

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 721**

51 Int. Cl.:

C07C 279/18 (2006.01)

C07D 239/42 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12774997 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2766342**

54 Título: **Derivados de fenil-guanidina**

30 Prioridad:

11.10.2011 US 201161545804 P

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

12.05.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES (50.0%)
Roque Saenz Peña 352
Bernal - Prov. de Buenos Aires B1876BXD, AR y
CHEMO RESEARCH, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LORENZANO MENNA, PABLO;
ALONSO, DANIEL FERNANDO;
GÓMEZ, DANIEL EDUARDO y
COMÍN, JULIETA**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 569 721 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

DERIVADOS DE FENIL-GUANIDINA

5

La presente invención se relaciona con una nueva serie de derivados de fenil-guanidina para la inhibición de Rac1 que bloquean su interacción con factores de intercambio de guanosina (GEFs) pertenecientes a la familia DBL, como agentes para el tratamiento de tumores agresivos y/o resistentes, así como con procesos para su preparación, con composiciones farmacéuticas que los comprenden y su uso en terapia.

10

ARTE PREVIO

Las GTPasas de la familia Rho son intercambiadores moleculares que controlan las vías de señalización regulando la reorganización del citoesqueleto de actina, la expresión de genes, la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, y otros procesos celulares. Entre otras funciones, ellas participan en el ciclo celular y en la regulación de la división celular, estando también involucradas en la secreción, endocitosis, fagocitosis, tráfico de membrana y apoptosis.

Las proteínas de la familia Rho constituyen una de las tres ramas principales de la superfamilia Ras. Las proteínas Rho comparten aproximadamente 30 por ciento de identidad de aminoácidos con las proteínas Ras. Al menos 23 proteínas de la familia Rho de mamíferos han sido identificadas hasta ahora, incluyendo RhoA, Rac1 y Cdc42.

Las células tumorales, además de presentar desregulación de la proliferación, presentan alteraciones en sus características morfológicas y, en el caso de metástasis, adquieren la habilidad de pasar a través de barreras tisulares. Las GTPasas Rho juegan un rol importante en el control de la morfología y en la motilidad celular.

La obtención de compuestos capaces de inhibir específicamente la actividad de Rho-GTPasas ofrece una alternativa específica en la terapia del cáncer.

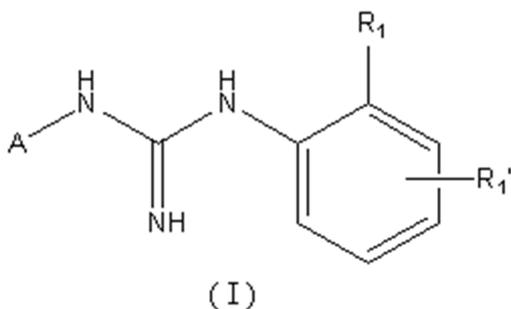
30 Se ha descrito la síntesis y actividad herbicida de algunos derivados de guanidina en el Chinese Journal of Chemistry, 2008, vol. 26(8), pp. 1481-1485.

RESUMEN DE LA INVENCION

35 La presente invención provee compuestos que son inhibidores potentes y selectivos de las proteínas celulares Rho-GTPasas. Específicamente, estos compuestos pueden ser utilizados para inhibir la proteína celular GTPasa Rac1 relacionada con Rho. Concordantemente, estos inhibidores pueden ser utilizados para tratar enfermedades mediadas por proteínas celulares Rac1 de mamífero, es decir pueden ser útiles para el tratamiento de cualquier estado mediado por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1.

40

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



45

o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas en donde: R₁ y R₁' están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₄), CF₃, F, Cl, Br, I, CN, OH, NH₂, -OCH₃, y NO₂; con la condición de que al menos uno de R₁ y R₁' son distintos de H;

50 A es un radical seleccionado de alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado o uno de un sistema conocido de anillos carbocíclico o heterocíclico con 1-2 anillos, en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH₂, NH; es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

estando A sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, halógeno, nitro, ciano, alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado, haloalquilo (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OR₂, -COR₂, -COOR₂, -OC(O)R₂, -C(O)NR₃R₄, -NR₃R₄, -R₅NHR₆, -SR₂, -SO-R₂, -SO₂-R₂, y -SO₂NR₃R₄;

en donde

- 5 cada R₂ representa independientemente H o alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado,
 cada R₃ representa independientemente H o alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado,
 cada R₄ representa independientemente H, alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado, fenilo, piridina o quinolina; en donde el sistema de anillo fenilo, piridina y quinolina está sustituido por uno o más radicales seleccionados de H, alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado, y NH₂;
- 10 R₅ y R₆ están seleccionados independientemente de H, alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado,
 para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde la proteína celular Rho-GTPasa es Rac1 y la afección es un trastorno proliferativo seleccionado del grupo que consiste en precancerosis; displasia; metaplasia; carcinomas del tracto gastrointestinal o colorectal, hígado, páncreas, riñón, vejiga, próstata, endometrio, ovario, testículos, melanoma,
- 15 mucosa oral displásica, cánceres orales invasivos, carcinoma pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, cánceres de mama hormona-dependientes, cánceres de mama hormona-independientes, cánceres de células escamosas y transicionales, tumores malignos neurológicos, incluyendo neuroblastoma, gliomas, glioblastomas, astrocitomas, osteosarcomas, sarcomas de tejidos blandos, hemangiomas, tumores endocrinológicos, neoplasias hematológicas incluyendo leucemias, linfomas, y otras enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas,
- 20 carcinomas in situ, lesiones hiperplásicas, adenomas, fibromas, histiocitosis, enfermedades proliferativas crónicas inflamatorias, enfermedades proliferativas vasculares y enfermedades proliferativas inducidas por virus, enfermedades de la piel caracterizadas por hiperproliferación de queratinocitos y/o células T.

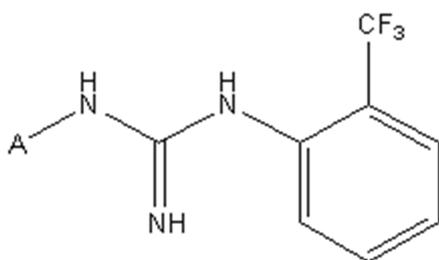
- 25 Alternativamente, este primer aspecto puede ser formulado como el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente Rac1.

Más preferiblemente, el estado mediado por Rac1 es un tumor agresivo y/o resistente.

- 30 Otro aspecto de la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

- 35 Preferiblemente, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica antitumoral.

Otro aspecto provee un nuevo compuesto de fórmula II



(II)

- 40 o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas en donde:

A es un radical de uno de los sistemas de anillo carbocíclico o heterocíclico conocidos con 1-2 anillos, en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos

tiene 5-7 miembros, cada miembro seleccionado independientemente de C, N, O, S, CH, -CH₂, -NH;

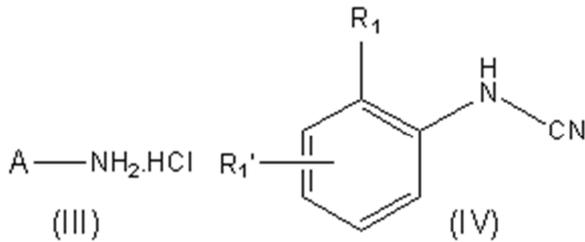
- 45 es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SO-CH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NH-CH₂CH₃,

- 50 SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂;

con la condición de que el compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[4-metilpirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina.

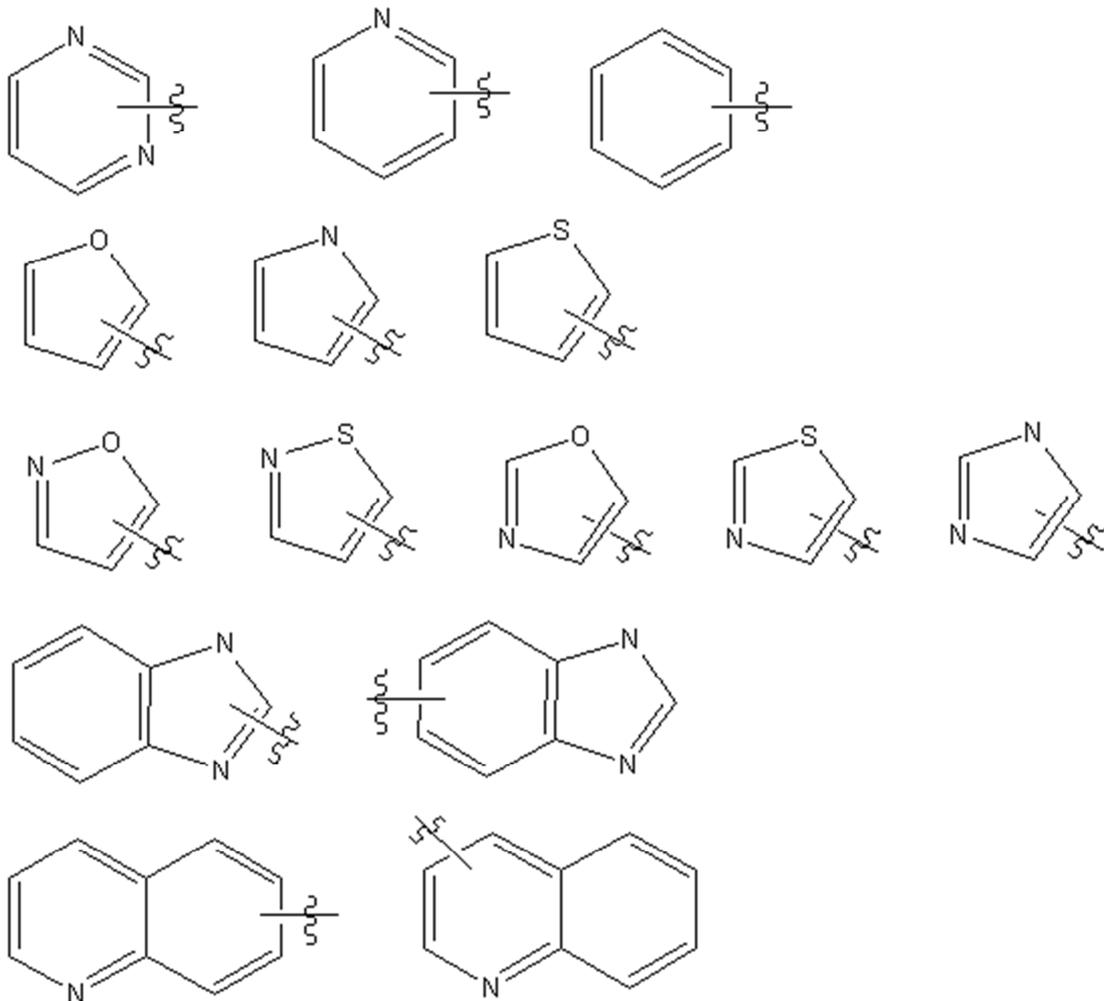
- 5 Aún otro aspecto de la presente invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula II, el cual comprende hacer reaccionar la anilina de fórmula (III) con una cianamida de fórmula (IV):



- 10 en donde A, R₁ y R₁' son como se ha definido anteriormente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

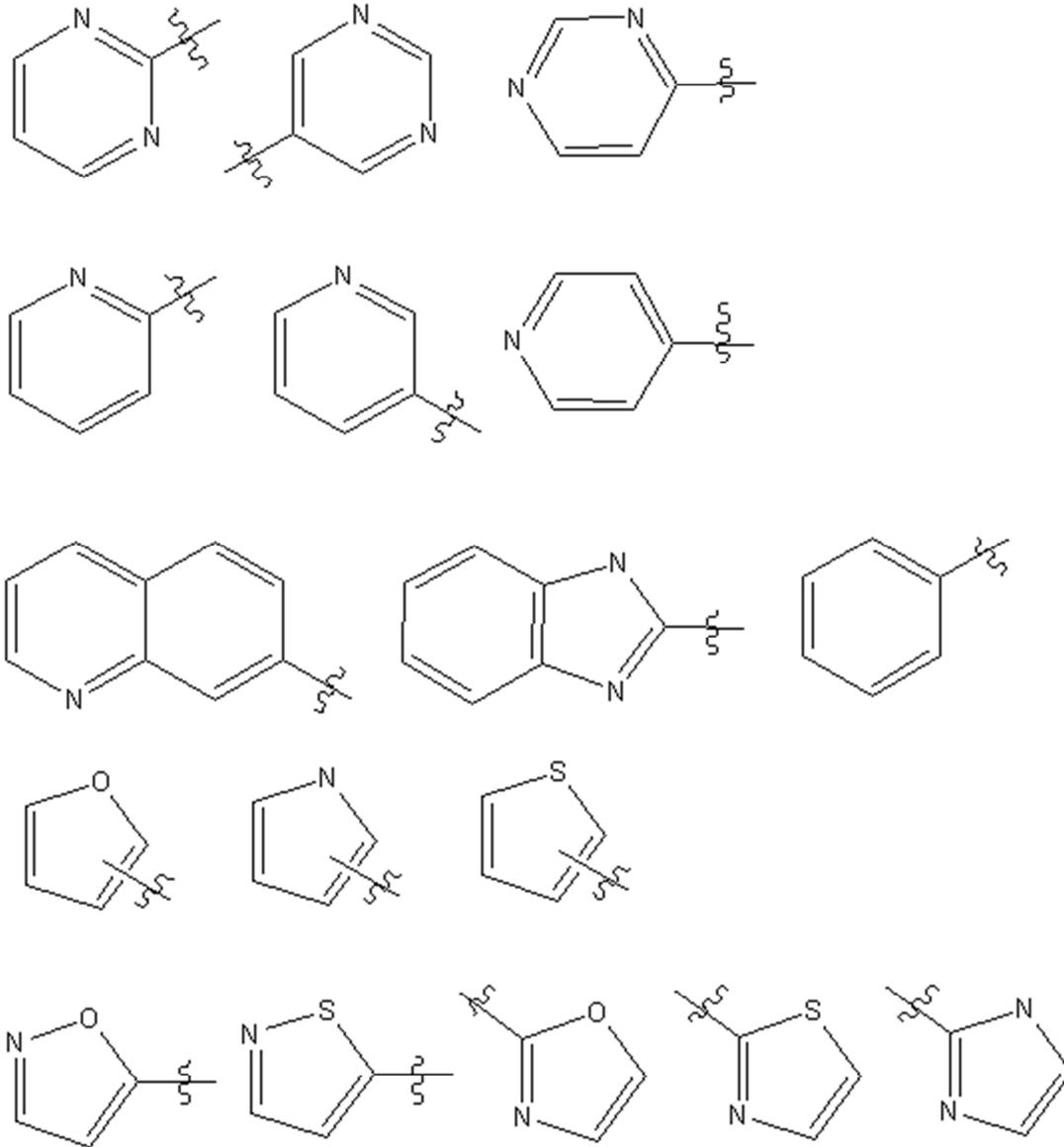
- 15 De acuerdo a una realización del primer aspecto, la presente invención se relaciona con compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde A es un sistema de anillos seleccionado a partir de



y en donde A está sustituido como se definió anteriormente, o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas, y en donde las líneas ondeadas significan el punto de unión del anillo al nitrógeno adyacente. Más preferiblemente, A se selecciona del grupo que consiste en un radical piridina, pirimidina y fenilo; en donde A está sustituido como se definió anteriormente, o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

En otra realización, la invención se relaciona con los compuestos de fórmula I para utilizar en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde A es un sistema de anillos seleccionado a partir de

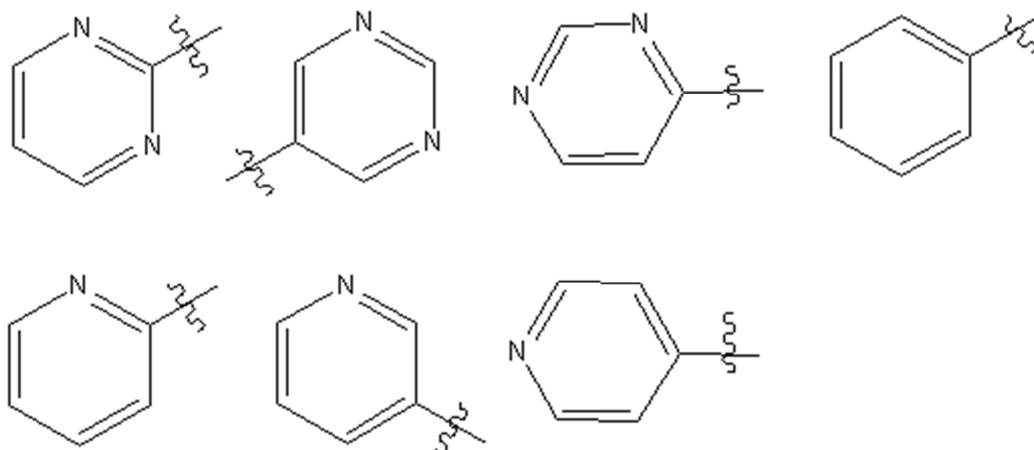
10



15

y en donde A está sustituido por uno o más radicales como se definieron anteriormente, o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas, y en donde las líneas ondeadas significan el punto de unión del anillo al nitrógeno adyacente. En una más preferida realización, la presente invención se relaciona con compuestos de fórmula I para utilizar en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde R₁ y R₁' son como se ha definido anteriormente; A es un sistema de anillo seleccionado a partir de

20



y en donde A está sustituido por uno o más radicales como se ha definido anteriormente, o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas, y las líneas ondeadas significan el punto de unión del anillo al nitrógeno adyacente.

De acuerdo a una realización del primer aspecto, la presente invención se relaciona con compuestos de fórmula I para utilizar en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde A es seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, o n-pentilo, y en donde A está sustituido como se ha definido anteriormente, o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

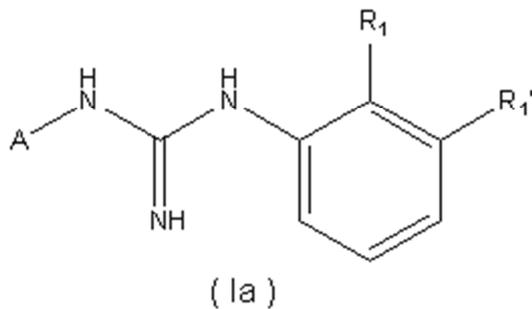
En otra realización, la invención se relaciona con compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde el sistema de anillo A, como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado, haloalquilo (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OR₂, -COR₂, -COOR₂, -OC(O)R₂, -C(O)NR₃R₄, -NR₃R₄, -R₅NHR₆, -SR₂, -SO-R₂, -SO₂-R₂, y -SO₂NR₃R₄;

en donde
 20 cada R₂ representa independientemente H, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, o t-butilo;
 cada R₃ representa independientemente H, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, o t-butilo,
 cada R₄ representa independientemente H, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, fenilo, piridina o quinolina;
 en donde el sistema de anillo fenilo, piridina y quinolina está sustituido por uno o más radicales
 25 seleccionados de H, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, y NH₂;
 R₅ y R₆ están independientemente seleccionados de H, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo o t-butilo;
 o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

30 En otra realización, la invención se refiere a compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde el sistema de anillo A, como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃,
 35 -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂,
 -SO₂N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂;
 o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

40 Otra realización se relaciona con compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde R₁ y R₁' están seleccionados independientemente de H, CF₃, NH₂, metilo, etilo, F, Cl, Br, I, y OH; o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o mezclas de las mismas; con la condición de que al menos uno de R₁ y R₁' son diferentes de H. Son preferidos aquellos compuestos de fórmula I en donde R₁ es CF₃ y R₁' es H.

45 Particularmente preferidos son aquellos compuestos de fórmula la



en donde R_1 y R_1' están seleccionados independientemente de H, CF_3 , NH_2 , metilo, etilo, F, Cl, Br, I, y OH; con la condición de que cuando R_1 es H entonces R_1' es diferente de H, y viceversa;

5 A es como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas; o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas; para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1.

También son preferidos aquellos compuestos de fórmula la en donde R_1' es H, y R_1 está seleccionado de CF_3 , NH_2 , metilo y etilo; siendo particularmente preferido cuando R_1' es H, y R_1 es CF_3 ; para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1.

De acuerdo con una realización particular de este primer aspecto, la invención provee compuestos de fórmula la para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde

15 R_1 y R_1' están seleccionados independientemente de H, CF_3 , NH_2 , metilo, etilo, F, Cl, Br, I, y OH; con la condición de que cuando R_1 es H entonces R_1' es diferente de H, y viceversa;

A es un radical de uno de los sistemas de anillos heterocíclicos conocidos con 1-2 anillos,

en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos

20 tiene 5-7 miembros, cada miembro seleccionado independientemente de C, N, O, S, CH, CH_2 , NH; es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en of H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF_3 , $-CH_2CF_3$, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-COH$, $-COCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-COOCH_2CH_3$, $-OC(O)H$, $-OC(O)CH_3$, $-C(O)NH_2$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-SH_2$, $-SOCH_3$, $-SO_2CH_3$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHCH_3$, $-SO_2NHCH_2CH_3$, $-SO_2N(CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$ y $-SO_2N(CH_2CH_2(CH_3)_2)_2$,

o una sal o solvato de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

De acuerdo con otra realización, la invención provee compuestos de fórmula la para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde R_1 y R_1' están independientemente seleccionados de H, CF_3 , NH_2 , metilo, y etilo; con la condición de que cuando R_1 es H entonces R_1' es diferente de H, y viceversa;

A está seleccionado del grupo que consiste en un radical de pirimidina, piridina, quinolina, imidazol, bencimidazol y pirrol, siendo particularmente preferidos aquellos compuestos donde A es un radical de pirimidina;

35 en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF_3 , CH_2CF_3 , alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-COH$, $-COCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-COOCH_2CH_3$, $-OC(O)H$, $-OC(O)CH_3$, $-C(O)NH_2$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-SH_2$, $-SOCH_3$, $-SO_2CH_3$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHCH_3$, $-SO_2NHCH_2CH_3$, $-SO_2N(CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$ y $-SO_2N(CH_2CH_2(CH_3)_2)_2$;

40 o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

De acuerdo con otra realización particular, la invención provee compuestos de fórmula la para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde

45 R_1 y R_1' están independientemente seleccionados de H, CF_3 , NH_2 , metilo, y etilo; con la condición de que al menos uno de R_1 y R_1' son diferentes de H; y

A es un radical fenilo sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF_3 , CH_2CF_3 , alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-COH$, $-COCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-COOCH_2CH_3$, $-OC(O)H$, $-OC(O)CH_3$, $-C(O)NH_2$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-SH_2$, $-SOCH_3$, $-SO_2CH_3$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NHCH_3$, $-SO_2NHCH_2CH_3$, $-SO_2N(CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_3)_2$, $-SO_2N(CH_2CH_2CH_2CH_3)_2$ y $-SO_2N(CH_2CH_2(CH_3)_2)_2$; o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

De acuerdo con otra realización particular, la invención provee compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1, en donde

R₁ y R₁' están independientemente seleccionados de H, CF₃, NH₂, metilo, y etilo; con la condición de que al menos uno de R₁ y R₁' son diferentes de H; y

- 5 A es un radical alquilo (C₁-C₆) lineal o ramificado, preferiblemente seleccionado de metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, o n-pentilo, el cual está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, -CF₃, -CH₂CF₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂,
 10 -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂; o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

En una realización particularmente preferida de este primer aspecto, la invención se refiere a los compuestos de fórmula I, los cuales se seleccionan de:

- 15 N-pirimidin-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (1);
 N-(4-etil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (2);
 N-(4-metil-6-propilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (3);
 N-(4-isopropil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (4);
 20 N-(4-butil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (5);
 N-(4-tert-butil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (6);
 N-(4,6-diaminopirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (7);
 N-(4,6-dicloropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (8);
 N-(4,6-difluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (9);
 25 N-[4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (10);
 N-(4-ciano-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (11);
 N-(5-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (12);
 N-(4-cloro-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (13);
 N-(4-fluoro-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (14);
 30 N-(4-fluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (15);
 N-(5-fluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (16);
 N-[4,6-bis(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (17);
 N-(4,6-dicianopirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (18);
 N-piridin-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (19);
 35 N-piridin-3-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (20);
 N-piridin-4-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (21);
 N-pirimidin-4-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (22);
 N-pirimidin-5-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (23);
 N-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (24);
 40 N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (25);
 N-(2,6-dimetilpiridin-4-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (26);
 N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (27);
 2-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dimetilbencensulfonamida (28);
 2-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dietilbencensulfonamida (29);
 45 2-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dipropilbencensulfonamida (30);
 2-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dibutilbencensulfonamida (31);
 3-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dimetilbencensulfonamida (32);
 3-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dietilbencensulfonamida (33);
 50 3-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dipropilbencensulfonamida (34);
 3-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dibutilbencensulfonamida (35);
 4-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dimetilbencensulfonamida (36);
 4-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dietilbencensulfonamida (37);
 4-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dipropilbencensulfonamida (38);
 55 4-[(imino{2-(trifluorometil)fenil}amino)metil]amino]-N,N-dibutilbencensulfonamida (39);
 N-(2-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (40);
 N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41);
 N-(4-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (42);
 N-2-tienil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (43);
 60 N-3-tienil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (44);
 N-1H-pirrol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (45);
 N-1H-pirrol-3-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (46);
 N-2-furil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (47);

- N-3-furil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (48);
 N-1,3-oxazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (49);
 N-1,3-tiazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (50);
 N-1H-imidazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (51);
 5 N-isoxazol-5-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (52);
 N-1H-bencimidazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (53);
 N-(3,4-dimetilisoxazol-5-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (54);
 N-(2-aminofenil)-N'-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)guanidina (55);
 N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-N'-(3-etilfenil)guanidina (56);
 10 1-(4-(4-amino-2-metilquinolin-7-ilamino)pirimidin-2-il)-3-(2-(trifluorometil)fenil)guanidina (57);
 N-(4-amino-2-metilquinolin-7-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (58);
 N-quinolin-7-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (59);
 N-metil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (60);
 N-etil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (61);
 15 N-propil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (62);
 N-butil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (63);
 N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64); y
 N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (65).
- 20 Los compuestos particularmente preferidos de fórmula I son: N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (65), N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (25), N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (27), N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41), N-[4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (10) y N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64).
- 25 A lo largo de la presente descripción, mediante el término "tratamiento" se quiere significar eliminar, reducir o mejorar la causa, los efectos o progresión de una afección, e incluye una reducción en el grado de avance, una detención en el grado de avance, mejora de la afección, y cura de la afección. El tratamiento como una medida profiláctica (por ejemplo profilaxis) está también incluido. El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, en
- 30 los cuales se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, secuencialmente o simultáneamente. Los ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no están limitados a, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo por ejemplo drogas, anticuerpos (por ejemplo como en inmunoterapia), pro-drogas (por ejemplo como en terapia fotodinámica, GDEPT, ADEPT, etc.)); cirugía, terapia de radiación, y terapia de genes. Para los propósitos de esta invención, tratamiento incluye, pero no está limitado a, alivio, mejora o eliminación de uno o más
- 35 síntomas de la afección; disminución del grado de la afección; estado estabilizado de la afección (es decir no empeoramiento); retraso o lentitud del avance de la afección; mejora o paliación del estado de la afección; y remisión de la afección (sea parcial o total).
- Como se muestra a continuación, los compuestos de fórmula I son inhibidores de las proteínas celulares Rho-GTPasa, más específicamente de la proteína celular Rac1, que son útiles en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, preferiblemente una afección mediada por la proteína celular Rac1.
- 40 La expresión "una enfermedad mediada por la proteína celular Rac1", como es utilizada en la presente concierne a una afección en la cual la proteína celular Rac1 y/o la acción de Rac1 es importante o necesaria, por ejemplo, para
- 45 el inicio, avance, expresión, etc. de tal afección.
- Ya que se conoce que las quinasas Rho-GTPasas tienen un rol central en el ciclo celular, y en particular Rac1, en una realización preferida de la presente invención las enfermedades, afecciones y/o trastornos que pueden ser prevenidos, mejorados o tratados con los compuestos de la presente invención son las enfermedades proliferativas.
- 50 Se considera que una enfermedad se beneficia de reducida Rho-GTPasa, en particular actividad de Rac1, si una reducción de la actividad de Rac1 de al menos 10%, preferiblemente de al menos 20%, preferiblemente de al menos 30%, conduce a una mejora de al menos un indicador clínico de aquella enfermedad. Ejemplos de tales indicadores son velocidad de proliferación, la cual está preferiblemente reducida, diferenciación celular, la cual está preferiblemente inducida, etc.
- 55 Es adicionalmente preferido que las enfermedades proliferativas sean seleccionadas del grupo que consiste en precancerosis; displasia; metaplasia; carcinomas del tracto gastrointestinal o colorectal, hígado, páncreas, riñón, vejiga, próstata, endometrio, ovario, testículos, melanoma, mucosa oral displásica, cánceres orales invasivos, carcinoma pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, cánceres de mama hormona-dependientes, cánceres de
- 60 mama hormona-independientes, cánceres de células transicionales y escamosas, tumores malignos neurológicos, incluyendo neuroblastoma, gliomas, glioblastomas, astrocitomas, osteosarcomas, sarcomas de tejidos blandos, hemangiomas, tumores endocrinológicos, neoplasias hematológicas incluyendo leucemias, linfomas, y otras enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas, carcinomas in situ, lesiones hiperplásicas, adenomas,

fibromas, histiocitosis, enfermedades proliferativas crónicas inflamatorias, enfermedades proliferativas vasculares y enfermedades proliferativas inducidas por virus, enfermedades de la piel caracterizadas por hiperproliferación de queratinocitos y/o células T. Enfermedades en particular tratables con los compuestos de la presente invención son glioblastoma, cánceres colorectal, ovárico, prostático y gástrico, y adenocarcinomas, más preferiblemente adenocarcinomas invasivos.

De este modo, la presente invención también provee compuestos activos que son agentes antiproliferativos. La expresión "agente antiproliferativo" tal como es utilizada en la presente hace referencia a un compuesto que trata una afección proliferativa (es decir un compuesto que es útil en el tratamiento de una afección proliferativa).

Los términos "proliferación celular", "afección proliferativa", "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa", se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseable, como por ejemplo, crecimiento neoplásico o hiperplásico, sea in vitro o in vivo.

Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero no están limitados a, proliferación celular benigna, pre-maligna, y maligna, incluyendo pero no limitado a, neoplasmas y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos) y aterosclerosis.

El sujeto puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo un conejillo de Indias, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), canino (por ejemplo un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo un caballo), un primate, simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, tití, babuino), un simio (por ejemplo gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un humano. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de los grupos particulares y preferidos descritos anteriormente en la presente.

El tratamiento definido en la presente anteriormente se puede aplicar como una terapia única o puede implicar, además del compuesto de la invención, cirugía convencional o radioterapia o quimioterapia.

También se proporciona un compuesto de fórmula I para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rac1, en el que el tratamiento comprende administrar a un sujeto simultáneamente, secuencialmente o por separado por lo menos un compuesto de fórmula I como se define anteriormente y

i) uno o más agentes anticáncer, preferiblemente seleccionados de gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, capecitabina, decitabina, carboplatino, cisplatino, vinorelbina, irinotecan, doxorubicina, dacarbazina, rituximab o un derivado de los mismos;

ii) radioterapia .

iii) cirugía convencional;

iv) o mezclas de los mismos.

Como se mencionó anteriormente, la presente Invención también proporciona nuevos compuestos de fórmula II.

Se observa que la fórmula general I comprende aquellos compuestos de fórmula II. Por lo tanto, los compuestos de fórmula II son también útiles para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, particularmente por proteínas celulares Rac1,

De acuerdo a una realización, se proveen nuevos compuestos de formula II donde A es un radical fenilo sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alquenoilo (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂; o una sal de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas.

Otra realización se refiere a compuestos de formula II en donde A es un sistema de anillos heterocíclico con 1-2 anillos, en donde cada uno de los anillos que forma el sistema de anillos

tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH₂, NH;

es saturado, parcialmente saturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionado del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂,
 5 -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NH CH₂CH₃,
 -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂ CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂; o una sal
 de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas;
 con la condición de que el compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-
 10 trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[(4-metil)pirimidin-2-
 il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina.

En una realización más preferida, la presente invención provee compuestos de fórmula II en donde A está
 seleccionado del grupo que consiste en un radical de pirimidina, piridina, quinolina, imidazol, bencimidazol y pirrol;
 en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro,
 15 ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH,
 -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂,
 -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NH CH₂CH₃,
 -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂ CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂; o una sal
 de los mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas; con la condición de que
 20 el compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-
 bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[(4-metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-
 (trifluorometil)fenil]guanidina.

Particularmente preferidos son aquellos compuestos de fórmula II en donde A es un radical de pirimidina; estando el
 25 radical A sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano,
 metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃,
 -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃,
 -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NH CH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂,
 -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂; o una sal de los
 30 mismos, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas; con la condición de que el
 compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-
 bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[(4-metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-
 (trifluorometil)fenil]guanidina.

Los compuestos N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (25), N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina
 35 (27), N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41), N-[4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-
 (trifluorometil)fenil]guanidina (10) y N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64) son ejemplos específicos
 de compuestos preferidos de fórmula II.

Cuando los compuestos de acuerdo con la presente invención están en la forma de sales, preferiblemente son sales
 40 farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables,
 sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales metálicas, de amonio y de alquilamonio
 farmacéuticamente aceptables.

Todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, tales como aquellos, por ejemplo, que
 45 pueden existir debido a carbonos asimétricos de cualquiera de los sustituyentes, incluyendo formas enantiómeras
 (las cuales pueden existir aún en ausencia de carbonos asimétricos) y formas diastereoméricas, están contempladas
 y dentro del alcance de las realizaciones preferidas. También estereoisómeros individuales que pueden, por
 ejemplo, estar sustancialmente libres de otros isómeros, o pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos o
 con todos los otros estereoisómeros seleccionados, están dentro del alcance de la presente invención.

50 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas
 solvatadas, incluyendo formas hidratadas, y están comprendidas dentro del alcance de la presente invención.
 Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general,
 todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y están dentro del
 55 alcance de la presente invención.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la
 presente invención (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) de acuerdo con la fórmula II y uno o más
 60 vehículos farmacéuticamente aceptables. Los portadores deben ser "farmacéuticamente aceptables" en el sentido
 de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para los receptores de la misma.

La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de fórmula II como se define en la presente, al menos una o más sustancias adicionales terapéuticamente activas y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del profundo juicio médico, apropiadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los
- 10 vehículos, excipientes, adecuados, pueden encontrarse en textos farmacéuticos estándar.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o de material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado.

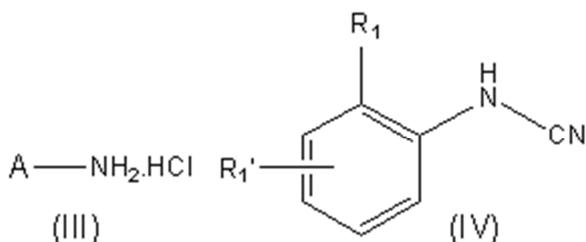
- 15 Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados en la forma de cualquier formulación farmacéutica, cuya naturaleza, como es bien conocido, dependerá de la naturaleza del compuesto activo y su vía de administración. Puede ser utilizada cualquier vía de administración, por ejemplo oral, parenteral, nasal, ocular, rectal y administración tópica. La persona experta en la técnica establecerá, considerando el conocimiento disponible, los
- 20 parámetros y excipientes necesarios.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar de una manera sustancialmente similar a otros conocidos agentes antitumorales para el tratamiento (tanto quimiopreventivamente como terapéuticamente) de

25 varias enfermedades malignas. La dosis antitumoral a ser administrada, ya sea una dosis única, dosis múltiples, o una dosis diaria, por supuesto variará con el compuesto particular empleado, la vía de administración elegida, el peso corporal y la superficie corporal del receptor, el tipo de tumor, y el estado físico del paciente y el estadio de la enfermedad, entre otros factores. La dosificación a ser administrada no está sujeta a límites definidos, pero normalmente será una cantidad eficaz, o la equivalente sobre una base molar de la forma libre farmacológicamente activa producida a partir de una formulación de dosificación tras la liberación metabólica del fármaco activo para

30 conseguir su deseado efecto farmacológico o fisiológico. Un médico experto en la técnica del tratamiento del cáncer será capaz de determinar los protocolos apropiados para la administración efectiva de los compuestos de las realizaciones preferidas. Un ejemplo representativo de un rango de dosificación adecuado es de desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por día, que puede administrarse como dosis única o dividida.

- 35 También se incluye dentro del alcance de la invención un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente, que comprende hacer reaccionar la anilina de fórmula (III) con una cianamida de la fórmula (IV):



en donde A, R₁ y R₁' son como se define en la reivindicación 1.

- 45 Cabe señalar que los procedimientos generales se muestran en lo que respecta a la preparación de compuestos que tienen una estereoquímica no específica. Sin embargo, tales procedimientos son aplicables generalmente a aquellos compuestos de una estereoquímica específica, por ejemplo, donde la estereoquímica en un centro estereogénico es (S) o (R). Además, los compuestos que tienen una estereoquímica (por ejemplo, (R)) a menudo pueden ser utilizados para producir aquellos que tienen la estereoquímica opuesta (es decir, (S)) utilizando métodos bien
- 50 conocidos, por ejemplo, por inversión. Lo mismo se aplica para enantiómeros Z/E.

La expresión "alquilo (C₁-C₆)" como se utiliza en la presente se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada ramificada o lineal con 1 a 6 átomos de carbono. Preferiblemente "alquilo (C₁-C₆)" es un grupo no sustituido seleccionado de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, s butilo y t butilo.

55

La expresión "alcoxi (C₁-C₆)" como se utiliza en la presente se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada ramificada o lineal con 1 a 6 átomos de carbono (es decir grupos alquilo (C₁-C₆) como se definió anteriormente) unido a un átomo de oxígeno, de este modo alquil (C₁-C₆)-O. Preferiblemente "alcoxi (C₁-C₆)" es un grupo insustituído seleccionado de metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, s butoxi, y t butoxi.

5 El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

En toda la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características de la
10 invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención abarca todas las combinaciones posibles de realizaciones
15 particulares y preferidas descritas en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto antiproliferativo de los compuestos (65) y (25) sobre LN229 (A), MDA-MB-231 (B) y F3II (C).
20

Figura 2. Efecto del compuesto (65) sobre el complejo Rac-Tiam.

Figura 3: Ensayo "pull down" de los compuestos (65) y (25) con células de glioblastoma humano LN229. El Western Blot muestra niveles de activación de Rac intracelular a 10 µM.
25

Figura 4: Los niveles de fosforilación de PAK después del tratamiento con el compuesto (65) a diferentes dosis.

Figura 5: Reorganización del citoesqueleto de actina sobre células de glioblastoma humano LN229.

30 Figura 6: Ensayo de migración trans-pocillo con células de glioblastoma humano LN229.

Figura 7: El efecto del compuesto (65) sobre el ciclo celular de células de glioblastoma humano LN229. **p<0,001 ANOVA cont. Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunnett

35 Figura 8: Efecto antiproliferativo de los compuestos (65), (25), (27), (41) y (64) sobre células de glioblastoma humano LN229.

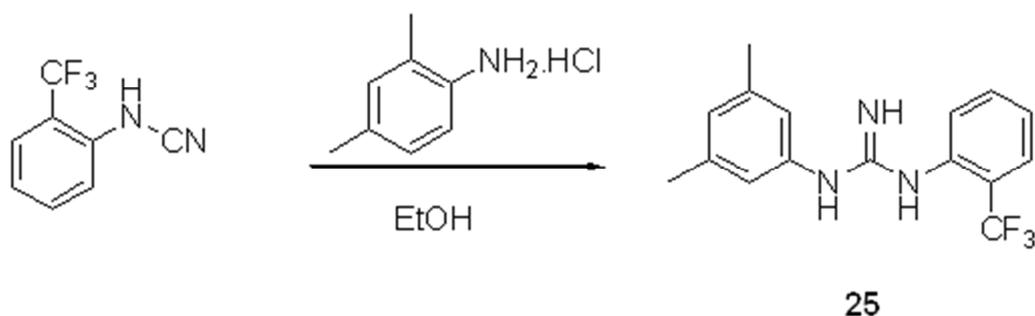
Figura 9: Efecto antimetastásico del compuesto (25) sobre células F3II. Se representan juntos los resultados de tres experimentos independientes. * P < 0,05 Prueba Mann – Whitney.
40

EJEMPLOS

Todos los reactivos estaban disponibles comercialmente. Los puntos de fusión se midieron con un aparato Electrothermal Serie IA9000 (con un gradiente de temperatura de 1°C/minuto) y no fueron corregidos. Las
45 purificaciones por cromatografía se llevaron a cabo en un aparato de cromatografía en columna flash Teledyne Isco CombiFlash Companion equipado con columnas desmontables Rediseq, utilizando mezclas de solventes con polaridad ascendente como fase móvil. Los espectros NMR 1H y 13C fueron registrados en un Bruker ADVANCE DPX-400. El microanálisis se llevó a cabo mediante UNYMFOR (CONICET-FCEyN). Los espectros de masa de baja resolución se registraron en un aparato Shimadzu QP2010. Los espectros IR fueron registrados en un aparato
50 Nicolet Impact 400.

Ejemplo 1. Preparación de N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil) fenil]guanidina (25).

El compuesto del título fue obtenido de acuerdo al siguiente método:
55



Una cantidad equimolar de los compuestos clorhidrato de 3,5-dimetilanilina en solución (126 mg, 0,80 mmol) y N-(2-(trifluorometil) fenil) cianamida (149 mg, 0,80 mmol) en etanol absoluto (2,5 ml) se calentó a reflujo con agitación 5 durante 16 h. Se añadió una solución acuosa de NaOH (0,5 M, 2,2 ml) hasta pH 9. La mezcla fue extraída con diclorometano (3 x 3 ml). Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄ y se filtró. El solvente se evaporó para obtener 225 mg (92% de rendimiento) del compuesto del título. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con un gradiente de hexano:acetato de etilo (1:4 a 0:10) en presencia de 0,01% de trietilamina para obtener 138 mg (56%) de compuesto (25) puro como un sólido blanco, p.f. 127 °C

10

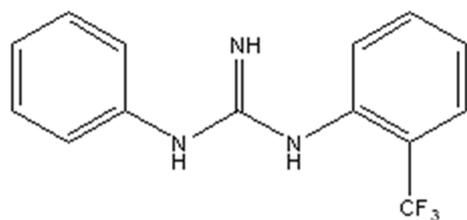
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,63 (d, J = 6,5 Hz, 1 H), 7,44 (m, 1 H), 7,08 (m, 2 H), 6,84 (s, 2 H), 6,77 (s, 1 H), 4,27 (sa, 2 H), 2,28 (s, 6 H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 149,43, 147,59, 139,12, 132,79, 126,90 (q, J = 5 Hz), 125,97, 125,31, 124,39 (q, J = 272 Hz), 123,79 (q, J = 29 Hz), 122,12, 120,36, 21,28. IR (cm⁻¹), 3476, 3372, 1648, 1560, 1516. MS (m/z, intensidad relativa) 307 (M⁺, 23), 238 (M⁺-CF₃, 6), 121 (100). Anal. Calc para C₁₆H₁₆F₃N₃: %C, 62,35; %H, 5,07; %N, 13,24. Encontrado: %C, 62,53; %H, 5,25; %N, 13,67.

15

Los compuestos (27), (41) y (64) fueron preparados de un modo similar haciendo reaccionar la anilina correspondiente con la cianamida correspondiente.

20

N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (27).

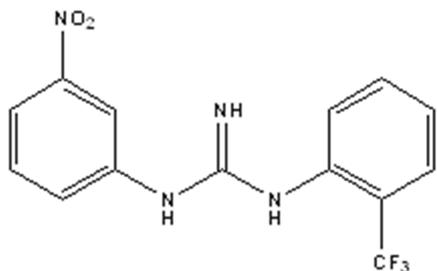


25

Rendimiento: 66%. Sólido blanco, p.f. = 108-109°C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,62 (d, J = 6,5 Hz, 1 H), 7,44 (m, 1 H), 7,30-7,21 (m, 4 H), 7,08 (m, 2 H), 4,92 (sa, 2 H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 149,12, 147,04, 139,40, 132,86, 129,42, 126,94 (q, J = 5 Hz), 125,18, 124,34 (q, J = 272 Hz), 124,23, 123,79 (q, J = 29 Hz), 122,55, 122,37. IR (cm⁻¹), 3379, 1647, 1549, 1318. MS (m/z, intensidad relativa) 279 (M⁺, 26), 210 (M⁺-CF₃, 7), 93 (100). Anal. Calc. para C₁₄H₁₂F₃N₃·0,25H₂O: %C, 59,26; %H, 4,44; %N, 14,81. Encontrado: %C, 59,68; %H, 4,14; %N, 14,42

30

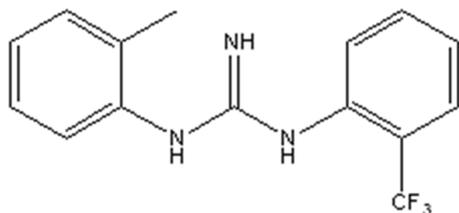
N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41).



35

Rendimiento: 60%. Sólido amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,16 (s, 1 H), 7,87 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 7,70 (m, 1 H), 7,66 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H), 7,50 (t, $J = 7,7$ Hz, 1 H), 7,45 (t, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 7,21-7,14 (m, 2 H), 4,18 (sa, 2 H). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD CDCl_3) δ 148,48, 148,29, 146,28, 142,09, 132,35, 128,96, 126,28 (q, $J = 5$ Hz), 125,25, 124,45, 123,98 (q, $J = 272$ Hz), 123,15 (q, $J = 29$ Hz), 122,02, 115,98, 113,96. IR (cm^{-1}) 3437, 3336, 1656, 1520, 5 1318, 1105. MS (m/z , intensidad relativa) 324 (M^+ , 75), 255 ($\text{M}^+ - \text{CF}_3$, 48), 138 (100)

N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64).

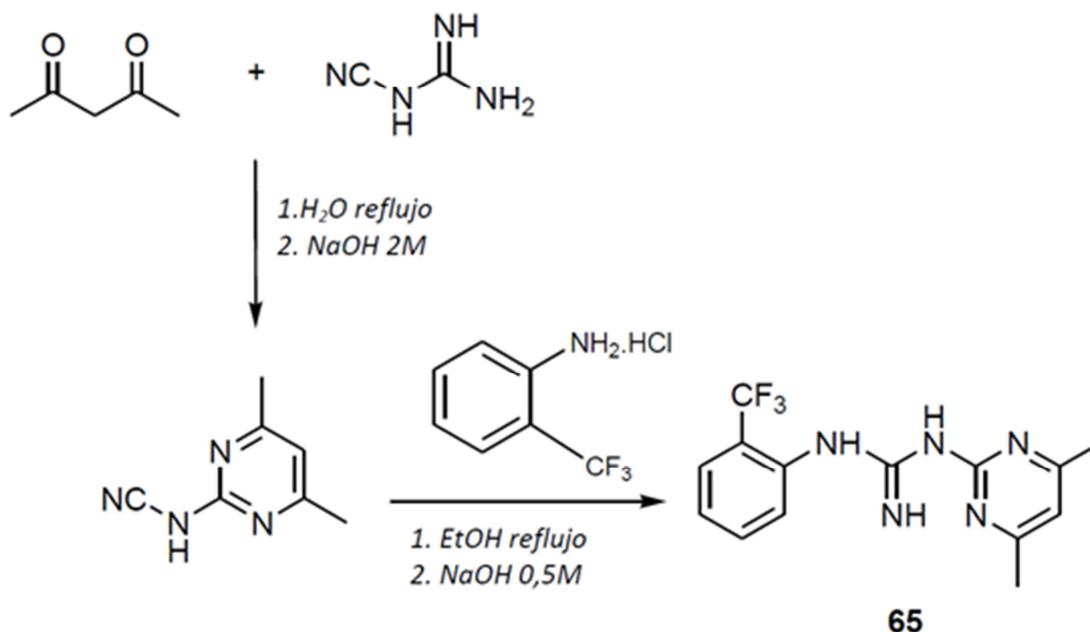


10

Rendimiento: 87%. Sólido blanco, p.f. = 129 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,84 (d, $J = 7,9$ Hz, 0,5 H), 7,62 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 7,9$ Hz, 0,5 H), 7,48 (m, 1,5 H), 7,33 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,23-7,10 (m, 3,5 H), 4,34 (sa, 2 H), 2,29 (s, 3 H). ^{13}C RMN (100 MHz, CD_3OD - CDCl_3) δ 158,08, 151,61, 146,84, 137,71, 136,55, 134,10, 133,18, 132,83, 131,26, 127,12, 127,06 (q, $J = 5$ Hz), 126,44, 126,32, 124,61 (q, $J = 29$ Hz), 124,60 (q, $J = 272$ Hz), 124,31, 15 123,06, 17,52. IR (cm^{-1}), 3438, 3409, 1645, 1592, 1316. MS (m/z , intensidad relativa) 293 (M^+ , 35), 224 ($\text{M}^+ - \text{CF}_3$, 6), 107 (100).

*Se listan señales de dos confórmers.

20 La preparación de N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (65) fue llevada a cabo siguiendo el método descrito en Chin. J. Chem. 2008, 14811.

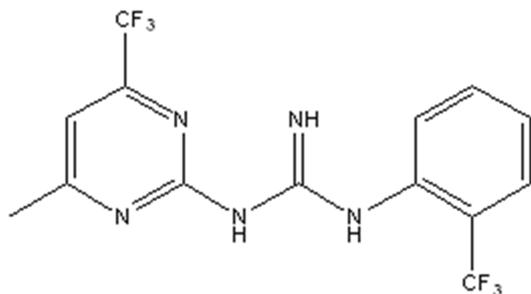


25 Cianoguanidina (10 g, 0,12 mol), acetilacetona (17,2 ml, 0,17 mol) fueron tratados con NaOH 2 M (5,7 ml) en agua (74 ml). La mezcla de reacción fue agitada a 100° C durante 18 hs. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y luego a 0°C bajo agitación durante 2 hs. El sólido cristalizado se recogió y se secó a 50°C para dar 14,2 g de un sólido de color rosa. El sólido crudo se recrystalizó en etanol para dar 10,2 g (58% de rendimiento) de N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)cianamida como un sólido blanco: p.f. 230-231°C, (lit1. 230-231°C), ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)
 30 □ 6,43 (s, 1H), 4,36 (bs, 1H), 3,26 (s, 6H). Se hizo reaccionar este intermediario con una cantidad equimolar de clorhidrato de 2-(trifluorometil)anilina (13,6 g, 69,12 mmol) refluendo la mezcla en etanol (150 ml) durante 20 h. Se dejó que la mezcla alcance la temperatura ambiente y el pH se ajustó a 12-13 mediante la adición de solución acuosa 0,5 M de NaOH (45 ml). Se recogió el sólido obtenido y se recrystalizó a partir de etanol:agua (1:1) para dar

5,4 g del compuesto 65 puro como un sólido cristalino blanco: p.f. = 161-162°C (lit1. 149-151°C) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,63 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,45 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,08 (m, 2 H), 6,57 (s, 1 H), 2,35 (s, 6 H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 149,43, 147,59, 139,12, 132,79, 126,90 (q, J = 5 Hz), 125,97, 125,31, 124,39 (q, J = 272 Hz), 123,79 (q, J = 29 Hz), 122,12, 120,36, 21,28. IR (cm⁻¹): 3443, 3213, 1662. HRMS (ESI) calculado para C₁₄H₁₅F₃N₅ (MH⁺): 310,1274, encontrado: 310,1265. Anal. Calc. para C₁₄H₁₅F₃N₅·0,2H₂O: % C, 53,74; % H, 4,64; % N, 22,38. Encontrado: % C, 54,03; % H, 4,57; % N, 21,98.

1-(4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il)-3-(2-trifluorometil)fenil)guanidina (10):

10



Este compuesto fue preparado siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto (65) empleando 1,1,1-trifluoro-2,4-pentanodiona en lugar de 2,4-pentanodiona (Chin. J. Chem. 2008, 1481). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (d, J = 6,5 Hz, 1 H), 7,51 (t, J = 7,7 Hz, 1 H), 7,19 (m, 2 H), 6,96 (s, 1 H), 2,43 (s, 3 H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 171,23, 60,05, 155,21, 150,63, 146,03, 132,79, 126,97 (q, J = 5 Hz), 125,52, 123,96 (q, J = 272 Hz), 123,21 (m), 120,30 (q, J = 275 Hz), 108,48, 24,30. IR (cm⁻¹) 3492, 3311, 1668, 1557, 1316. MS (m/z, intensidad relativa) 363 (M⁺, 91), 362 (M⁺-H, 100), 294 (M⁺-CF₃, 92). Anal. Elemental Calc. para C₁₄H₁₁F₆N₅: %C, 46,29, %H, 3,05, %N, 19,27. Encontrado: %C, 46,32, %H, 3,04, %N, 18,98.

Ejemplo 2. Ensayo de proliferación

Se mantuvieron las células en cultivo en monocapa con los medios correspondientes, suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado con calor, glutamina 2 mM y gentamicina, 80 mg/ml.

Las células fueron tratadas durante 72 horas en presencia de FBS al 10% con diferentes dosis de los compuestos en 96 pocillos a una densidad de 2500 células/pocillo. El crecimiento de células se estimó mediante la prueba de MTT, por el cual a las monocapas de células se añadió MTT, se incubaron y se resuspendieron en DMSO. Por último, el número de células se estimó mediante la medición de los valores de absorbancia a 570 nm.

30

El compuesto (65) como un ejemplo representativo de compuestos inhibidores de Rac1 de acuerdo a con la presente invención fue probado en ensayos de proliferación celular realizados con las siguientes líneas celulares de cáncer F3II (carcinoma mamario murino), 3LL (carcinoma de pulmón murino), LN229 (glioblastoma humano), MCF7 (carcinoma mamario humano), H125 (carcinoma de pulmón humano), PC3 (adenocarcinoma de próstata humano) y MDA-MB-231 (carcinoma mamario humano).

Se midió el nivel de proliferación a las 72 horas (h) después de la inducción in vitro del compuesto (65) a diferentes concentraciones (200 μM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, y 1 μM) en presencia de 10% de suero fetal bovino (FBS) con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀). La concentración que produce 50% de inhibición (CI₅₀) se determinó mediante la función de regresión no lineal de GraphPad Prism5®. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres experimentos separados. Los valores de CI₅₀ se representan en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores CI₅₀ (μM) de los compuestos (65) ensayados en células F3II, MCF7, 3LL, H125, LN229, PC3 y MDA-MB-231

	F3II	MCF7	3LL	H125	LN229	PC3	MDA-MB-231
(65)	61	44	68	127	73	138	48

También fueron ensayados otros compuestos de fórmula I en células LN229. Los valores CI₅₀ (μM) obtenidos se muestran en la Tabla 2.

50

Tabla 2. Valores CI50 (μM) de los compuestos (25), (27), (41) y (64) ensayados en células LN229.

	Comp (25)	Comp (27)	Comp (41)	Comp (64)
CI ₅₀ (μM)	73	211	88	175

Se ensayó también el compuesto (25) en células F3II y MDA-MB-231. Los valores de CI50 (μM) obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores CI50 (μM) del compuesto (25) ensayados en células F3II y MDA-MB-231.

	F3II	MDA-MB-231
(25)	36	40

10 La Fig. 1 muestra las curvas de respuesta a dosis de los compuestos (65) y (25) sobre la capacidad proliferativa de tres líneas celulares de cáncer: (A) F3II (carcinoma mamario murino), (B) LN229 (glioblastoma humano), (C) MDA-MB-231 (carcinoma mamario humano).

Ejemplo 3. Inhibición de los niveles de activación de Rac1 (pull-down)

15

Este ensayo consiste en la determinación del poder de inhibición de los compuestos de la invención sobre los niveles de Rac1 activo intracelular (Rac-GTP). Para determinar los niveles de Rac-GTP, se utilizó el ensayo de "Pull-Down", el cual se basa en la unión de conformación de Rac-GTP al dominio p21 de la proteína PAK1, que es el efector directo de Rac-GTP (Wanf H. et al.; J. Biol. Che. 2002, 277: 4541-4550).

20

Se ensayaron los compuestos (65) y (25) a fin de determinar su potencia de inhibición sobre la interacción Rac-Tiam. Así, la afinidad de precipitación de Tiam con la proteína recombinante GST-Rac fue evaluada en presencia del compuesto (65). La Figura 2 muestra el efecto del compuesto (65) sobre el complejo Rac-Tiam. Se muestra la disminución de la interacción de Rac con el activador en presencia del compuesto (65) en un Western Blot anti

25 Tiam1 vs. control.

El efecto inhibitorio de los compuestos (25) y (65) sobre los niveles de Rac activo intracelular fueron evaluados (Rac-GTP) mediante el ensayo "Pull-Down".

30 Se sembraron células LN229 (glioblastoma humano) en placas de cultivo de células de 6 pocillos y se mantuvieron en ausencia de FBS durante 48 horas (inanición). A continuación, se trataron con los compuestos (25) y (65) y se estimularon durante 15 minutos con EGF (100 ng/ml), se lavaron con solución salina tamponada de fosfato (PBS) a baja temperatura y se lisaron en un buffer conteniendo 8 μg de la proteína de fusión GST-PBD, Tris-HCl 20 nM, pH 7,5, DTT 1 nM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,5%, β -glicerofosfato 5 mM e inhibidores de proteasa (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilo, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina A). Los lisados fueron centrifugados a 14.000 xg (4°C, 10 min) y luego se incubaron con Glutation-Agarose Beads (GAB, Amersham Pharmacia) previamente adecuadas con GST-Pak a 4°C durante 1 h. Después del lavado, se hirvieron las GABs durante 5 minutos en buffer de carga. Se separaron las muestras en un gel de SDS-poliacrilamida 12% y se electrotransfirieron a una membrana PVDF para su ulterior análisis "Western Blot" utilizando un anticuerpo anti-Rac1 (Sigma). Los niveles totales de Rac fueron analizados de un modo similar a partir de alícuotas tomadas del lisado celular.

40

La Figura 3 muestra el efecto inhibitorio de los compuestos (25) y (65) sobre los niveles de Rac activo intracelular a 10 μM .

45

A continuación se evaluó el efecto del compuesto (65) sobre la activación de PAK1. Se trataron las células en estado de inanición de 48 horas con el compuesto (65) durante 1 hora y se activaron con EGF 100 ng/ml. La Figura 4 muestra la disminución de la fosforilación de PAK con el aumento de la concentración del compuesto (65).

50 Fue evaluado el efecto del compuesto (65) sobre la polimerización de los filamentos de actina mediante inmunofluorescencia con faloidina conjugado con el fluorocromo AlexaFluor (Invitrogen). Las células de glioblastoma humano LN229 fueron mantenidas en estado de inanición durante 24 horas, se trataron con el compuesto (65) durante 1 hora, y se estimularon con EGF. Como se esperaba, EGF indujo la polimerización de los filamentos de actina en las células no tratadas, mientras que las células tratadas con el compuesto (65) mostraron una disminución de los niveles de actina fibrilar intracelular e indicios difusos en el citoplasma celular (Figura 5). Un indicio preciso de límites celulares es observado en todas las células debido a la señal de actina cortical.

55

Ejemplo 4. Efecto de antimigración

La movilidad celular es un proceso clave en los procesos de invasión y metástasis tumoral y es regulada estrechamente por la familia de las Rho-GTPasas, particularmente por Rac.

5 Este ensayo consiste en la determinación del efecto antimigración del compuesto (65) sobre las células de glioblastoma humano LN229.

La migración de las células in vitro se midió por el ensayo de migración de trans-pocillo, en el que células LN229 previamente tratadas con diferentes concentraciones (10 μ M, 50 μ M y 100 μ M) del compuesto (65) y suero empobrecido fueron colocados sobre la capa superior de una membrana celular permeable de una placa trans-pocillo. Después de un período de incubación de 24 horas, las células migraron a través de los poros de 8 μ m de la membrana a la capa inferior.

La Figura 6 muestra que todos los tratamientos disminuyeron significativamente la migración celular de un modo 15 dependiente de la dosis.

Ejemplo 5. Efecto sobre el ciclo celular

Se estudió el efecto del compuesto (65) sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo.

20 Se sabe que la GTPasa Rac1 está relacionada con la transcripción de moléculas tales como cyclin D1, las que se requiere que progresen de la fase G1 a la fase S. La inhibición de Rac1 induce la detención celular en la fase G0-G1.

Las células LN229 sincronizadas en fase G0-G1 y estimuladas durante 24 horas con FBS fueron tratadas con el 25 compuesto (65). La Figura 7 muestra que en presencia de 50 μ M de compuesto (65), 60% de la población de células está en la fase G0-G1, mientras que los controles muestran sólo 25% de la población celular en esta fase. Por lo tanto, se demuestra que el compuesto (65) detiene las células tumorales en la fase G0-G1 de una manera dependiente de la dosis.

30 Ejemplo 6. Ensayo antiproliferativo

Se ensayó el efecto antiproliferativo de los compuestos (65), (25), (27), (41) y (64) sobre las células de glioblastoma humano LN229 (Figura 8).

35 Las células se mantuvieron en cultivo en monocapa con los medios correspondientes, suplementado con 5% suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado con calor, glutamina 2 mM y 80 mg/ml de gentamicina.

Se trataron las células durante 72 horas en presencia de FBS 10% con diferentes dosis de los compuestos en 96 pocillos a una densidad de 2500 células/pocillo. Se estimó el crecimiento celular mediante la prueba de MTT, por el 40 cual a las monocapas de células se añadió MTT, se incubaron y se resuspendieron en DMSO. Por último, el número de células se estimó mediante la medición de los valores de absorbancia a 570 nm.

Ejemplo 7. Efecto Antimetastásico del compuesto (25) sobre células de carcinoma mamario F3II.

45 Se utilizaron ratones endogámicos hembra BALB/c de la UNLP (Buenos Aires, Argentina) libres de patógenos específicos, con una edad de 8-10 semanas y un peso promedio de 20 g. Ellos fueron alojados en jaulas de plástico en condiciones estándar y con acceso a comida para roedores y agua ad libitum. En el día designado 0 del experimento, se inyectaron células de carcinoma mamario F3II en la vena lateral de la cola de ratones no anestesiados en una concentración de 2×10^5 células viables/0,3 ml de DMEM/ratón. Al día 21, los animales fueron 50 sacrificados por dislocación cervical y se practicó la necropsia. Para investigar la presencia de metástasis pulmonar, se retiraron los pulmones, se fijaron en solución de Bouin y se determinó el número de nódulos superficiales bajo un microscopio de disección.

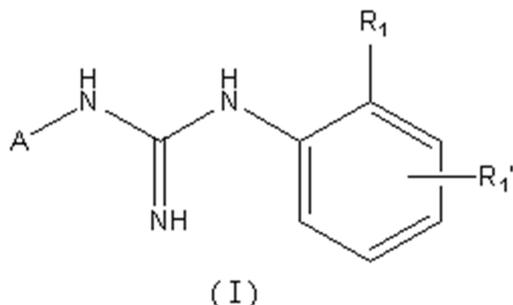
Para estudiar el efecto del compuesto (25) en la colonización de pulmón metastásico, los ratones se inyectaron ip en 55 dosis diarias de 25 mg/kg de peso corporal desde el día 0 al 21. Los resultados se presentan en la Figura 9. El tratamiento diario de ratones con compuesto (25) a (25mg/kg/día) redujo significativamente en un 35% la formación de colonias pulmonares metastásicas.

Como era de esperar, el compuesto (25) fue bien tolerado en hembras adultas de ratones BALB/c. En todos los 60 casos, el tratamiento no provocó cambios significativos en el peso del animal cuando se comparó con el grupo control.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)

5



o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas en donde:

10 R_1 y R_1' están seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_4), CF_3 , F, Cl, Br, I, CN, OH, NH_2 , $-OCH_3$, y NO_2 ; con la condición de que al menos uno de R_1 y R_1' son distintos de H;

A es un radical seleccionado de alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado o uno de un sistema conocido de anillos carbocíclico o heterocíclico con 1-2 anillos, en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH_2 , NH; es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

15 estando A sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, halógeno, nitro, ciano, alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, haloalquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_6) lineal o ramificado, $-OR_2$, $-COR_2$, $-COOR_2$, $-OC(O)R_2$, $-C(O)NR_3R_4$, $-NR_3R_4$, $-R_5NHR_6$, $-SR_2$, $-SOR_2$, $-SO_2R_2$, y $-SO_2NR_3R_4$; en donde

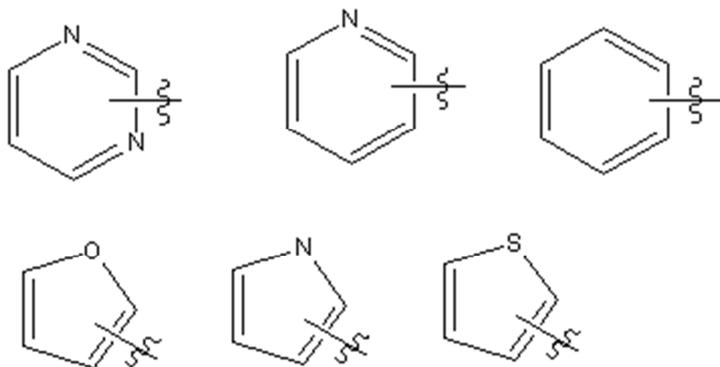
20 cada R_2 representa independientemente H o alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado, cada R_3 representa independientemente H o alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado,

cada R_4 representa independientemente H, alquilo (C_1-C_6) lineal o ramificado, fenilo, piridina o quinolina; en donde el sistema de anillo fenilo, piridina y quinolina está sustituido por uno o más radicales seleccionados de H, alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado, y NH_2 ;

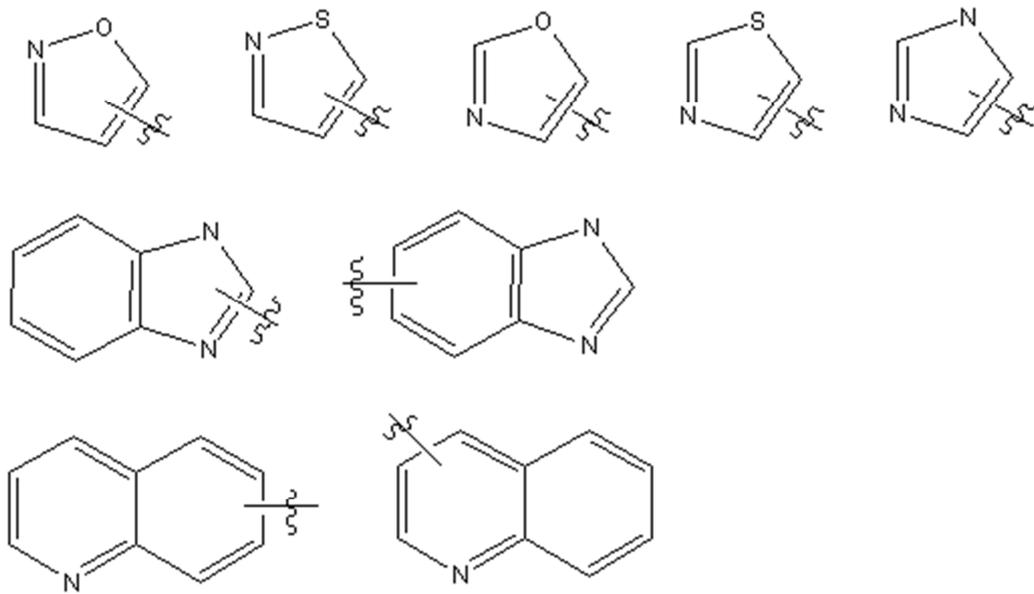
R_5 y R_6 están independientemente seleccionados de H, alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado,

25 para uso en el tratamiento de una afección mediada por proteínas celulares Rho-GTPasa, en donde la proteína celular Rho-GTPasa es Rac1 y la afección es un trastorno proliferativo seleccionado del grupo que consiste en precancerosis; displasia; metaplasia; carcinomas del tracto gastrointestinal o colorectal, hígado, páncreas, riñón, vejiga, próstata, endometrio, ovario, testículos, melanoma, mucosa oral displásica, cánceres orales invasivos, carcinoma pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, cánceres de mama hormona-dependientes, 30 cánceres de mama hormona-independientes, cánceres de células escamosas y transicionales, tumores malignos neurológicos, incluyendo neuroblastoma, gliomas, glioblastomas, astrocitomas, osteosarcomas, sarcomas de tejidos blandos, hemangiomas, tumores endocrinológicos, neoplasias hematológicas incluyendo leucemias, linfomas, y otras enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas, carcinomas in situ, lesiones hiperplásicas, adenomas, fibromas, histiocitosis, enfermedades proliferativas crónicas inflamatorias, enfermedades proliferativas vasculares y 35 enfermedades proliferativas inducidas por virus, enfermedades de la piel caracterizadas por hiperproliferación de queratinocitos y/o células T.

2. El compuesto para el uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde A es un sistema de anillos seleccionado de

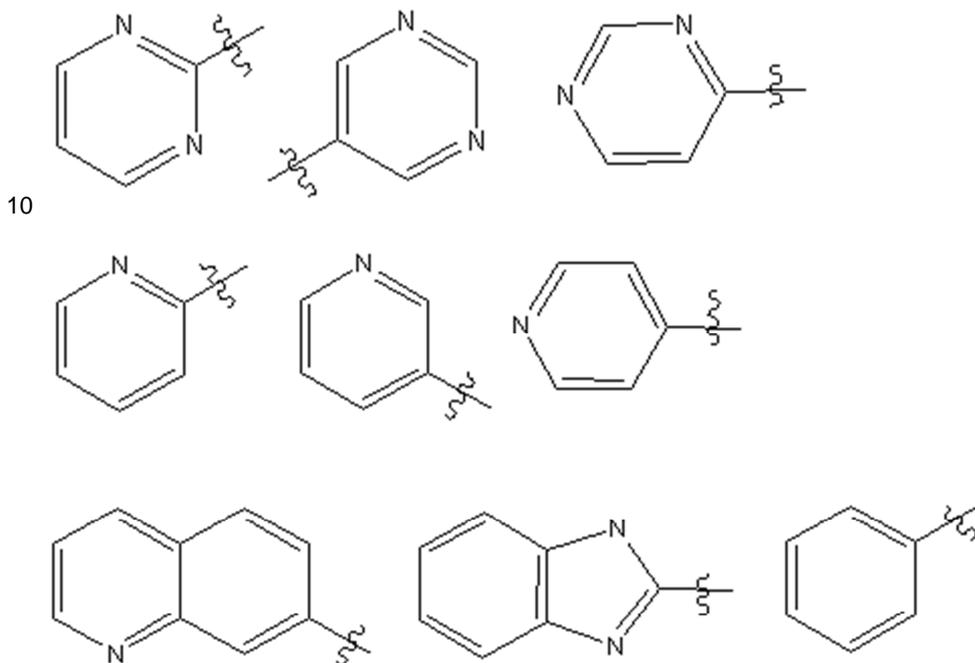


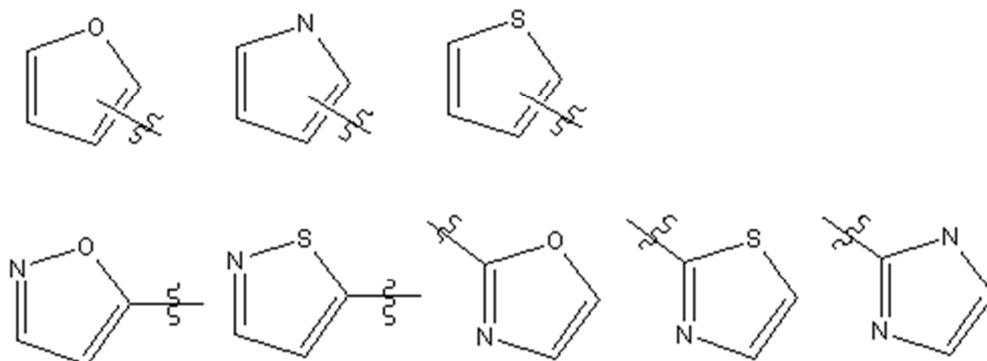
40



estando A sustituido por uno o más radicales como se define en la reivindicación 1, y en donde las líneas ondeadas 5 significan el punto de unión del anillo al nitrógeno adyacente.

3. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde A es un sistema de anillos seleccionado de

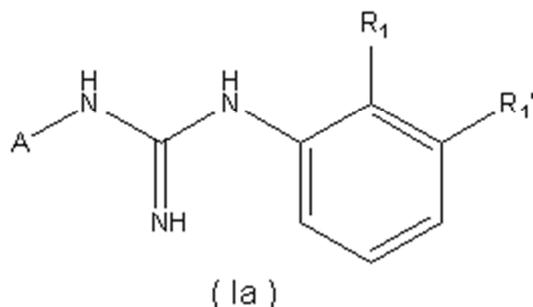




estando A sustituido por uno o más radicales como se define en la reivindicación 1, y en donde las líneas ondeadas 5 significan el punto de unión del anillo al nitrógeno adyacente.

4. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el sistema de anillos A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alquenilo (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂.

5. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque tiene la siguiente fórmula general la



o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o mezclas de las mismas;

en donde R₁ y R₁' están independientemente seleccionados de H, CF₃, NH₂, metilo, etilo, F, Cl, Br, I, y OH; con la condición de que cuándo R₁ es H entonces R₁' es diferente de H, y viceversa; A es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4..

6. El compuesto para el uso de acuerdo a la reivindicación 5, en donde A es un radical de uno de los sistemas de anillos heterocíclicos conocidos con 1-2 anillos,

en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos

tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH₂, NH;

es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF₃, CH₂CF₃, alquenilo (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂.

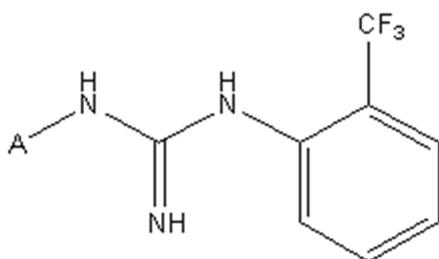
7. El compuesto para el uso de acuerdo a la reivindicación 5, en donde A es un radical fenilo sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, CF₃, CH₂CF₃, alquenilo (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂.

8. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde R₁ es CF₃ y R₁' es H.
9. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el cual se selecciona de N-pirimidin-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (1);
- 5 N-(4-etil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (2);
N-(4-metil-6-propilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (3);
N-(4-isopropil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (4);
N-(4-butil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (5);
N-(4-tert-butil-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (6);
- 10 N-(4,6-diaminopirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (7);
N-(4,6-dicloropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (8);
N-(4,6-difluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (9);
N-[4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (10);
N-(4-ciano-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (11);
- 15 N-(5-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (12);
N-(4-cloro-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (13);
N-(4-fluoro-6-metilpirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (14);
N-(4-fluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (15);
N-(5-fluoropirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (16);
- 20 N-[4,6-bis(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (17);
N-(4,6-dicianopirimidin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (18);
N-piridin-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (19);
N-piridin-3-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (20);
N-piridin-4-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (21);
- 25 N-pirimidin-4-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (22);
N-pirimidin-5-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (23);
N-(4,6-dimetilpiridin-2-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (24);
N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (25);
N-(2,6-dimetilpiridin-4-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (26);
- 30 N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (27);
2-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dimetilbencenesulfonamida (28);
2-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dietilbencenesulfonamida (29);
2-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dipropilbencenesulfonamida (30);
2-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dibutilbencenesulfonamida (31);
- 35 3-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dimetilbencenesulfonamida (32);
3-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dietilbencenesulfonamida (33);
3-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dipropilbencenesulfonamida (34);
3-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dibutilbencenesulfonamida (35);
4-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dimetilbencenesulfonamida (36);
- 40 4-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dietilbencenesulfonamida (37);
4-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dipropilbencenesulfonamida (38);
4-[(imino{[2-(trifluorometil)fenil]amino}metil)amino]-N,N-dibutilbencenesulfonamida (39);
N-(2-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (40);
N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41);
- 45 N-(4-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (42);
N-2-tienil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (43);
N-3-tienil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (44);
N-1H-pirrol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (45);
N-1H-pirrol-3-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (46);
- 50 N-2-furil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (47);
N-3-furil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (48);
N-1,3-oxazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (49);
N-1,3-tiazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (50);
N-1H-imidazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (51);
- 55 N-isoxazol-5-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (52);
N-1H-bencimidazol-2-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (53);
N-(3,4-dimetilisoxazol-5-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (54);
N-(2-aminofenil)-N'-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)guanidina (55);
N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-N'-(3-etilfenil)guanidina (56);
- 60 1-(4-(4-amino-2-metilquinolin-7-ilamino)pirimidin-2-il)-3-(2-(trifluorometil)fenil)guanidina (57);
N-(4-amino-2-metilquinolin-7-il)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (58);
N-quinolin-7-il-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (59);
N-metil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (60);

- N-etil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (61);
 N-propil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (62);
 N-butil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (63);
 N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64); y
 5 N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (65).

10. El compuesto para el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el cual se selecciona de
 N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (65),
 N-(3,5-dimetilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (25),
 10 N-fenil-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (27),
 N-(3-nitrofenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (41),
 N-[4-metil-6-(trifluorometil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (10) y
 N-(2-metilfenil)-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina (64)).

- 15 11. Un compuesto de fórmula (II)



(II)

o una sal del mismo, o cualquiera de sus formas estereoisoméricas o una mezcla de las mismas en donde:

A es un radical de uno de los sistemas de anillos carbocíclicos o heterocíclicos conocidos con 1-2 anillos,

- 20 en donde cada uno de los anillos que forman el sistema de anillos

tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH₂, NH;

es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH,

- 25 -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂;

con la condición de que el compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[(4-metil)pirimidin-2-

- 30 il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina.

12. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, en donde A es un radical fenilo sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-

- 35 -butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂ y -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂.

13. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 11, en donde A es un sistema de anillos heterocíclicos con 1-2

- 40 anillos, en donde cada uno de los anillos que forma el sistema de anillos

tiene 5-7 miembros, cada miembro independientemente seleccionado de C, N, O, S, CH, CH₂, NH;

es saturado, parcialmente insaturado o aromático;

en donde A está sustituido por uno o más radicales seleccionados del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, nitro, ciano, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-

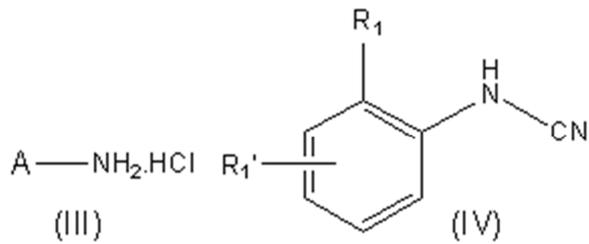
- 45 -butilo, t-butilo, -CF₃, -CH₂CF₃, alqueno (C₂-C₆) lineal o ramificado, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COH, -COCH₃, -COOH, -COOCH₃, -COOCH₂CH₃, -OC(O)H, -OC(O)CH₃, -C(O)NH₂, -NH₂, -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -SH₂, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -SO₂NH₂, -SO₂NHCH₃, -SO₂NHCH₂CH₃, -SO₂N(CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂CH₃)₂, -SO₂N(CH₂CH₂(CH₃)₂)₂,

con la condición de que el compuesto es distinto de N-(4-metil-6-hidroxi-pirimidin-2-il)-N'-(2-trifluorometilfenil)guanidina, N-[4,6-bis(metil)pirimidin-2-il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina o N-[(4-metil)pirimidin-2-

- 50 il]-N'-[2-(trifluorometil)fenil]guanidina.

14. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula II como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

15. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula II como se define en la reivindicación 11, el cual comprende hacer reaccionar la anilina de fórmula (III) con una cianamida de fórmula (IV):



en donde A, R₁ y R₁' son como se define en la reivindicación 1.

10

15

20

25

30

35

Fig. 1

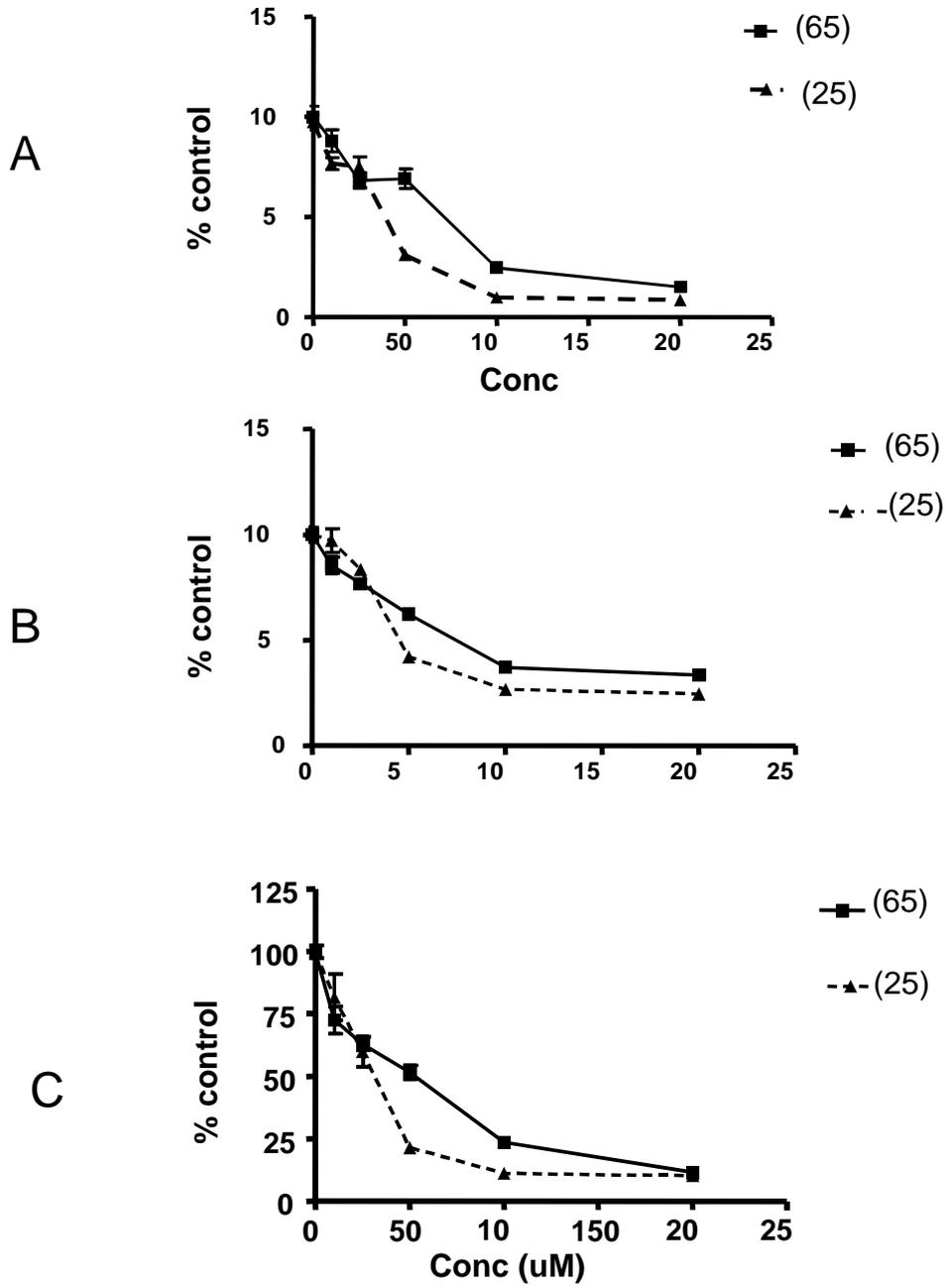


Fig. 2

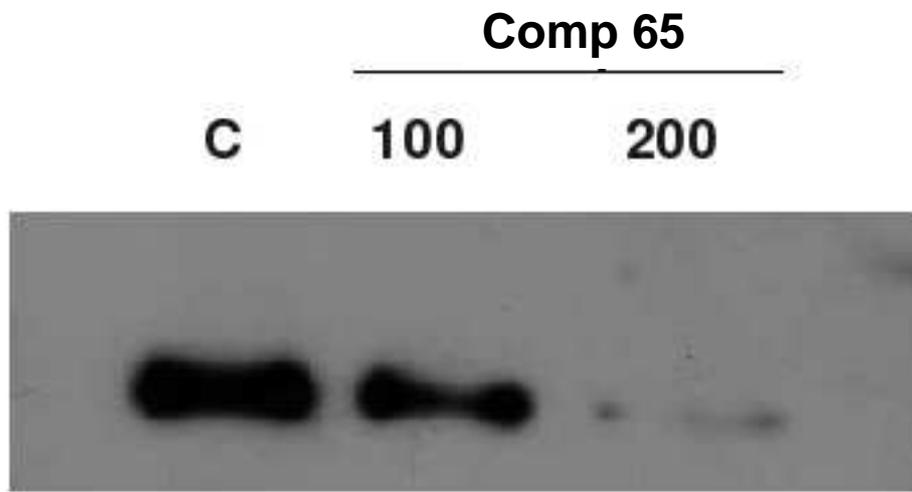


Fig. 3

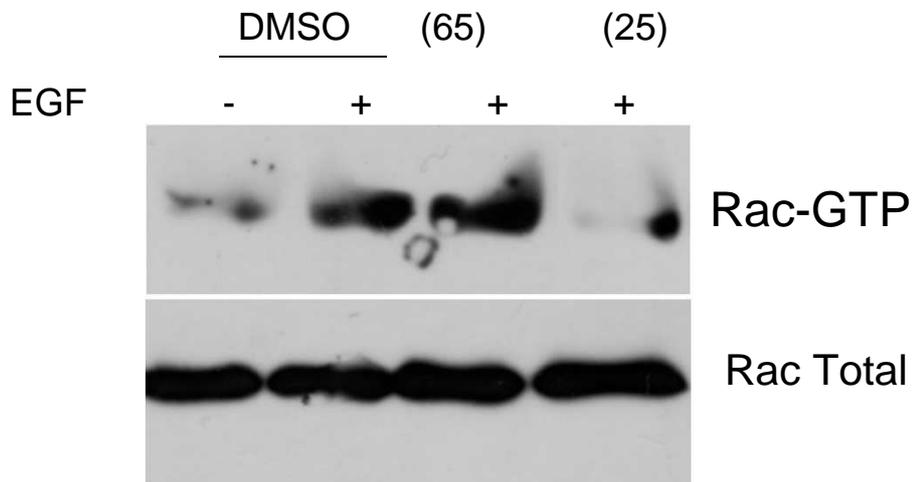


Fig 4

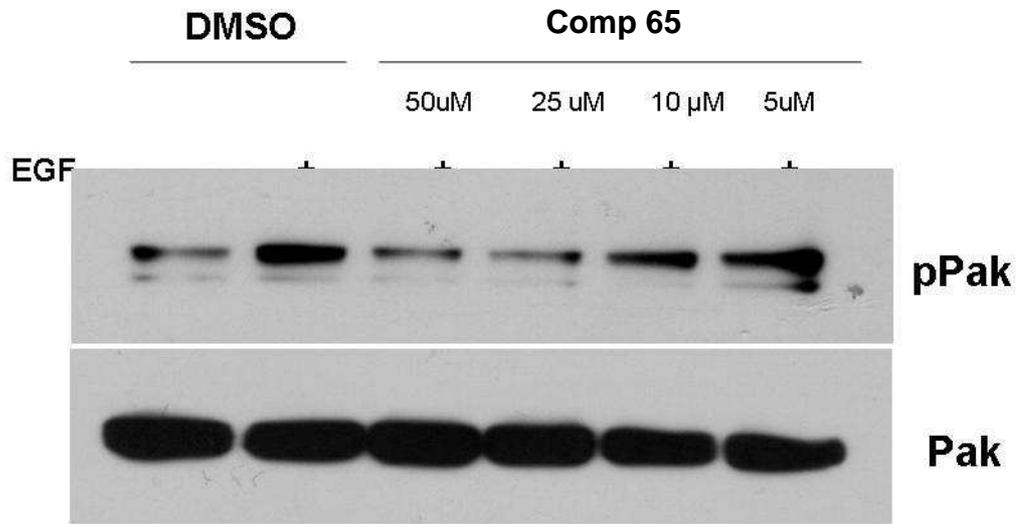


Fig. 5

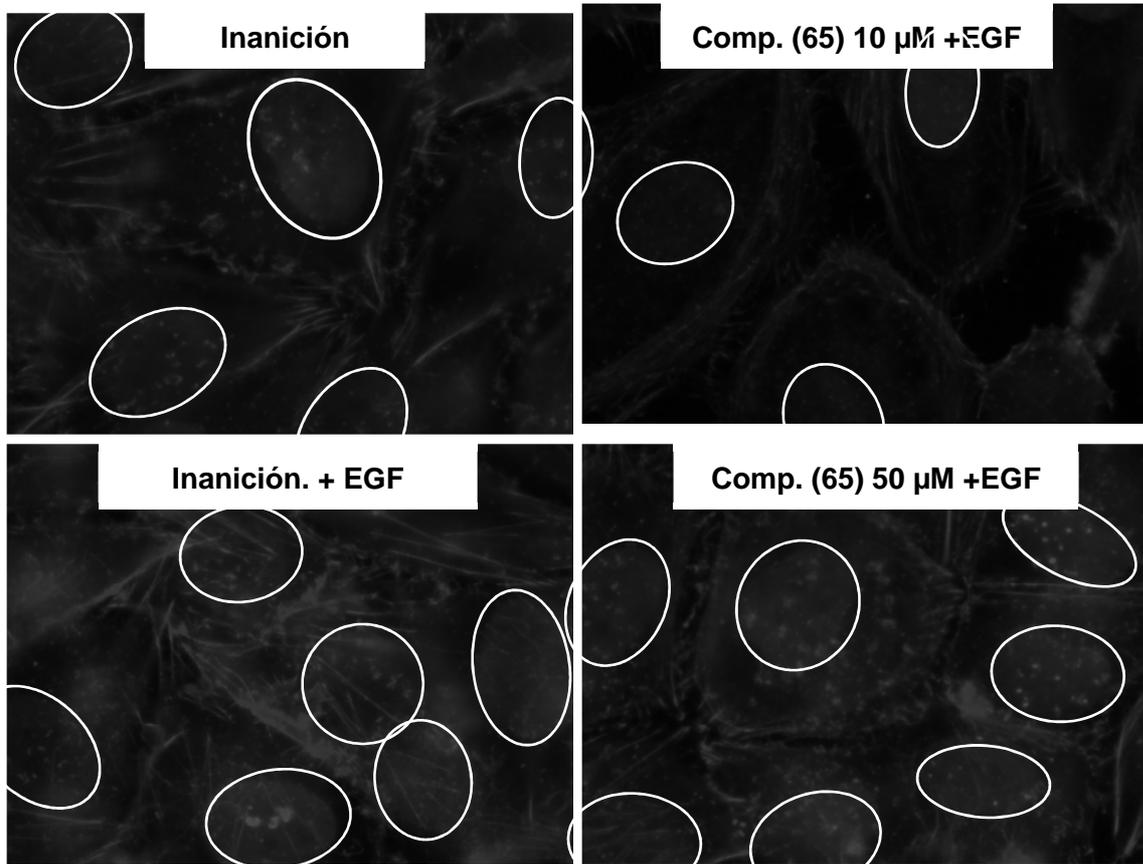


Fig. 6

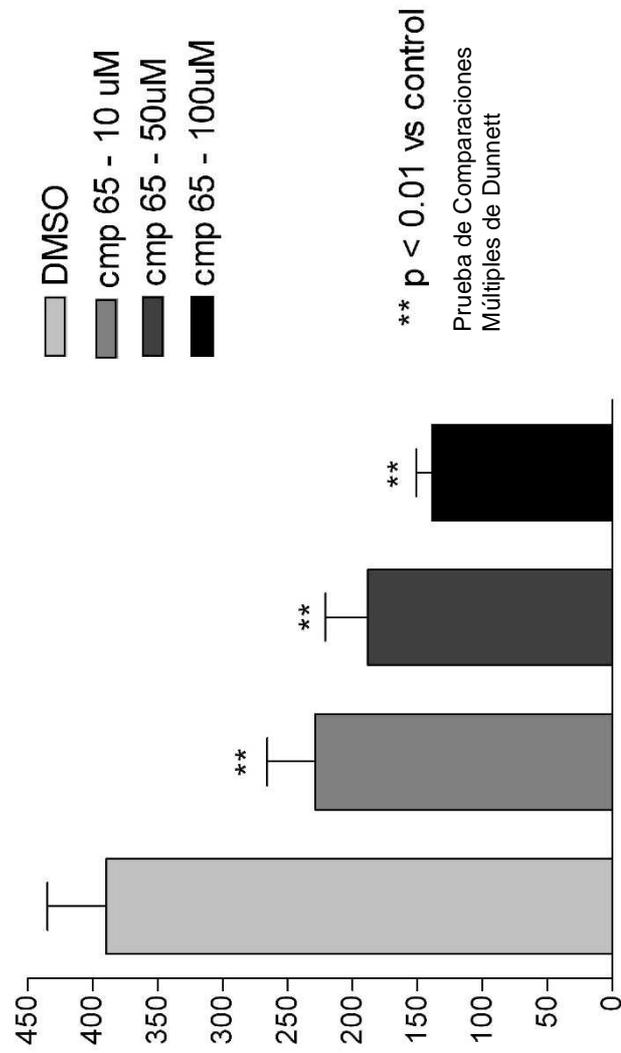


Fig. 7

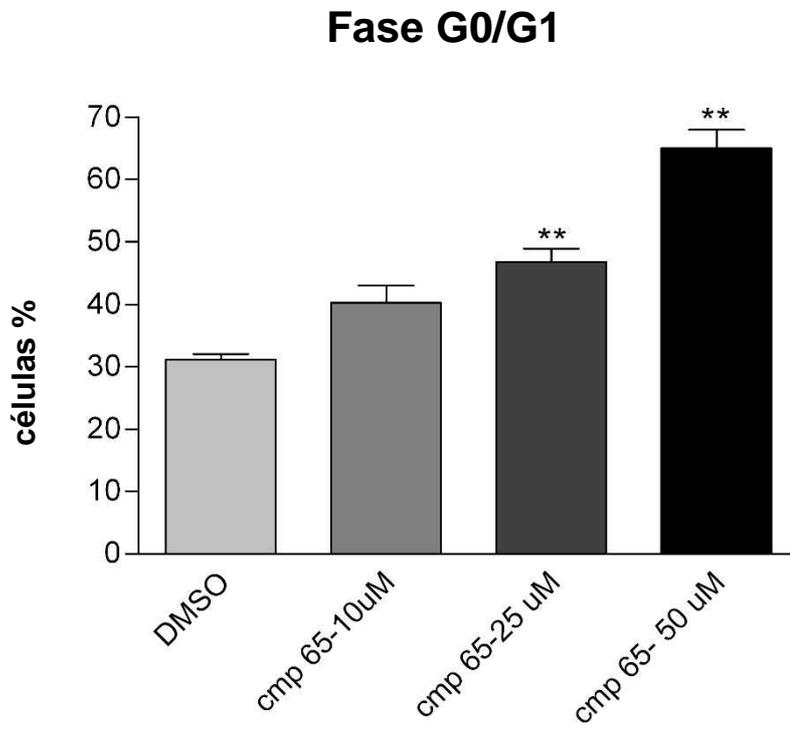


Fig. 8

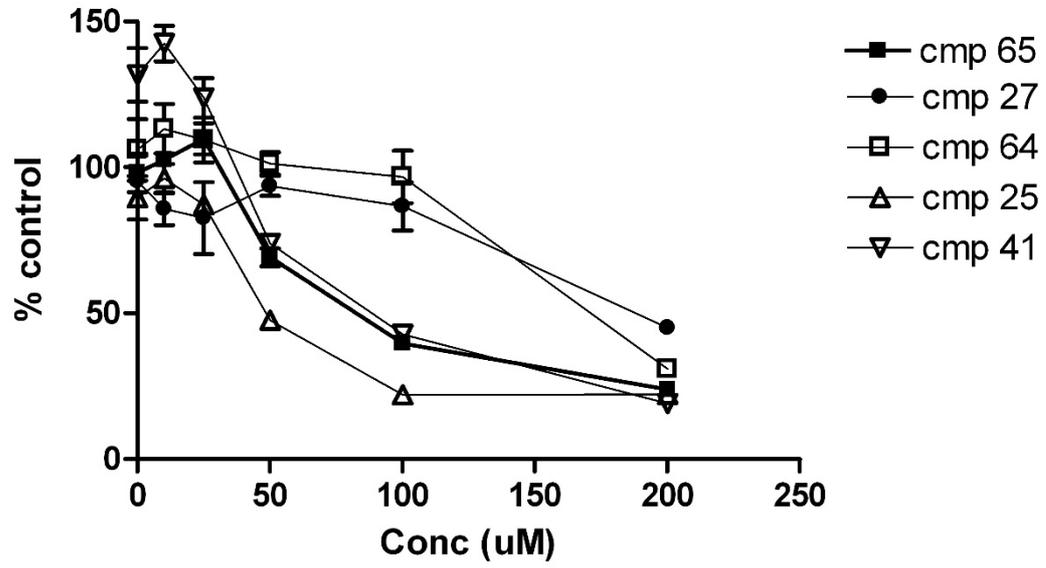
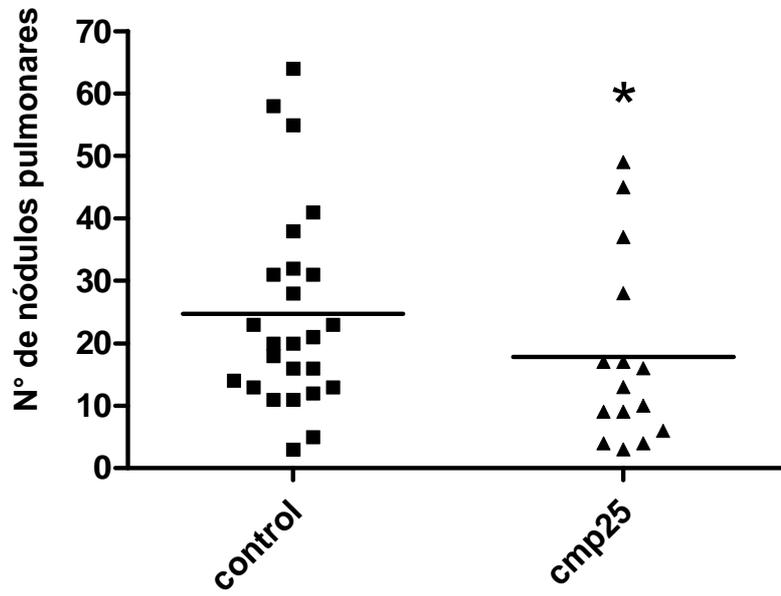


Fig. 9



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 10 • **S. SPERL.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, vol. 97 10 [0006]
• Chinese Journal of Chemistry, 2008, vol. 26 (8) 1481-1485 [0007]
• Chin. J. Chem. 2008, 1481 [0076] [0079]
• **WANF H. et al.** J. Biol. Chem. 2002, vol. 277, 4541-4550 [0087]