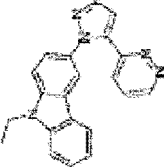
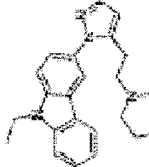
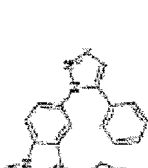
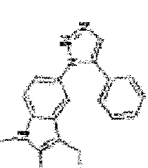
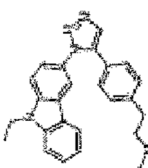
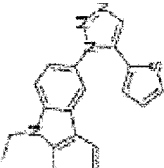
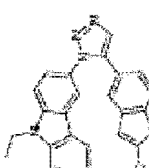
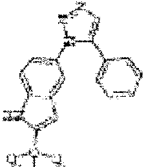
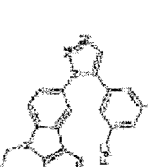
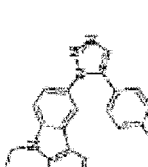
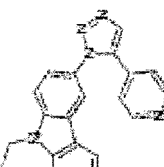
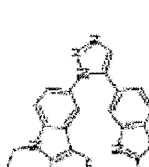
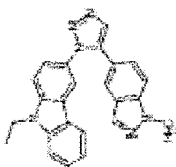
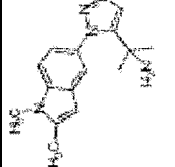
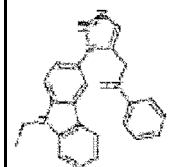
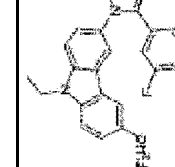
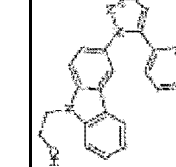
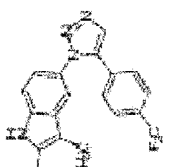
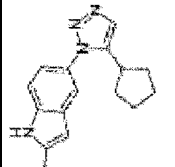
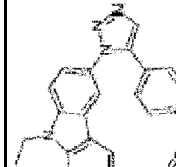
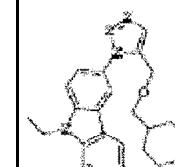
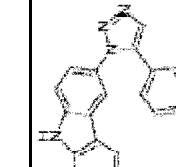
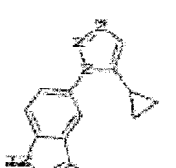
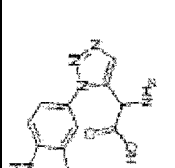
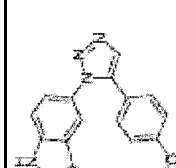
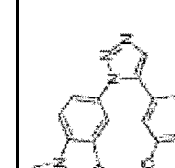
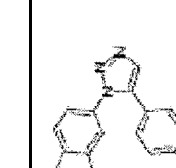
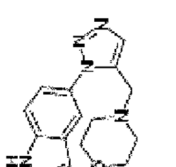
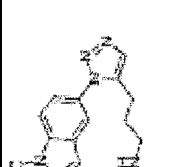
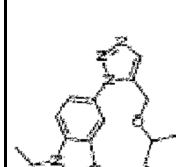
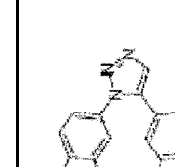
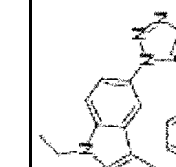
Comp. #	Estructura	Actividad de Rac	Actividad de Cdc42	RMN de ^1H	Nombre
I-1		A	A	(CDCl ₃) δ 1,43 (t, J = 7,26 Hz, 3H), 4,37 (q, J = 7,24 Hz, 2H), 7,14 (dd, J = 2,17, 8,63 Hz, 1H), 7,24 (t, J = 7,13 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,54 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,24 Hz, 1H), 7,49 (t, J = 8,17 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 2,19 Hz, 1H), 8,07 (d, J = 7,80 Hz, 1H)	9-etil-3-(5-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-2				(CDCl ₃) δ 1,45 (t, J = 7,24 Hz, 3H), 4,38 (q, J = 7,24 Hz, 2H), 6,99 (dd, J = 1,4, 8,76, 1H), 7,12 a 7,17 (m, 3H), 7,24 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 2,0, 8,6 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,91 (s, 1H), 8,01 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 1,9 Hz, 1H)	9-etil-3-(5-(4-metolil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-3				(CDCl ₃) δ 1,45 (t, J = 7,20 Hz, 3H), 3,63 (s, 3H), 4,39 (q, J = 7,20 Hz, 2H), 6,81 (dd, J = 1,4, 4,5, 1H), 6,85 (dd, J = 2,5, 9,5 Hz, 1H), 7,19 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,36 (dd, J = 2,0, 8,6 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,52 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,20 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,16 (d, J = 1,9 Hz, 1H);	9-etil-3-5-3-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
A: >50% de inhibición a 250nM; B: >50% de inhibición a 1 μ M; C >50% de inhibición a 5 μ M; D <50% de inhibición a 5 μ M.					

TABLA I (cont.)

				
I-4	I-8	I-12	I-16	I-20
				
I-5	I-9	I-13	I-17	I-21
				
I-6	I-10	I-14	I-18	I-22
				
I-7	I-11	I-15	I-19	I-23

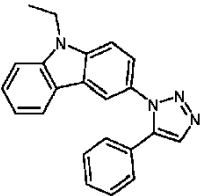
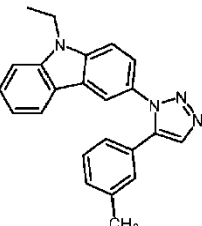
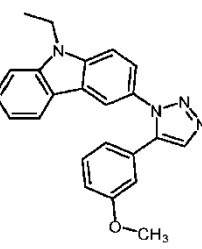
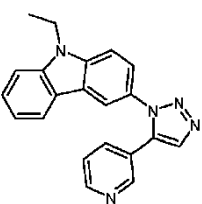
(continuación)

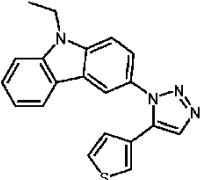
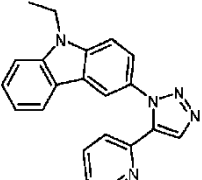
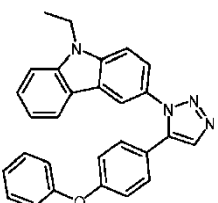
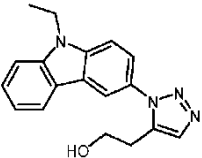
				
I-24	I-28	I-32	I-36	I-40
				
I-25	I-29	I-33	I-37	I-41
				
I-26	I-30	I-34	I-38	I-42
				
I-27	I-31	I-35	I-39	I-43

(continuación)

I-44		I-45		I-46		I-47	
I-48		I-49		I-50		I-51	

Tabla 1B

Comp. #	Estructura	G150 (μ M) MDA-MB-231	Inhibición de la migración (%) MDA-MB-231	RMN de ^1H y RMN de ^{13}C	Nombre
I-1		0,128	37,2 (0,25 μ M)	RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,43 (t, $J = 7,3$, 3H), 4,37 (q, $J = 7,2$, 2H), 7,14 (dd, $J = 2,17$, 8,63, 1H), 7,24 (t, $J = 7,13$, 1H), 7,37 (d, $J = 8,64$, 1H), 7,41 (d, $J = 8,24$, 1H), 7,49 (t, $J = 8,17$, 1H), 7,75 (d, $J = 2,19$, 1H), 8,07 (d, $J = 7,80$, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 13,8, 37,8, 108,7, 108,9, 117,8, 119,5, 120,8, 122,5, 123,0, 123,2, 126,6, 127,1, 128,3, 128,5, 128,8, 128,0, 133,0, 138,0, 139,8, 140,7.	9-etil-3-(5-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-2		1,332	≤ 1 (1 μ M)	RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,45 (t, $J = 7,24$, 3H), 4,38 (q, $J = 7,24$, 2H), 6,99 (dd, $J = 1,4$, 8,76, 1H), 7,12 a 7,17 (m, 3H), 7,24 (t, $J = 7,0$, 1H), 7,34 (dd, $J = 2,0$, 8,6, 1H), 7,39 (d, $J = 8,6$, 1H), 7,45 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,51 (t, $J = 7,2$, 1H), 7,91 (s, 1H), 8,01 (d, $J = 7,8$, 1H), 8,17 (d, $J = 1,9$, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 14,0, 21,6, 38,1, 108,9, 109,2, 118,1, 119,8, 121,1, 122,8, 123,3, 123,4, 125,9, 126,9, 127,2, 128,7, 128,9, 129,5, 130,0, 133,3, 138,4, 138,8, 140,0, 140,9.	9-etil-3-(5-(m-tolil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-3		0,248	≤ 1 (1 μ M)	RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,45 (t, $J = 7,2$, 3H), 3,63 (s, 3H), 4,39 (q, $J = 7,2$, 2H), 6,81 (dd, $J = 1,4$, 4,5, 1H), 6,85 (dd, $J = 2,5$, 9,5, 1H), 7,19 (t, $J = 8,0$, 1H), 7,36 (dd, $J = 2,0$, 8,6, 1H), 7,41 (d, $J = 8,6$, 1H), 7,45 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,52 (t, $J = 7,2$, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 7,8$, 1H), 8,16 (d, $J = 1,9$, 1H); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 13,8, 37,9, 55,4, 109,0, 109,1, 110,9, 113,3, 114,4, 118,3, 118,6, 119,1, 119,6, 120,8, 122,6, 123,4, 126,7, 129,5, 129,9, 131,9, 139,6, 140,9, 148,1, 160,1.	9-etil-3-(5-(3-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-4		>50	65,1 (10 μ M)	RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 1,47 (t, 3H, $J = 7,2$), 4,39 (q, $J = 7,14$, 2H), 7,2158 (d, 1H, $J = 3,0$), 7,26 (t, 1H, $J = 7,4$), 7,34 (d, $J = 1,8$, 1H), 7,36 (d, 1H, $J = 1,8$), 7,42 (s, 1H), 7,45 (d, 1H, $J = 4,4$), 7,52 (t, 1H, $J = 7,3$), 8,01 (d, 1H, $J = 6,0$), 8,12 (s, 1H), 8,56 (d, $J = 4,6$, 1H), 8,62 (s, 1H). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 13,7, 37,8, 108,9, 117,8, 119,6, 120,7, 122,2, 122,4, 122,2, 123,2, 123,4, 123,4, 126,7, 149,9.	9-etil-3-(5-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol

Comp. #	Estructura	G150 (μM) MDA-MB-231	Inhibición de la migración (%) MDA-MB-231	RMN de ¹ H y RMN de ¹³ C	Nombre
I-5		0,408	2,4 (1 μM)	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,50 (t, 3H, J = 7,2), 4,43 (q, 2H, J = 7,239), 6,97 (d, J = 5,0, 1H), 7,09 (d, J = 2,84, 1H), 7,2720 (t, J = 3,0, 1H), 7,45 (d, J = 1,9, 1H), 7,48 (d, 1H, J = 6,137), 7,53 (d, 1H, J = 7,2), 7,95 (s, 1H), 8,04 (d, 1H, J = 7,8), 8,16 (s, 1H); RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ 13,8, 37,9, 108,9, 108,9, 118,3, 119,7, 120,8, 122,5, 123,2, 123,3, 124,3, 126,5, 126,7, 126,9, 127,0, 128,2, 132,3, 134,1, 140,0, 140,7.	9-etil-3-(5-(tiofen-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-6		>50	28 (10 μM)	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,48 (t, 3H, J = 7,1), 4,43 (q, 2H, J = 7,3), 7,29 (t, 1H, J = 13,5), 7,47 (d, 1H, J = 8,1), 7,53 (t, 1H, J = 7,8), 7,83 (t, 1H, J = 7,8), 7,87 (d, 1H, J = 2,11), 7,89 (d, 1H, J = 2,1), 8,13 (d, 1H, J = 7,36), 8,29 (d, 1H, J = 7,2), 8,49 (s, 1H), 8,64 (d, 1H, J = 4,1), 8,68 (s, 1H); RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ 13,8, 37,9, 108,9, 109,1, 113,2, 118,8, 119,6, 120,4, 120,7, 120,8, 122,6, 122,9, 123,4, 126,7, 129,4, 136,9, 139,7, 140,8, 148,8, 149,5, 150,3.	9-etil-3-(5-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-7		>50	30,8 (10 μM)	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,48 (t, 3H, J = 7,3), 4,41 (q, 2H, J = 5,652), 6,8907 (d, 1H, J = 7,9), 7,9872 (d, 1H, J = 3,0), 7,00 (d, 1H, J = 4,2), 7,09 (t, 1H, J = 8,3), 7,21 (d, 1H, J = 8,6), 7,26 (t, 1H, J = 9,7), 7,32 (t, 1H, J = 7,7), 7,41 (d, 1H, J = 6,4), 7,46 (d, 1H, J = 9,7), 7,53 (t, 1H, J = 6,5), 7,90 (s, 1H), 8,04 (d, 1H, J = 4,3), 8,13 (s, 1H); RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ 13,9, 37,9, 108,8, 108,9, 117,3, 117,918, 118,405, 119,604, 120,239, 120,8, 121,5, 122,5, 123,1, 123,2, 124,1, 124,7, 126,7, 128,3, 129,9, 130,0, 130,1, 132,4, 132,8, 138,1, 139,8, 140,7.	9-etil-3-[5-(4-fenoxi-fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-9H-carbazol
I-8		>50	n/a	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,46 (t, J = 7,6, 3H), 2,96 (t, J = 6,3, 2H), 3,85 (t, J = 6,3, 2H), 4,41 (q, J = 7,6, 2H), 7,25 (dd, J = 7,6, 1H), 7,44-7,55 (m, 4H), 7,71 (s, 1H), 8,04 (d, J = 7,6, 1H), 8,14 (t, J = 1,4, 1H).	2-(1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-1H-1,2,3-triazol-5-il)etan-1-ol

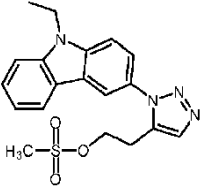
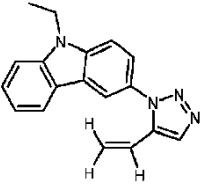
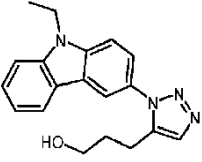
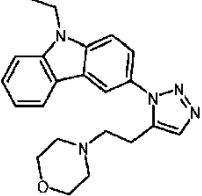
Comp. #	Estructura	G150 (μM) MDA-MB-231	Inhibición de la migración (%) MDA-MB-231	RMN de ¹ H y RMN de ¹³ C	Nombre
I-9		n/a	n/a	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,49 (t, J = 7,2, 3H), 2,95 (s, 3H), 3,20 (t, J = 6,4, 2H), 4,38 (t, J = 6,4, 2H), 4,45 (q, J = 7,2, 2H), 7,30 (dd, J = 7,2, 1H), 7,43 a 7,58 (m, 4H), 7,77 (s, 1H), 8,10 (d, J = 8,0, 1H), 8,13 (t, J = 1,6, 1H),	2-(1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-1H-1,2,3-triazol-5-il)etil metanosulfonato
I-10		n/a	n/a	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,48 (t, J = 7,2, 3H), 2,95 (s, 3H), 3,20 (t, J = 6,4, 2H), 4,43 (t, J = 6,4, 2H), 4,45 (q, J = 7,2, 2H), 5,47 (d, J = 11,4, 1H), 5,84 (d, J = 17,6, 1H), 6,52 (dd, J = 17,6 y 11,4 H, 1H), 7,29 (dd, J = 7,2, 1H), 7,47 a 7,57 (m, 4H), 7,95 (s, 1H), 8,10 (d, J = 7,8, 1H), 8,18 (t, J = 1,6, 1H),	9-etil-3-(5-vinil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-9H-carbazol
I-11		n/a	n/a	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,40 (t, J = 7,2, 3H), 1,80 (q, J = 7,6, 2H), 2,75 (t, J = 7,8, 2H), 3,78 (t, J = 6,2, 2H), 4,32 (q, J = 7,2, 2H), 7,23 (dd, J = 7,6, 1H), 7,44 a 7,55 (m, 4H), 7,60 (s, 1H), 8,03 (d, J = 7,6, 1H), 8,13 (s, 1H),	4-(2-(1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-1H-1,2,3-triazol-5-il)etil)morfolino
I-12		n/a	n/a	RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ 1,49 (t, J = 7,6, 3H), 2,39 (m, 4H), 2,60 (t, J = 7,6, 2H), 2,88 (t, J = 7,6, 2H), 3,66 (m, 4H), 4,45 (q, J = 7,6, 2H), 7,29 (dd, J = 7,6, 1H), 7,47 a 7,58 (m, 4H), 7,71 (s, 1H), 8,11 (d, J = 7,6, 1H), 8,15 (d, J = 1,4, 1H).	4-(2-(1-(9-etil-9H-carbazol-3-il)-1H-1,2,3-triazol-5-il)etil)morfolino

Tabla 2. Efecto de MBQ-167 sobre la actividad de Rho GTPasa (Rho GTPasa activa/Total de Rho GTPasa) tras 24 hs en células MDA-MB-231, en relación con el vehículo (=1)

Rho GTPasa	Células unidas	Células separadas
Rac	0,74*	0,23*
Cdc42	0,39*	0,22*
Rho	0,9	0,85
*p<0,05		

- 5 Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se trataron durante 24 hs con 250 nM de MBQ-167. Se recuperaron las poblaciones de células adheridas y desprendidas y se sometieron cantidades iguales de proteínas a ensayos desplegables mediante el uso del dominio de unión a p21 de PAK para aislar el Rac y Cdc42 unido a GTP, o el dominio de unión a Rho de Rhotekin para aislar el Rho activo. Los lisados celulares se sometieron a western blot con anticuerpos contra Rac, Cdc42 o Rho. Los resultados de las bandas positivas en los western blots se
- 10 cuantificaron mediante el uso de image J. La densidad integrada para la Rho GTPasa activa (Rac, Cdc42, Rho.GTP) se dividió por la Rho GTPasa total (Rac, Cdc42, Rho) de los mismos lisados celulares. La actividad de Rac, Cdc42 o

Rho para cada tratamiento con MBQ-167 se dividió por los controles del vehículo para cada experimento para obtener la actividad relativa de Rho GTPasa.

Tabla 3. Efecto de MBQ-167 sobre la actividad Rac (Rac activa/Rac total) tras 24 hs en células MCF-7

MBQ-167 nM	Actividad de Rac
0	1,0
250	1,075±0,3

- 5 Las células de cáncer de mama humano MCF-7 se trataron durante 24 hs con 250 nM de MBQ-167. Se lisaron las células y se sometieron cantidades iguales de proteínas a ensayos desplegables mediante el uso del dominio de unión a p21 de PAK para aislar el Rac unido a GTP. Los lisados celulares se sometieron a western blot con anticuerpos contra Rac, Cdc42 o Rho. Los resultados de las bandas positivas en los western blots se cuantificaron mediante el uso de image J. La densidad integrada para el Rac activo (Rac.GTP) se dividió por el Rac total de los mismos lisados celulares (N=2).

Tabla 4: Porcentaje óptimo de tratamiento (T)/control (C) para el crecimiento del tumor de la almohadilla de grasa mamaria en ratones desnudos tratados con MBQ-167.

Tratamiento mg/kg BW	Porcentaje óptimo de Cambio en el Tamaño del Tumor
0	100
1	58
10	9

- 15 Adaptado de (Alley *et al.*, Capítulo 7, *Human tumor xenograft models in NCI drug development*, de *Anticancer drug development guide* BA Teicher and PA Andrews, Eds, 2004, Humana Press, Inc., NJ), el % de cambio para los tumores de los ratones que recibieron el tratamiento con MBQ-167 se calculó como $\%T/C = (\text{delta } T/\text{delta } C) \times 100$ cuando $\text{delta } T > 0$

- 20 Delta T=tamaño promedio del tumor en el día 65 de los ratones tratados- tamaño promedio del tumor en el día 01 de los ratones tratados. Delta C= tamaño promedio del tumor en el día 65 de los ratones de control- tamaño promedio del tumor en el día 01 de los ratones de control.

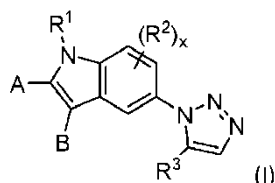
Tabla 5: Retraso del crecimiento del tumor en los ratones tratados con MBQ-167

Tratamiento mg/kg BW	Tiempo en Días para Duplicar el Tamaño del Tumor			
	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴
0	8	14,5	27,7	33,3
1	10	30	57	-
10	11	30	-	-

- 25 Adaptado de (Alley *et al.*, Capítulo 7, *Human tumor xenograft models in NCI drug development*, de *Anticancer drug development guide* BA Teicher and PA Andrews, Eds, 2004, Humana Press, Inc., NJ), el retraso en el crecimiento del tumor se calculó como el porcentaje en el que el tamaño del tumor del grupo tratado se retrasa en alcanzar un número específico de duplicaciones (desde el día 1) en comparación con los controles mediante el uso de: $[(T-C)/C] \times 100$, donde T y C son los tiempos medios en días para que los grupos tratados y de control alcancen una duplicación del tamaño del tumor.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I),



en el que A y B, junto con el anillo al que están unidos, forman un arilo C₆-C₁₀ en el que cada átomo de hidrógeno del arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -CN, -OR⁴, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F;

R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵;

cada R² es independientemente deuterio, halógeno, -OH, -CN, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo C₆-C₁₀, -OR⁶, -C(O)OR⁶, -C(O)NR⁶R⁷, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆); en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆ y arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -CN, -OR⁶, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros;

R³ es independientemente deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F;

cada R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ es independientemente H, deuterio, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), heteroarilo, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F, en el que cada hidrógeno en arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o -CH₂CN; y

x es 0, 1, 2 o 3;

o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

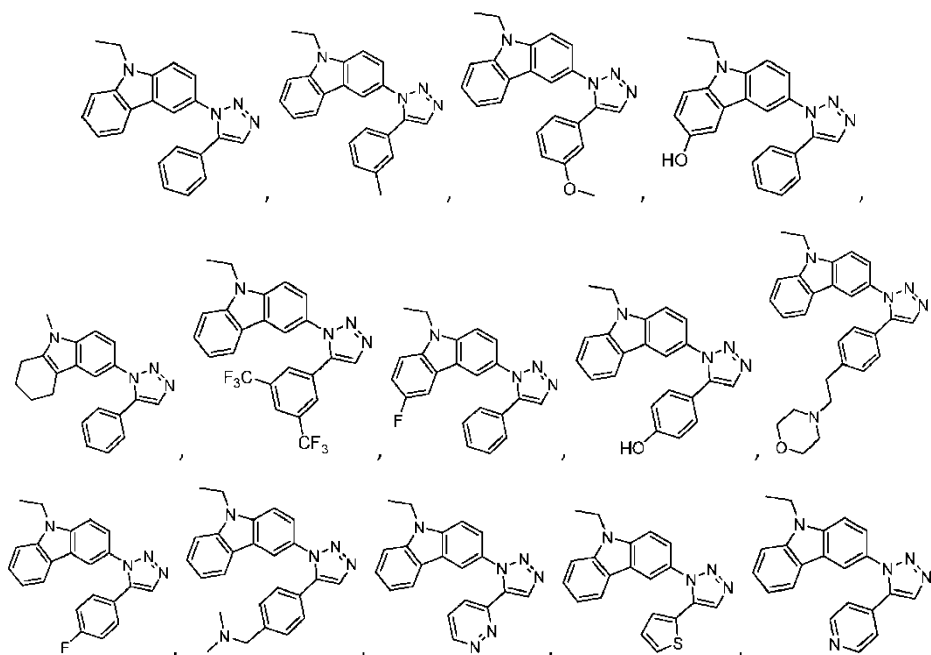
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros está independientemente sustituido

opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)Nhalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Nhalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), o heteroarilo monocíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, -OR⁸, -Oalquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

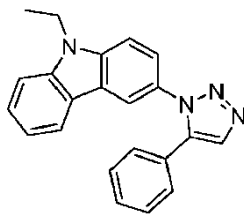
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en





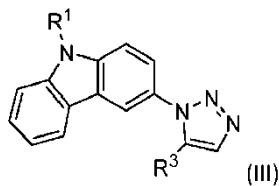
o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es de la fórmula



o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

10 7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la fórmula (III),



en la que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo

C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, o heteroarilo monocíclico o bicíclico está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵;

R³ es independientemente deuterio, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂-N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆-(heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros), -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F; y

cada R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ es independientemente H, deuterio, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, heterocicloalquilo C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heteroarilo, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -CF₃, -CHF₂, o -CH₂F, en el que cada hidrógeno en arilo C₆-C₁₀ está opcionalmente sustituido por cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, o -CH₂CN; o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente por deuterio, halógeno, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, o -OR⁵, o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

9. El compuesto de la reivindicación 7, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀-(arilo C₆-C₁₀), alquilo C₁-C₆-(NHR⁸), alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), alquilo C₁-C₆-(NR⁸R⁹), o heteroarilo mono o bicíclico; en el que cada átomo de hidrógeno en el alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico o bicíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heterocicloalquilo, -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

10. El compuesto de la reivindicación 7, en el que R³ es alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀, alquilo C₁-C₆-(OR⁸), arilo C₆-C₁₀-(OR⁸), o heteroarilo monocíclico; en los que cada átomo de hidrógeno de alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, arilo C₆-C₁₀ o heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido por deuterio, halógeno, -OH, oxo, -OR⁸, -NHR⁸, -CN, -Oalquilo C₁-C₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁-C₆), -NH(arilo C₆-C₁₀), -NH(arilo C₆-C₁₀)-N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)alquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)alquilo C₁-C₆, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)NHalquilo C₁-C₆, -NHC(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHC(O)Oalquilo C₁-C₆, -N(alquilo C₁-C₆)C(O)Oalquilo C₁-C₆, -NHS(O)(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)NH₂, -NHS(O)₂NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH₂, -NHS(O)NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -NHS(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -NHS(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -N(alquilo C₁-C₆)S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -N(alquilo C₁-C₆)S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₆, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -

C(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -Salquilo C₁-C₆, -S(O)alquilo C₁-C₆, -S(O)₂alquilo C₁-C₆, -S(O)NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)₂NH(alquilo C₁-C₆), -S(O)N(alquilo C₁-C₆)₂, -S(O)₂N(alquilo C₁-C₆)₂, -P(alquilo C₁-C₆)₂, -P(O)(alquilo C₁-C₆)₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, -cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, alquilo C₁-C₆ de 3 a 7 miembros heterocicloalquilo, -CF₃, -CHF₂ o -CH₂F, o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

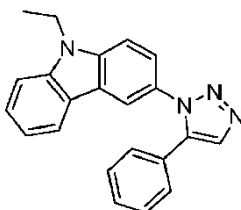
11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente, en el que una cantidad eficaz de dicho compuesto se debe administrar al paciente que lo necesita, en el que la enfermedad es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer gástrico y cáncer neuronal.

12. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que

(a) el compuesto inhibe la migración de las células cancerosas, induce la detención del ciclo celular de una célula enferma, induce la apoptosis de una célula enferma, reduce la expresión de una proteína Bcl-2, inhibe la formación de la mamografía, o una combinación de las mismas; o

(b) la cantidad efectiva del compuesto está en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente.

13. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto es de la fórmula



o una sal aceptable para uso farmacéutico del mismo.

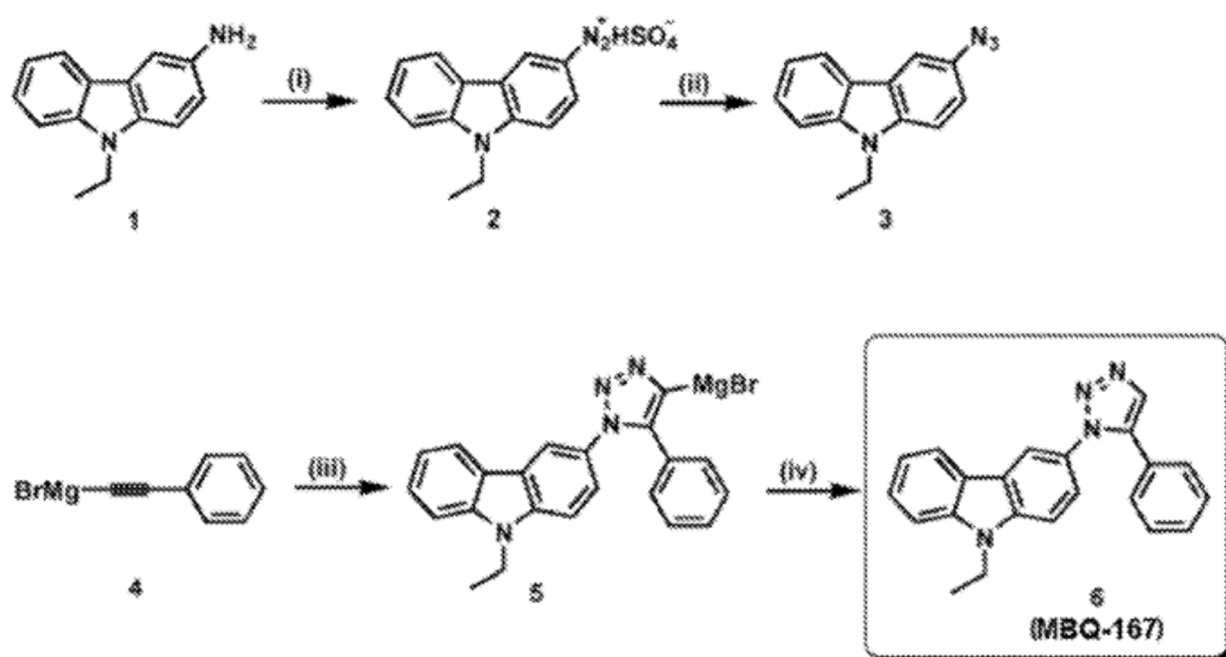


FIG. 1

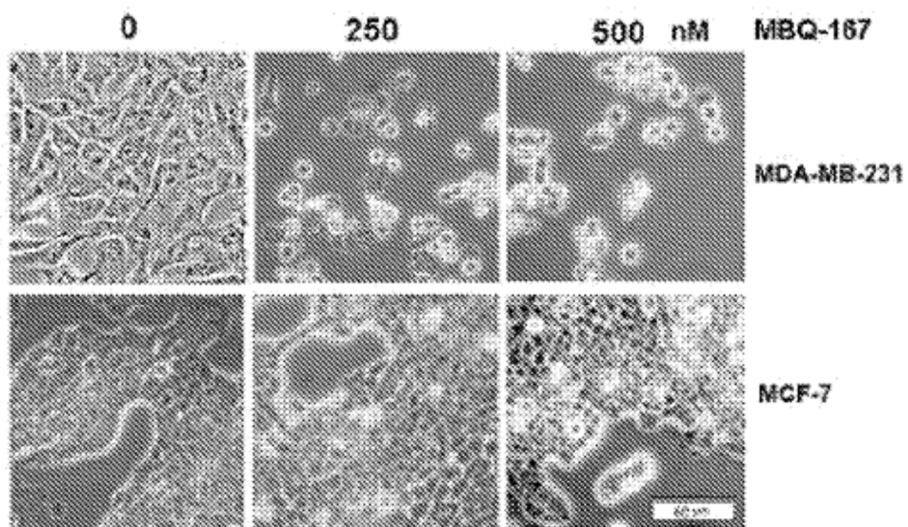


FIG. 2A

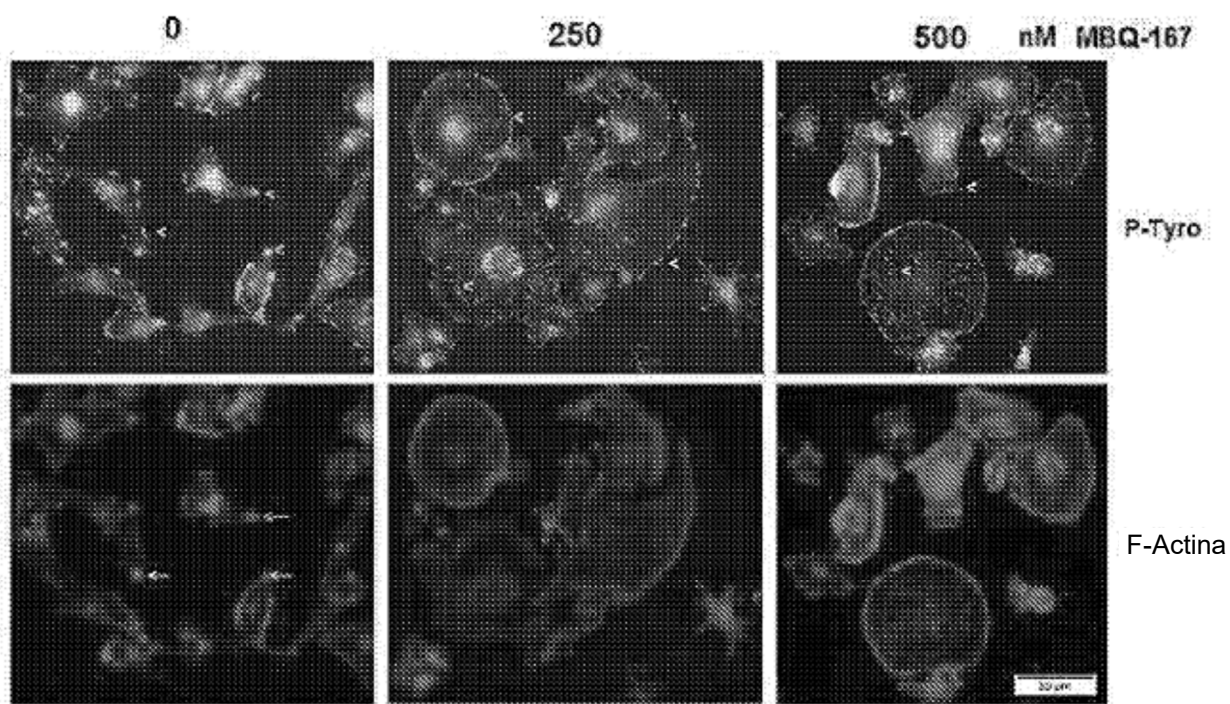


FIG. 2B

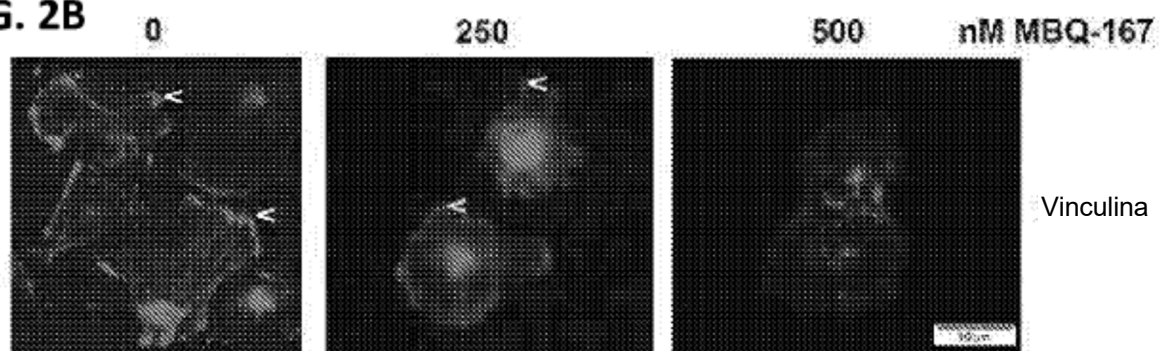


FIG. 2C

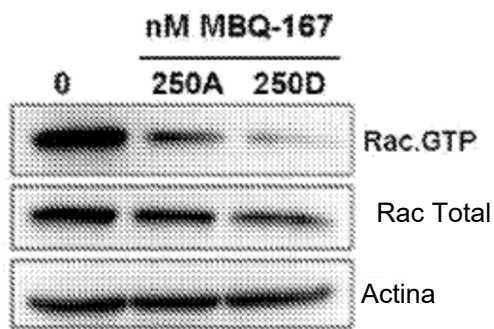


FIG. 3A-1

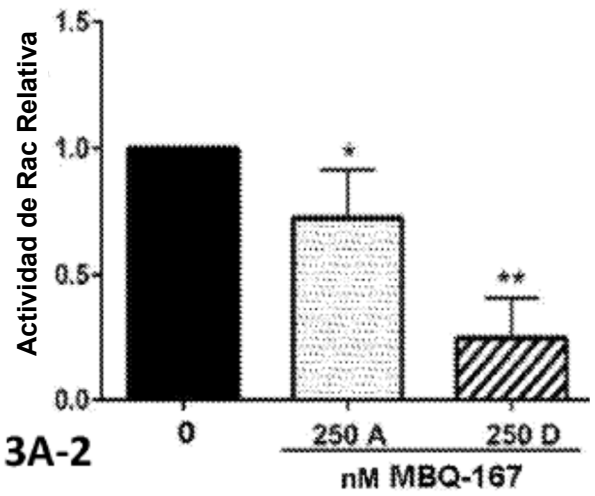


FIG. 3A-2

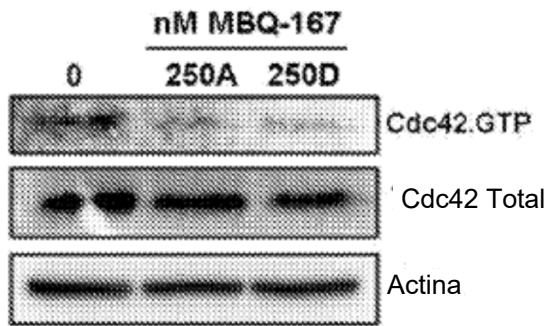


FIG. 3B-1

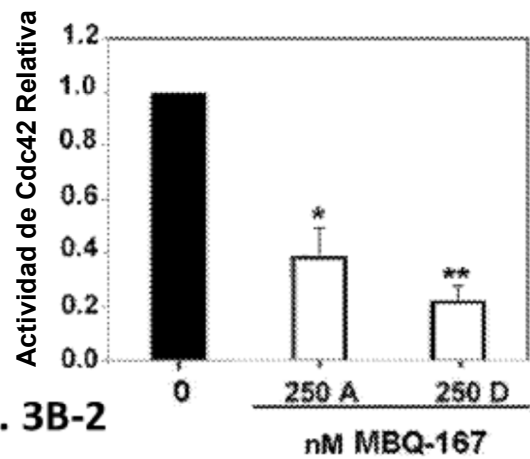


FIG. 3B-2

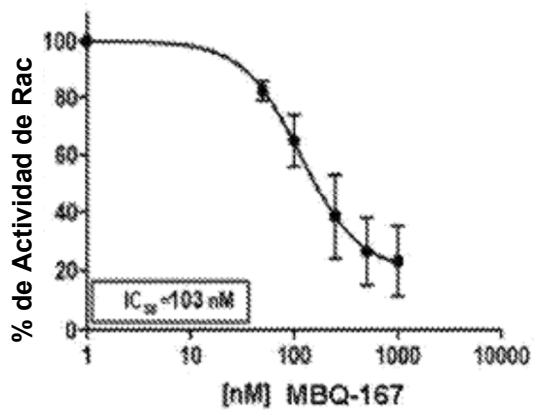


FIG. 3C

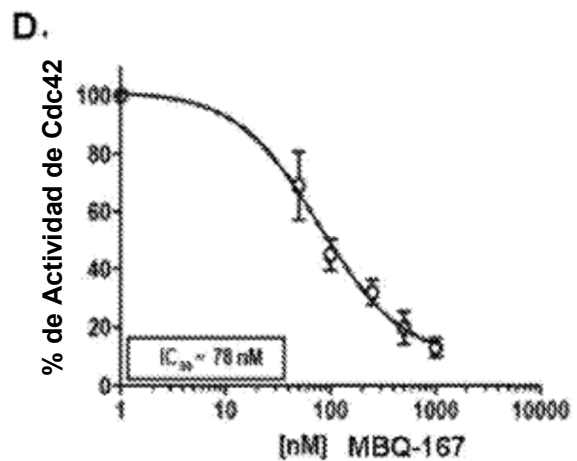


FIG. 3D

MDA-MB-231

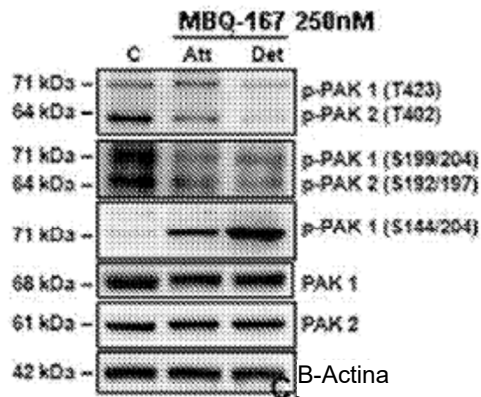


FIG. 4A-1

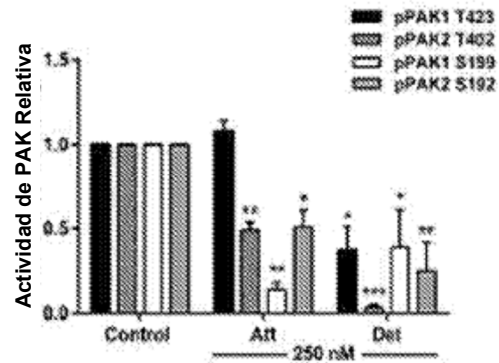


FIG. 4A-2

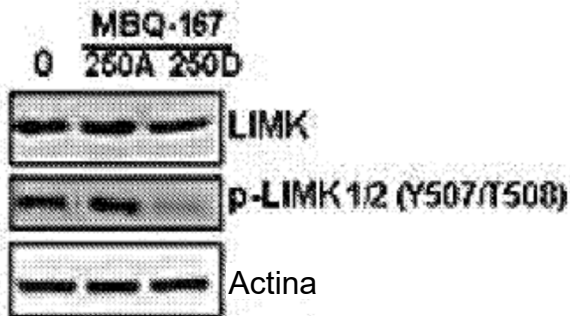


FIG. 4B

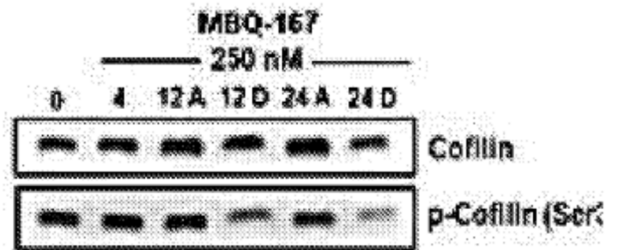


FIG. 4C

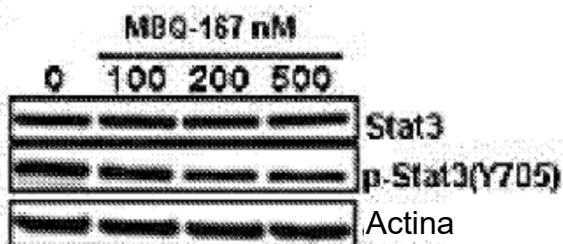


FIG. 4D-1

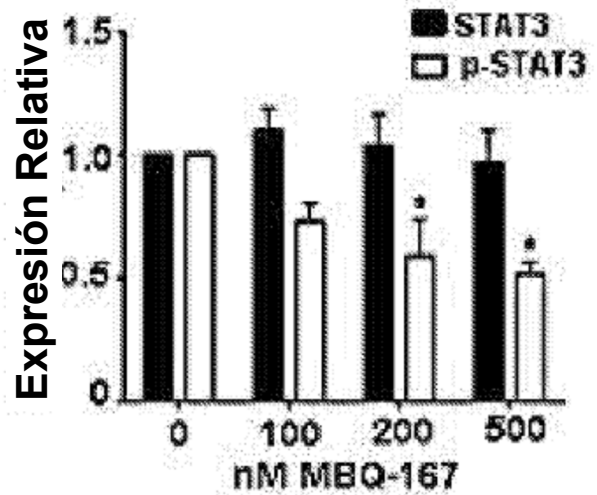
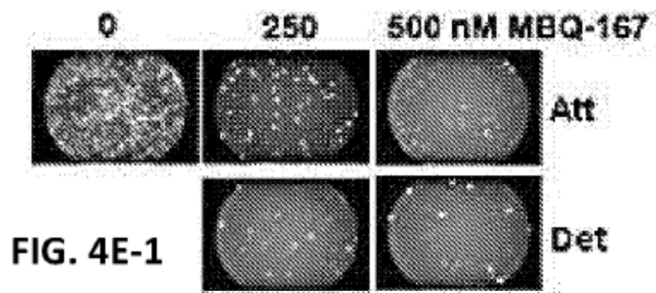
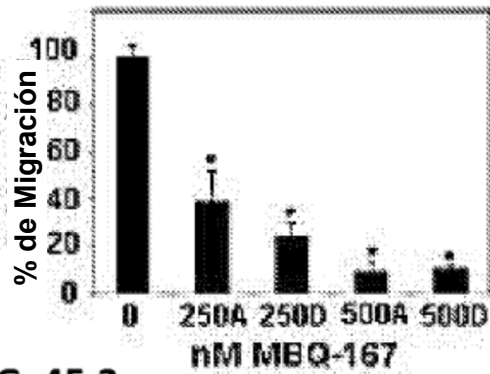
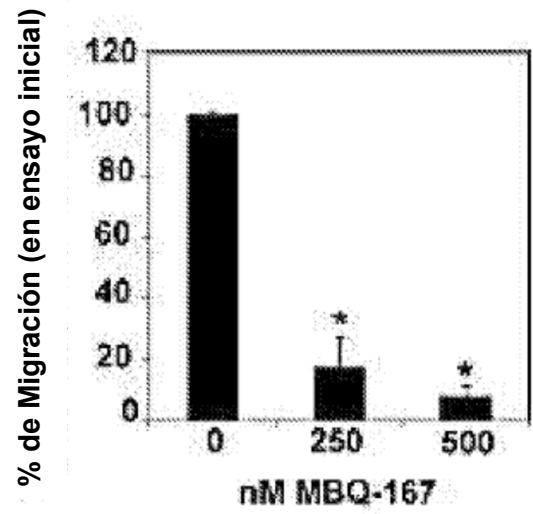
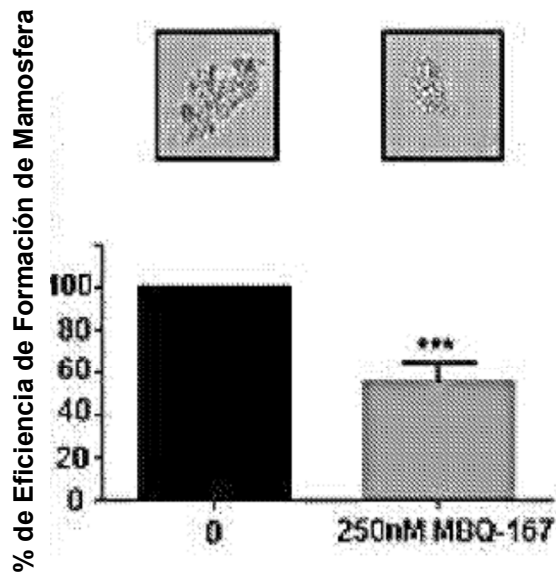


FIG. 4D-2



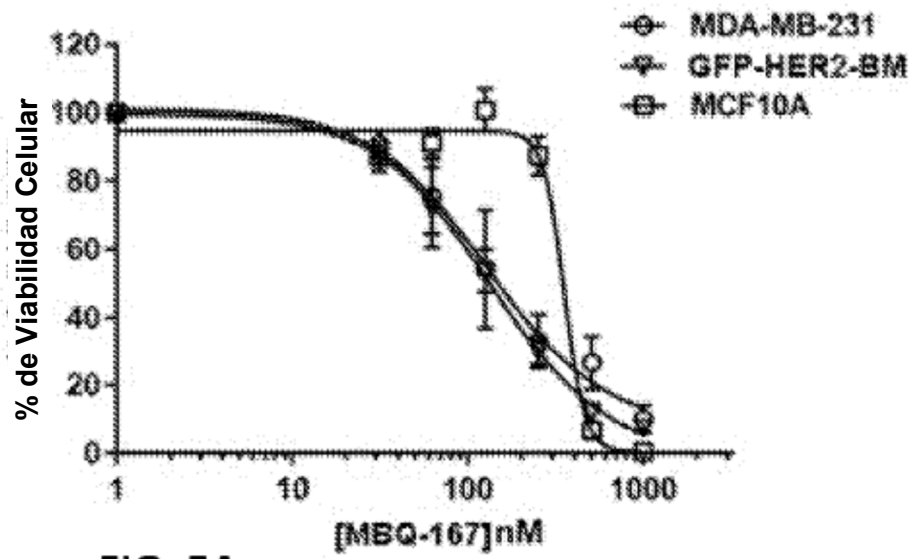


FIG. 5A

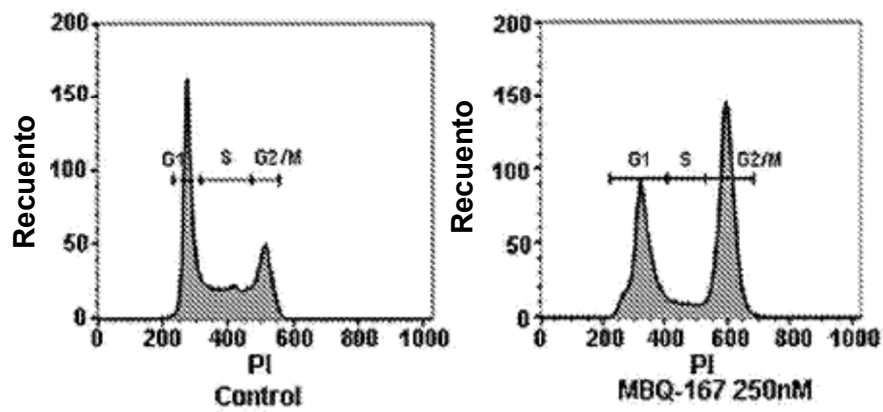


FIG. 5B-1

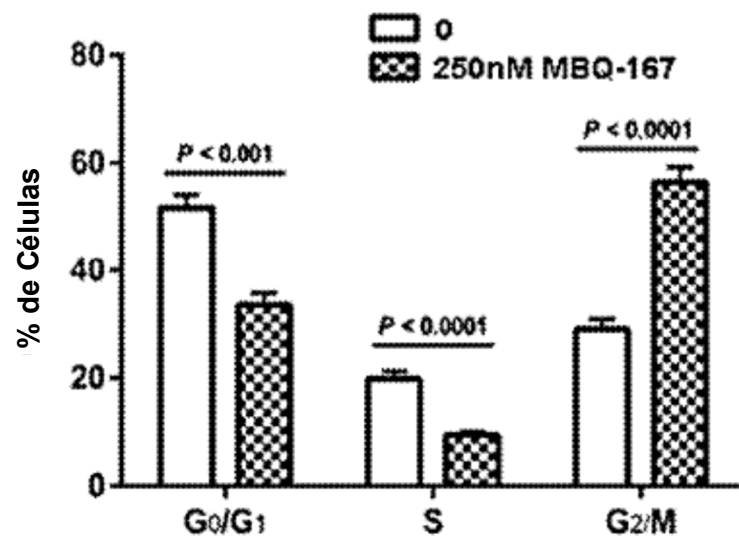


FIG. 5B-2

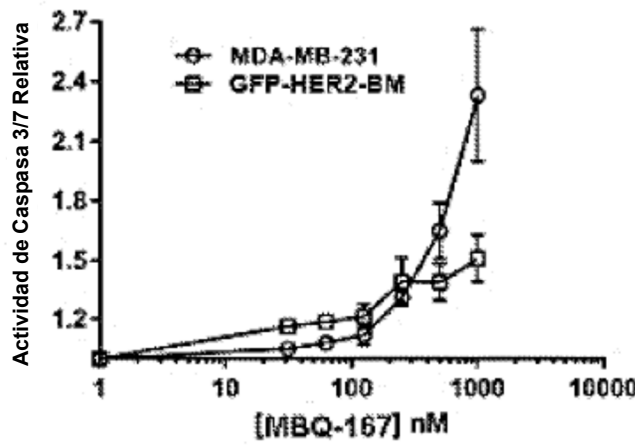


FIG. 5C-1

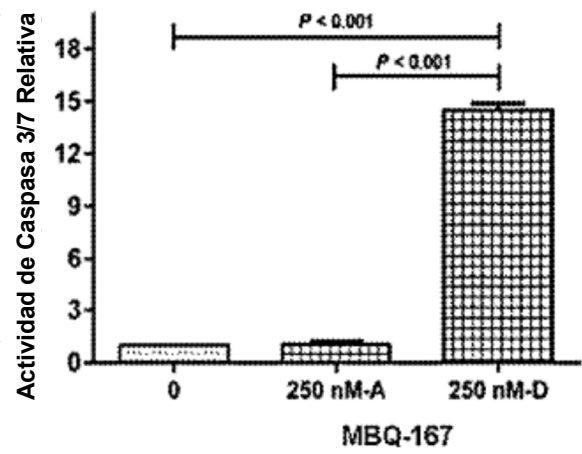


FIG. 5C-2

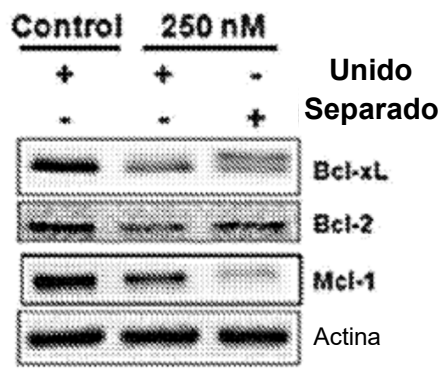


FIG. 5D-1

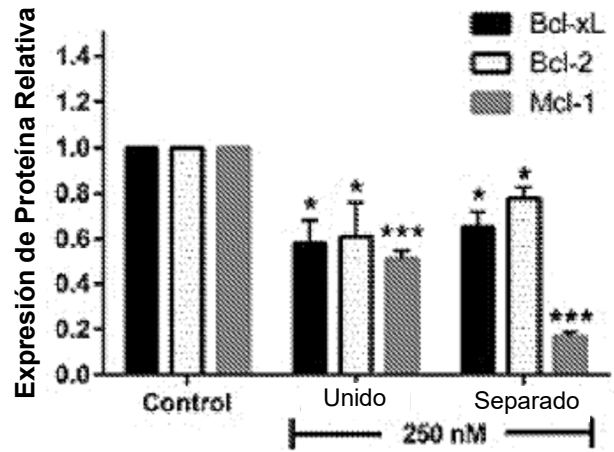


FIG. 5D-2

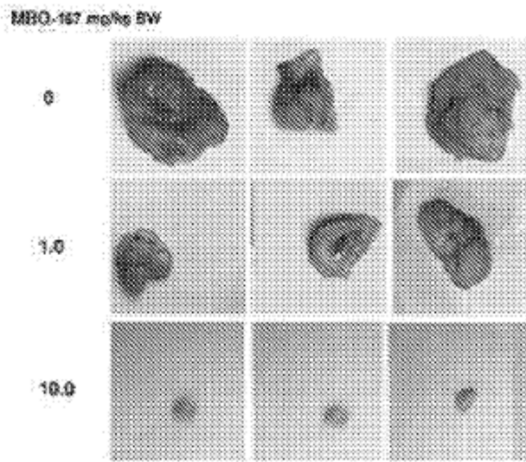


FIG. 6A-1

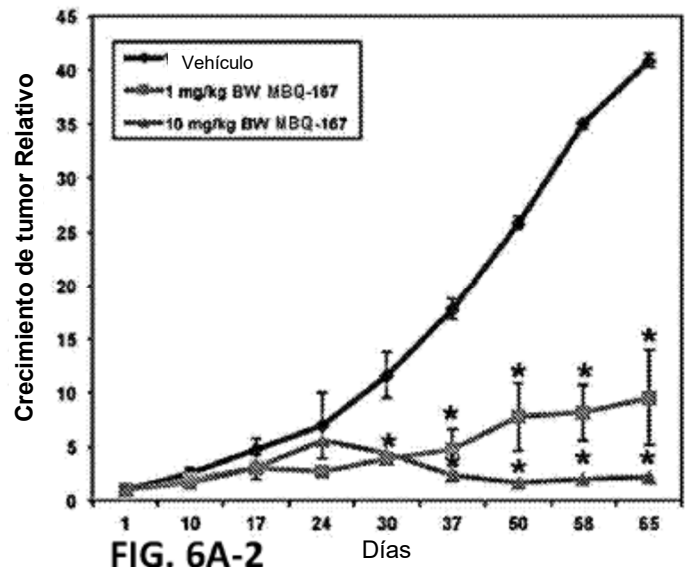


FIG. 6A-2

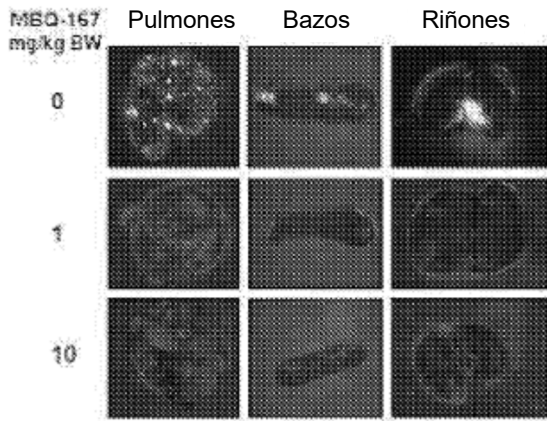


FIG. 6B

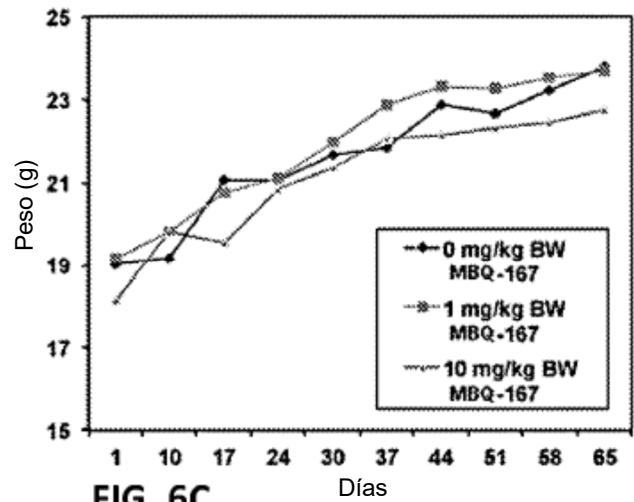


FIG. 6C

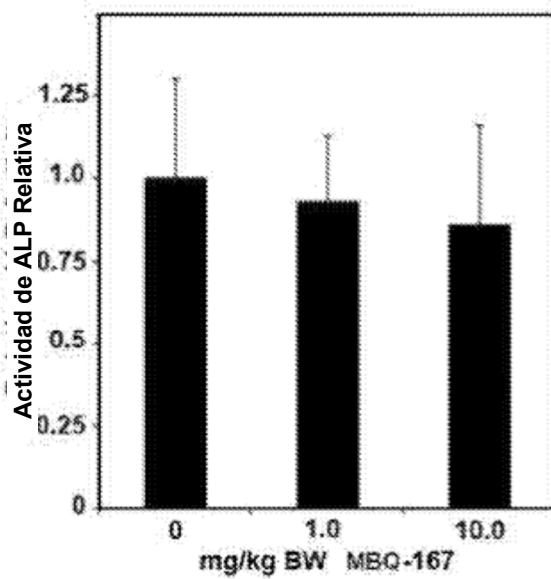


FIG. 6D

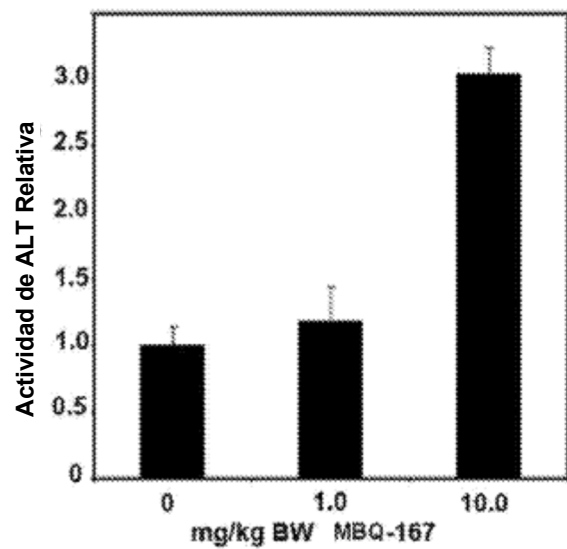


FIG. 6E

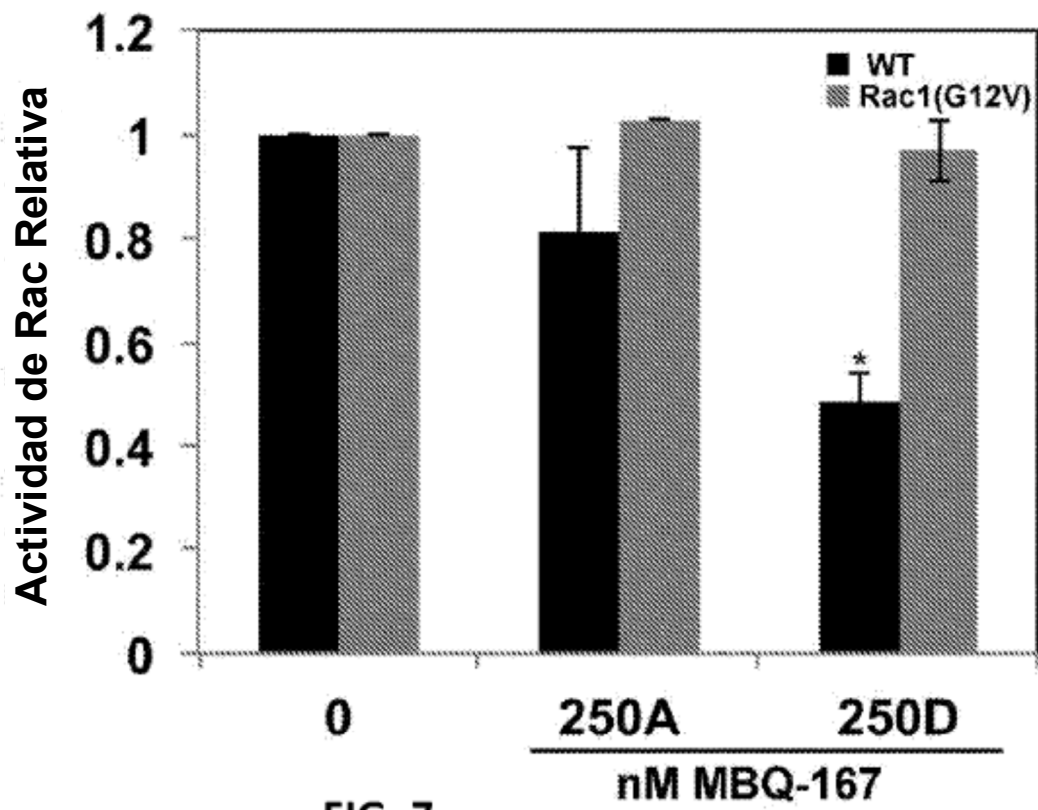


FIG. 7

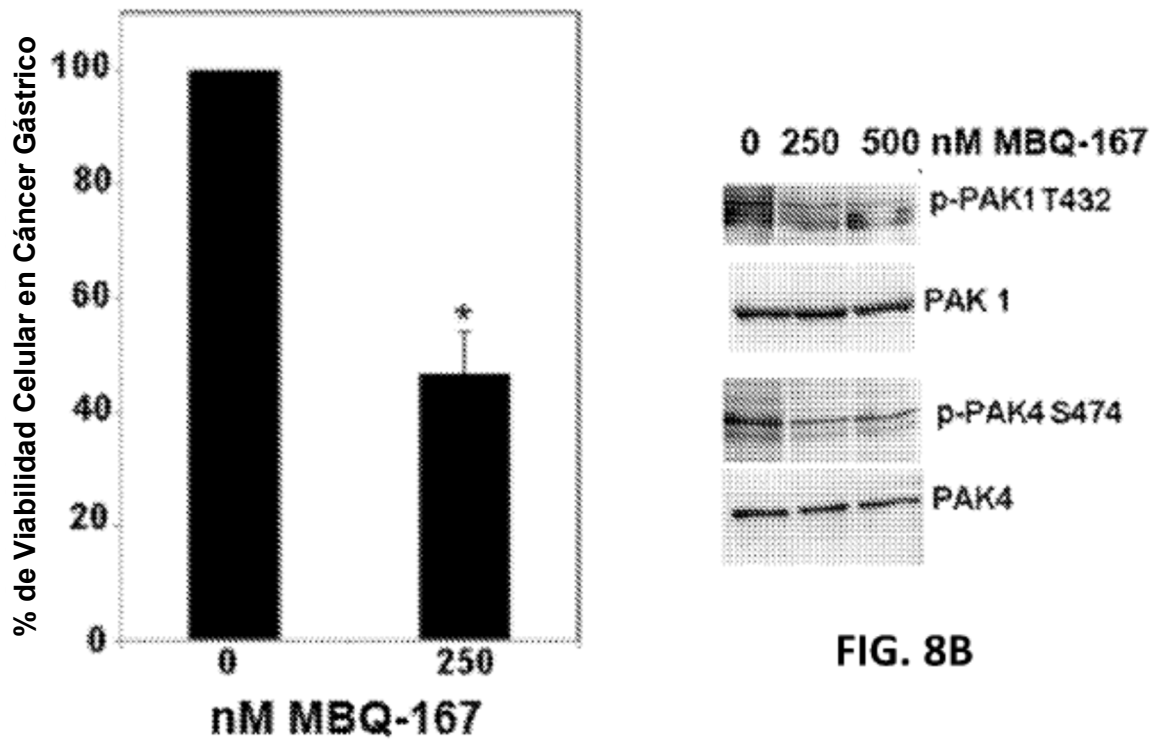


FIG. 8B

FIG. 8A

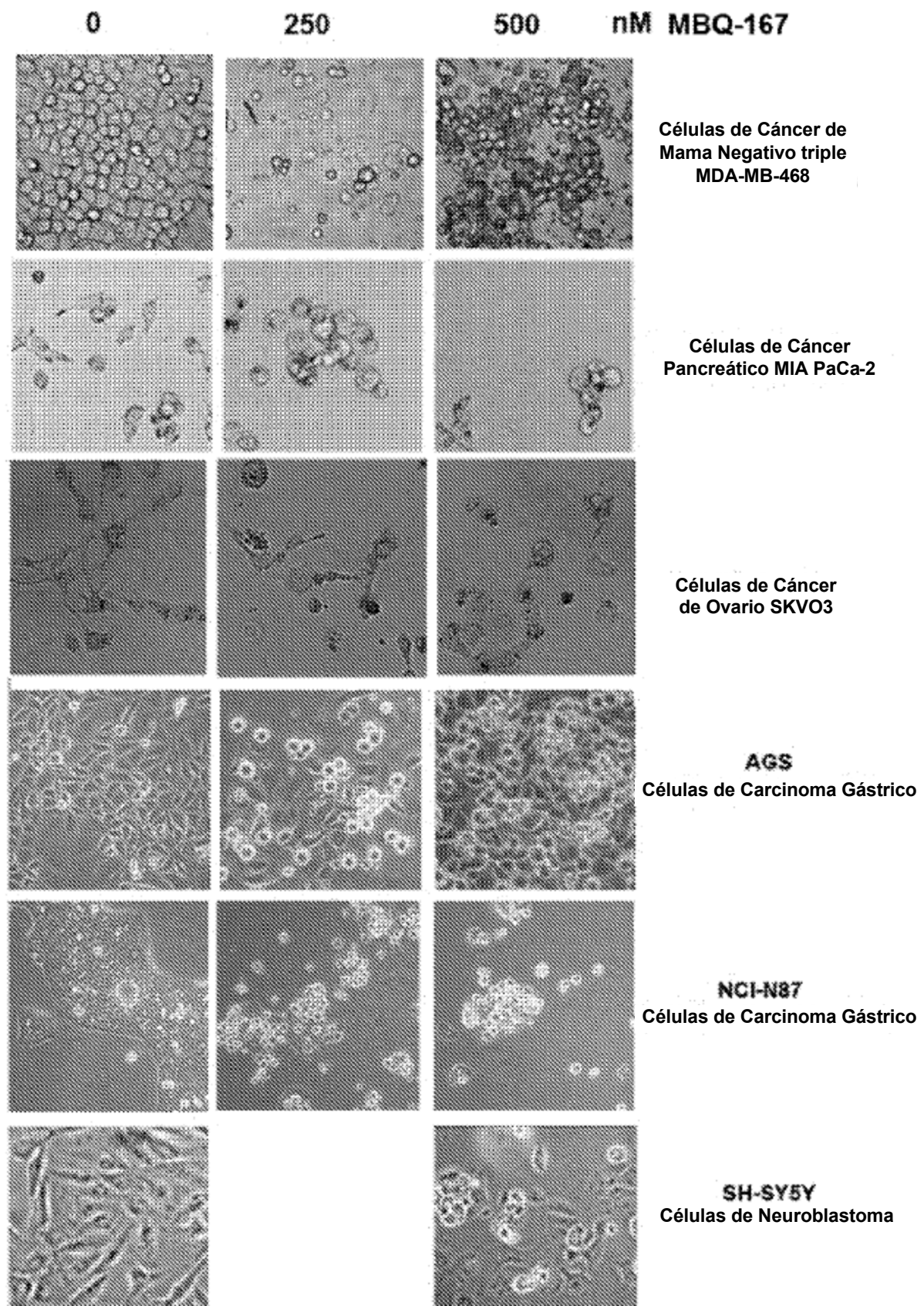


FIG. 9

FIG. 10A

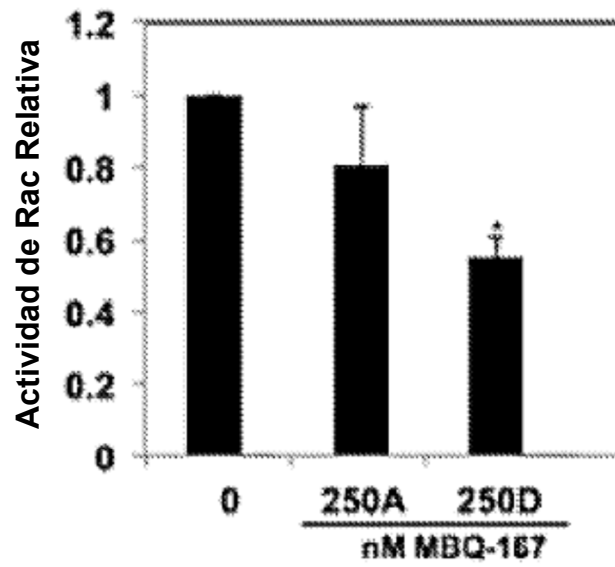


FIG. 10B

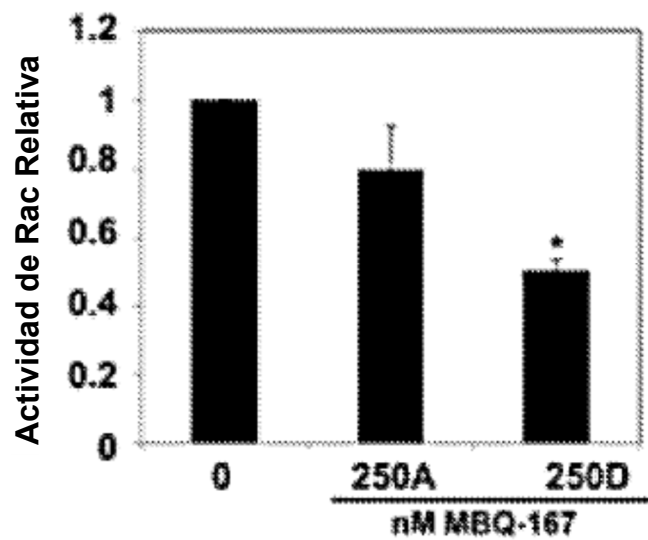
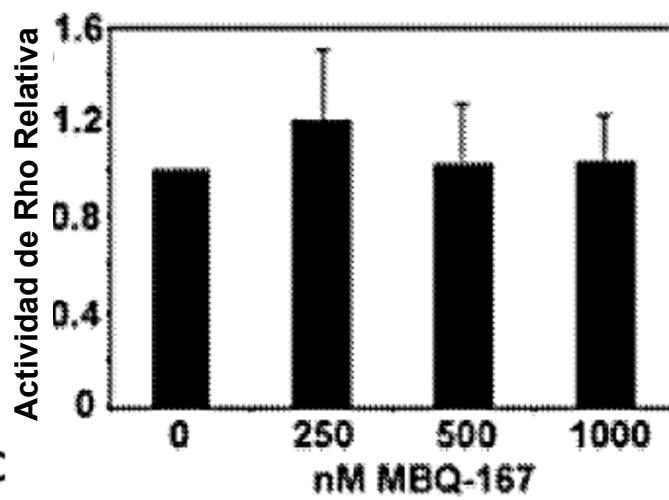


FIG. 10C



MCF-7

MBQ-167

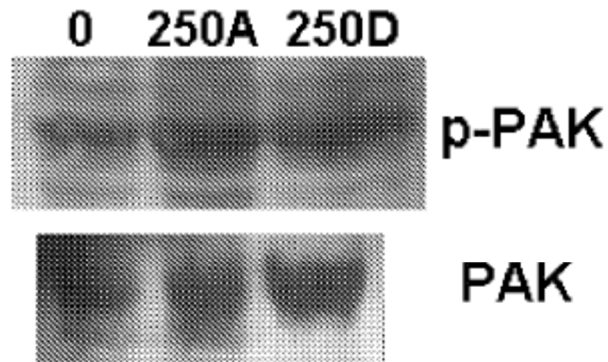


FIG. 11

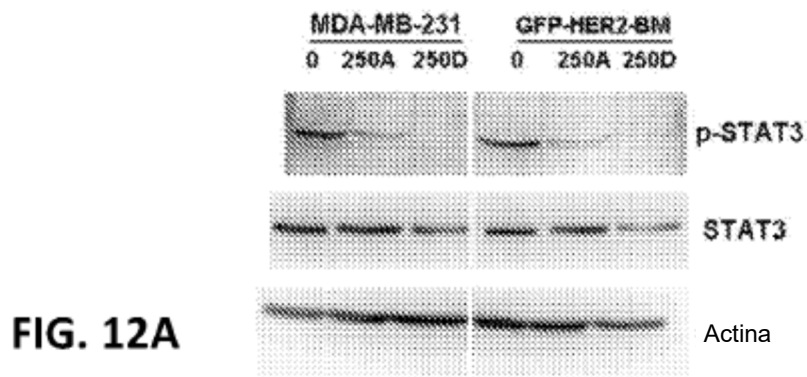


FIG. 12A

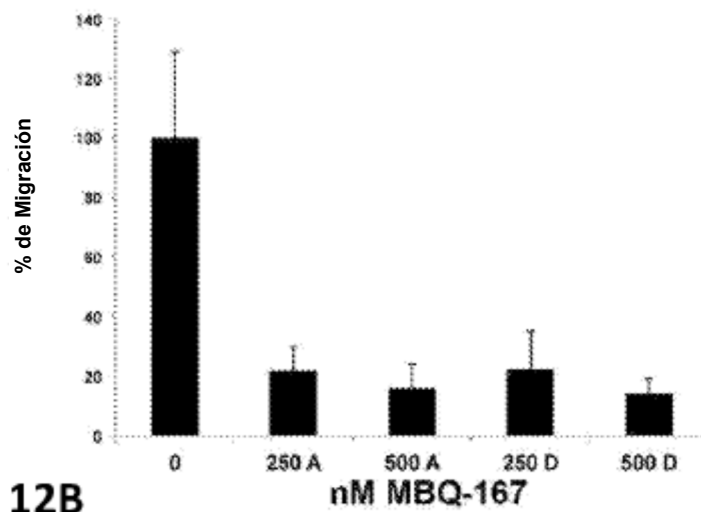


FIG. 12B

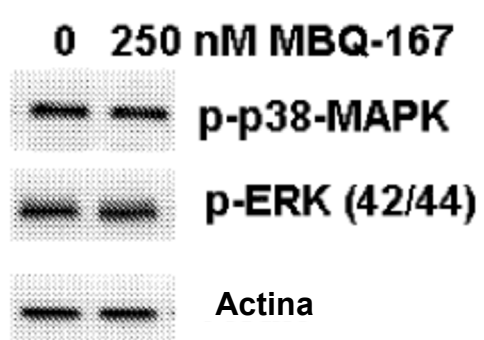


FIG. 13A

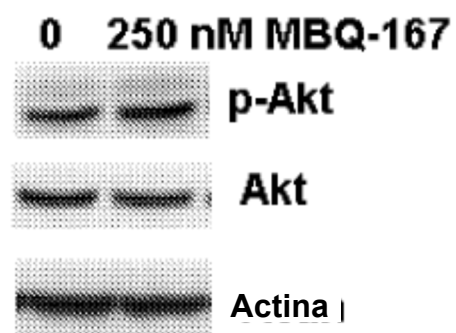


FIG. 13B

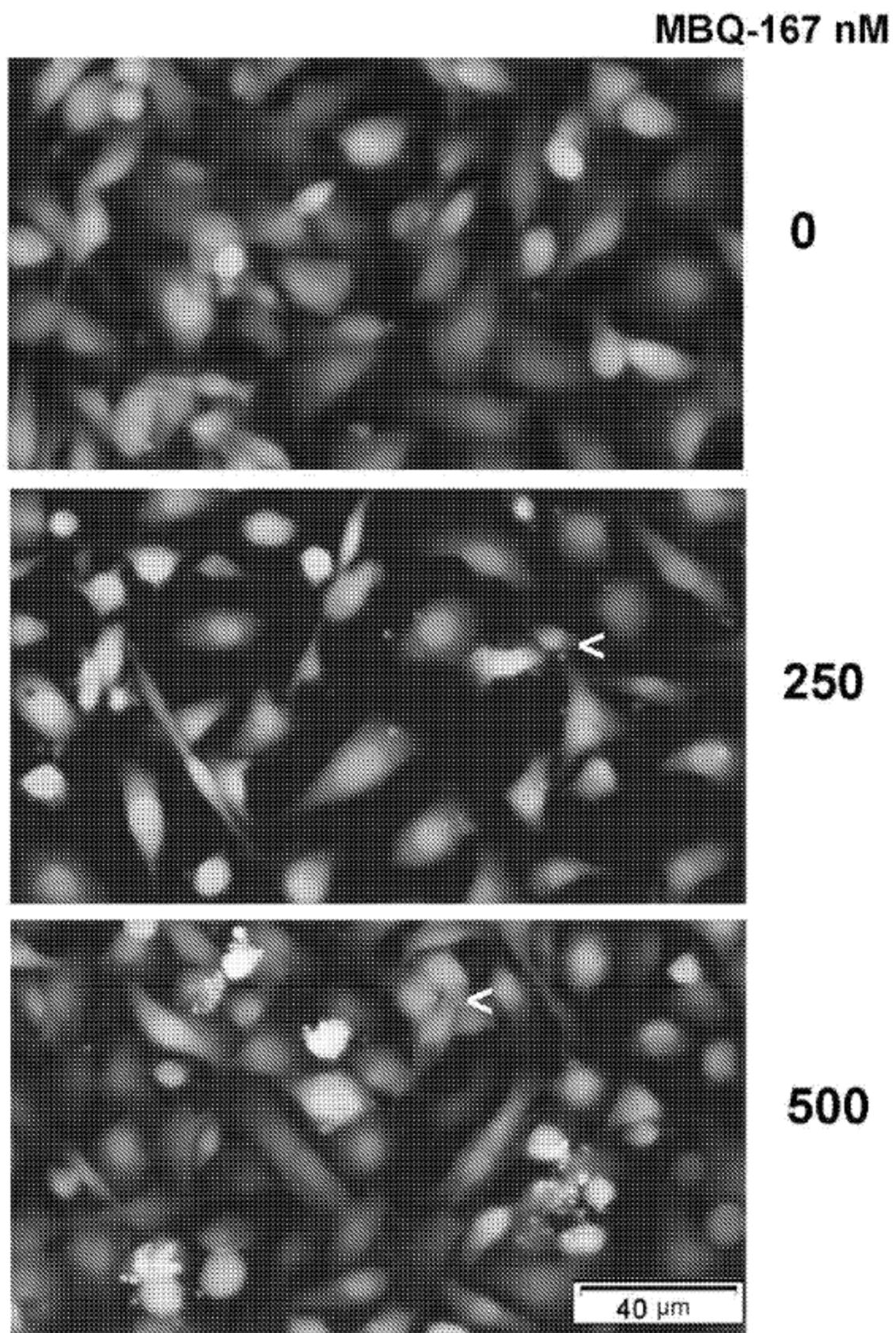


FIG. 14

WT (Sin Doxyciclina)

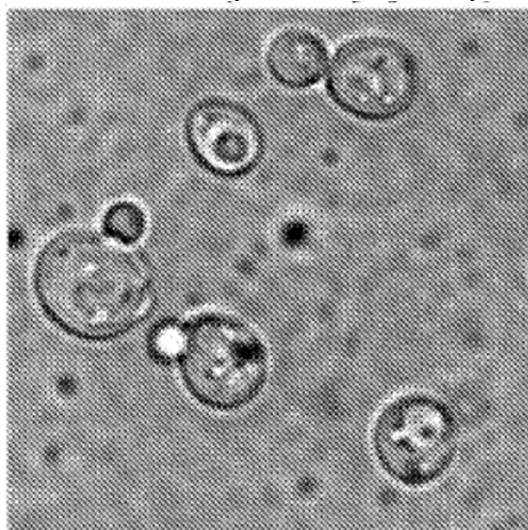


FIG. 15A

MBQ-167 (Sin Doxyciclina)

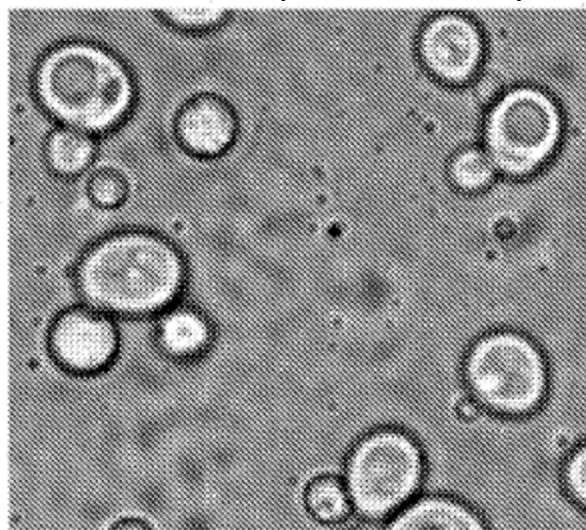


FIG. 15B

Cdc42 Null (+ doxyciclina)

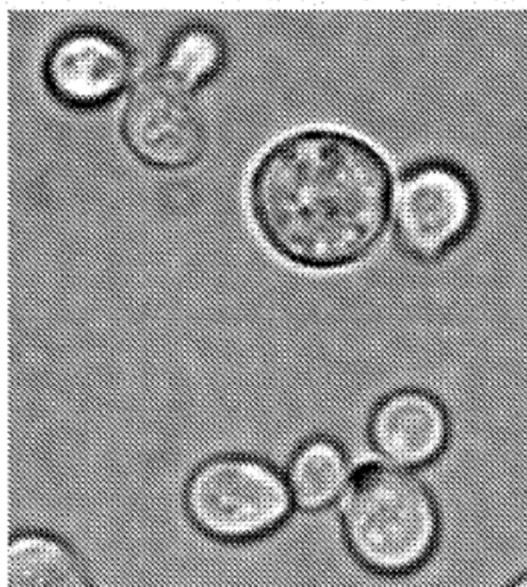


FIG. 15C

Cdc42 Null + MBQ-167

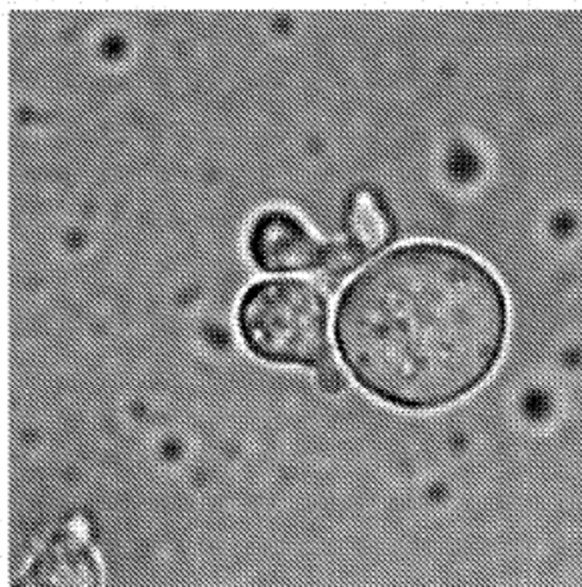


FIG. 15D

Crecimiento de Tumor Mamario MDA-MB-231 en 50 Días

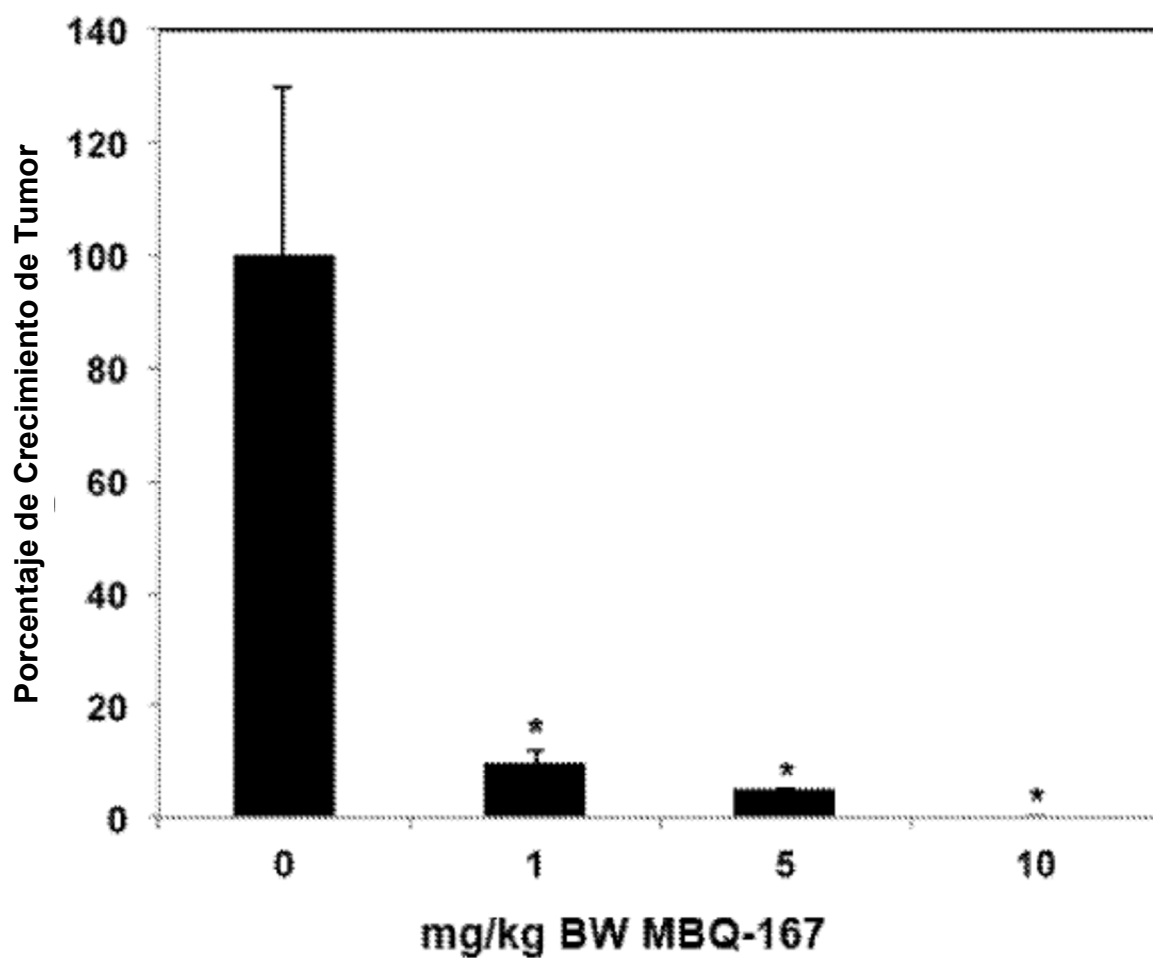


FIG. 16