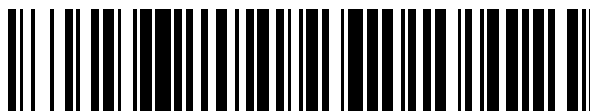


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 459**

51 Int. Cl.:

A61K 31/63 (2006.01)

A61K 31/18 (2006.01)

C07C 311/47 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2011** **PCT/CA2011/000727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012** **WO12021963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011** **E 11817596 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2590938**

54 Título: **Compuestos novedosos de sulfonamida para la inhibición del crecimiento de tumores metastásicos**

30 Prioridad:

09.07.2010 US 363196 P

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**WELICHEM BIOTECH INC. (100.0%)
316-4475 Wayburne Drive, Burnaby
British Columbia V5G 3L1, CA**

72 Inventor/es:

**SUPURAN, CLAUDIU;
DEDHAR, SHOUKAT;
MCDONALD, PAUL, C. y
CARTA, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 459 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

Compuestos novedosos de sulfonamida para la inhibición del crecimiento de tumores metastásicos

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los compuestos novedosos de sulfonamida, en particular para el uso como inhibidores de la anhidrasa carbónica IX y XII, en el tratamiento del cáncer hipóxico y metastásico, y el agotamiento de células madre del cáncer en mamíferos.

Descripción de la técnica relacionada

Dieciséis isoformas diferentes de anhidrasa carbónica- α (AC) han sido aisladas y caracterizadas en mamíferos, donde cumplen importantes funciones fisiológicas. Algunas de ellas son citosólicas (ACI, ACII, ACIII, ACVII, ACXIII), otras están ligadas a la membrana (ACIV, ACIX, ACXII, ACXIV y ACXV), AC VA y AC VB son mitocondriales, y ACVI es secretada en la saliva y la leche. Las AC de mamíferos fueron tales primeras enzimas aisladas y estudiadas en detalle (Supuran, C. T. Nat. Rev. Drug Discov. 2008, 7, p. 168, Supuran, C. T.; Scozzafava, A. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 4336) y muchas de ellas son dianas ("targets") terapéuticas establecidas. Los inhibidores clásicos de AC son las sulfonamidas primarias, RSO_2NH_2 , que han estado en uso clínico durante más de 50 años como diuréticos y fármacos antiglaucoma. De hecho, hay alrededor de 30 fármacos clínicamente usados (o agentes en desarrollo clínico) que pertenecen a la clase sulfonamida o sulfamato que muestran actividad inhibidora de AC (Supuran, C. (2008) *Nature*, Vol. 7: 168-181) y algunos de los cuales son establecidos como diuréticos y agentes antiglaucoma.

Se ha surgido recientemente que los inhibidores de AC tienen potencial como, entre otras cosas, fármacos anticancerígenos. Sin embargo, barreras críticas al diseño de los inhibidores de AC como agentes terapéuticos están relacionadas con el alto número de isoformas en humanos (es decir, 16 AC, de las cuales 13 tienen actividad catalítica), su localización bastante común en muchos tejidos/órganos, y la falta de selectividad de isoenzima de los inhibidores actualmente disponibles de la clase sulfonamida/sulfamato. De hecho, entre los derivados mencionados anteriormente, no hay compuestos que inhiban selectivamente las isoformas de AC con valor terapéutico (se proporcionan los datos de inhibición de entre 1-25 compuestos de sulfonamida contra todas las isoformas humanas (h) de AC en Supuran, C. (2008) *Nature* 7: 168-181).

Las isoenzima ACIX y ACXII se encuentran predominantemente en las células tumorales y muestran una expresión restringida en los tejidos normales. Se proporciona una revisión útil de las limitaciones de la ACI actual en Poulsen, Expert Opin. Ther. Patents (2010) 20(6):795-806. Está claro a partir de esta revisión que el uso de inhibidores de ACIX para el cáncer y la metástasis no se ha demostrado efectivamente, debido a las limitaciones de los compuestos disponibles.

La evidencia de que ciertos inhibidores de ACIX de sulfonamida pueden efectivamente mostrar efectos antitumorales, ha sido publicada muy recientemente (Ahlskog, J.K.J.; Dumelin, C.E.; Trüssel, S.; Marlind, J.; Neri, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 4851; S. Pastorekova et al., *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, June 2005; 20(3): 211-217). Se han revelado ciertos compuestos, por ejemplo en CA 2 664 365 y en Maresca et al., Publicación PCT WO2009089383. Sin embargo, la selectividad es un problema, ya que la inhibición de las anhidrasas carbónicas constitutivas está contraindicada.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan composiciones farmacéuticas de ureido-sulfonamidas que comprenden:

4-[[[(4'-Fluorofenil)carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-104);
o
4-[[[(3'-Nitrofenil)carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-119);

para el tratamiento del cáncer hipóxico y metastásico, para el deterioro o destrucción de las células madre del cáncer, o para el tratamiento de cualquier cáncer caracterizado por una expresión aumentada de ACIX o ACXII.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas conforme a la invención que inhiben la actividad de ACIX relacionada con el tumor en mayor medida que inhiben la actividad de ACI y ACII in vivo, o in vitro.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas para suprimir el crecimiento, la invasión y/o metástasis de tumores en un mamífero mediante el tratamiento de dicho mamífero con una composición farmacéutica conforme a la invención.

5 Se proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método de disminuir el número de células o la masa de cáncer de mama en un mamífero mediante el tratamiento de dicho mamífero con una composición farmacéutica conforme a la invención.

10 Se proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método de agotar las células madre del cáncer en una población de células madre del cáncer de mamífero usando una composición farmacéutica proporcionada aquí.

Se proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método de inducir la muerte celular en las células de cáncer hipóxicas usando una composición farmacéutica que proporciona la invención.

15 El mamífero es tratado también con agentes adicionales anticancerígenos.

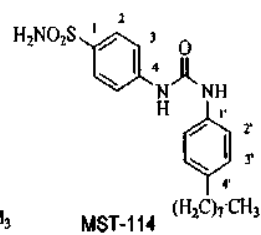
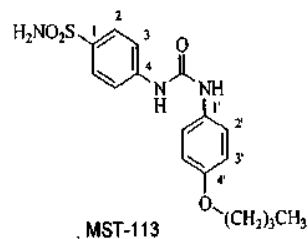
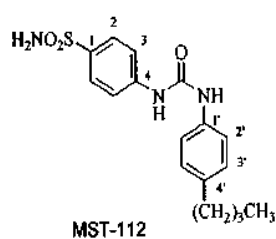
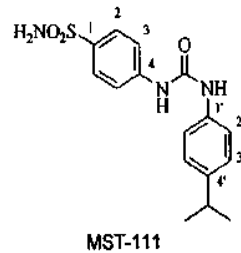
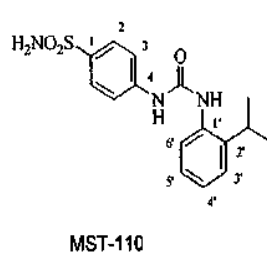
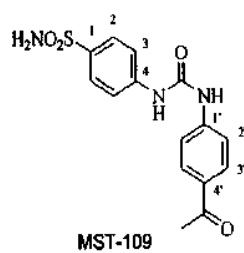
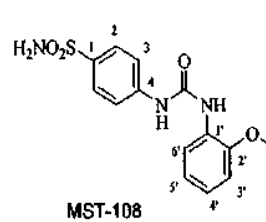
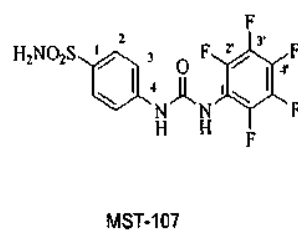
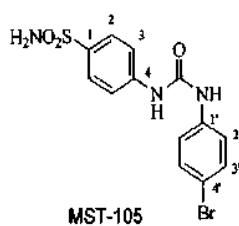
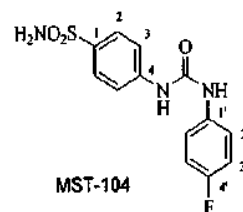
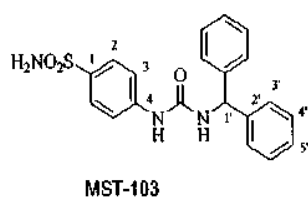
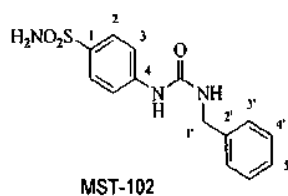
Se puede tratar un mamífero tratado conforme a la invención con agentes quimioterapéuticos o anticancerígenos adicionales. Cualquier cáncer o tumor o población celular tratado aquí puede expresar ACIX o ACXII más allá del nivel normal para tejidos no cancerígenos de origen similar.

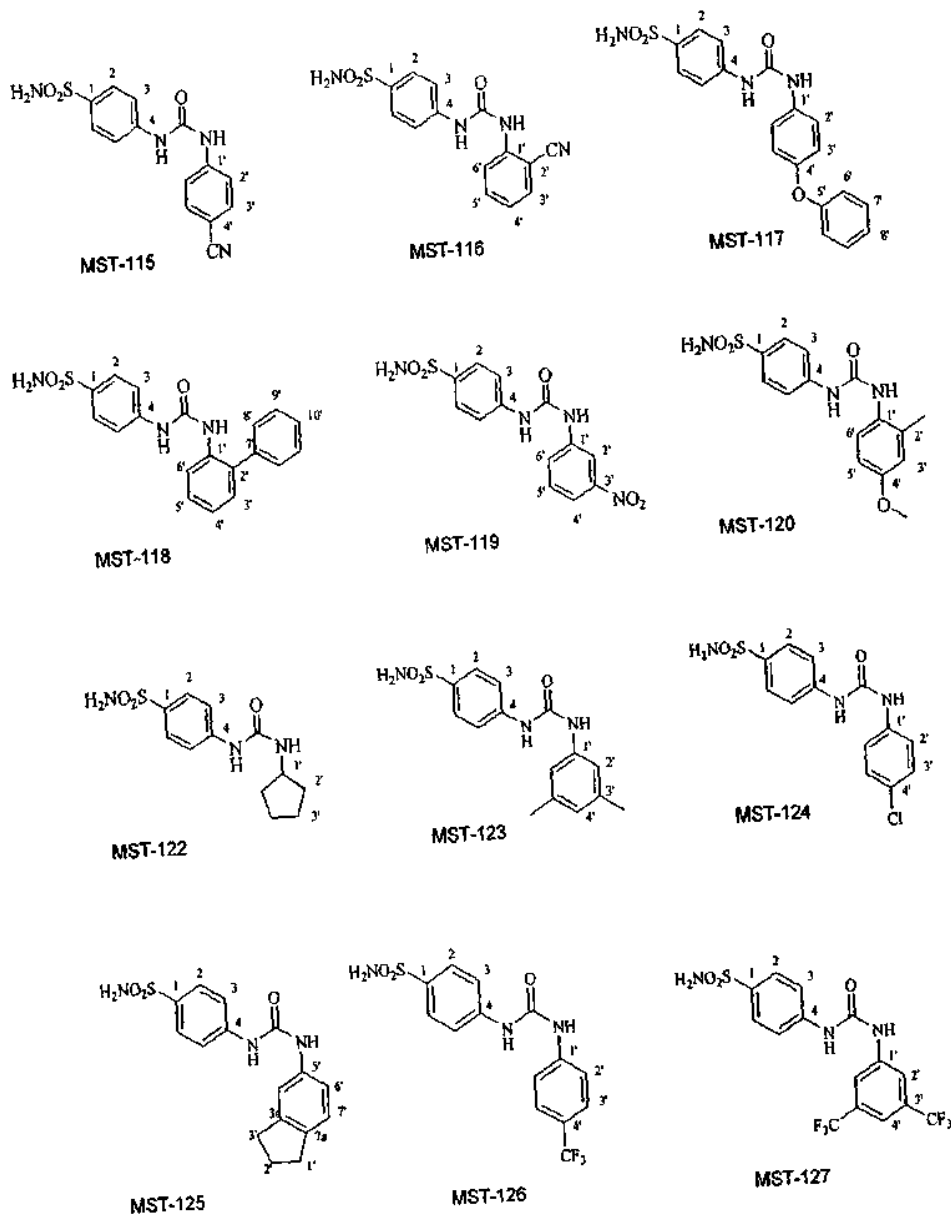
20 Los tumores tratados pueden ser del cáncer de mama, de pulmón, pancreático, renal, de próstata, cervical, colorrectal, o glioblastoma conforme a la realización de la invención. El uso de las composiciones farmacéuticas para tratar a un mamífero con el cáncer o con un tumor puede reducir o eliminar metástasis.

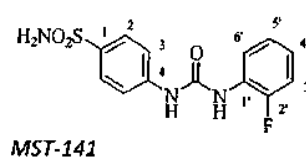
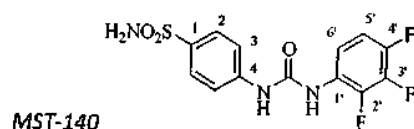
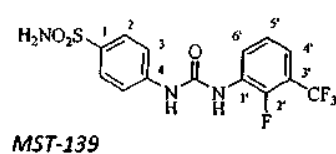
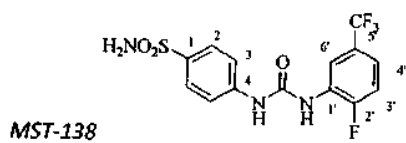
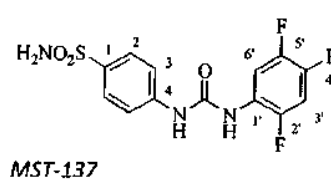
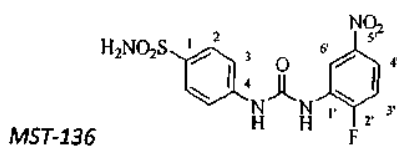
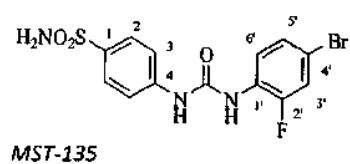
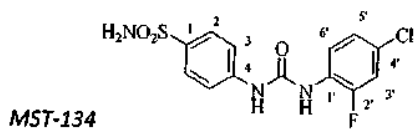
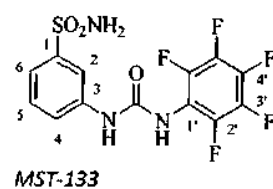
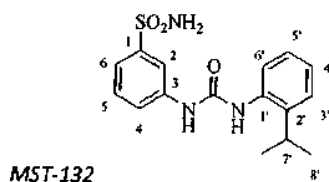
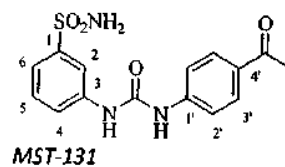
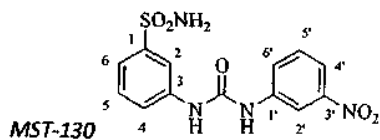
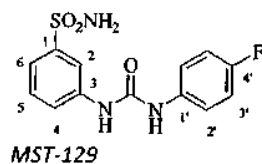
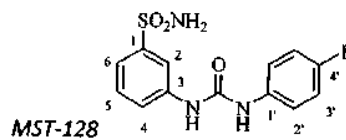
25 El mamífero puede ser humano.

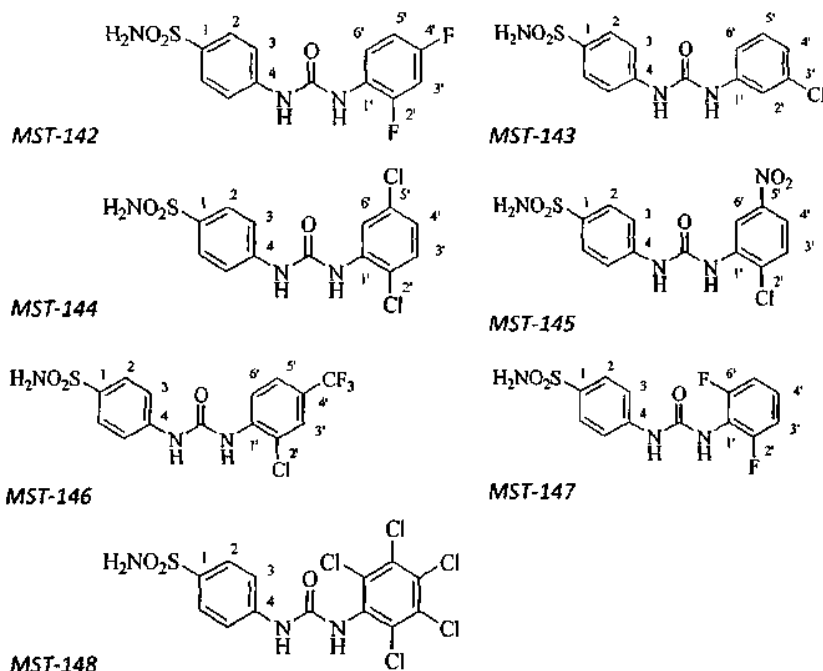
30 Se revela también un compuesto que comprende la fórmula (I) $R-Q-Ar-SO_2NH_2$ en la que R puede ser un grupo arilo, hetarilo, alquilo o cicloalquilo, con o sin carga; Q puede ser $-L(CH_2)_n-$, donde $n = 0, 1$ o 2 y L puede ser el grupo de $-NHCXNH-$, $-NHC(S)SNH-$, $-NHCONHC(S)NH-$, o $-SO_2NH-$, donde X es O o S; y Ar puede ser un grupo C_6-C_{10} aromático o heteroaromático que contiene al menos un heteroátomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, o donde Q puede ser $-NHCONH-$, Ar es fenil, y R puede ser $PhCH_2$, Ph_2CH , $4-FC_6H_4$, $4-ClC_6H_5$, $4-BrC_6H_4$, C_6F_5 , $2-MeOC_6H_4$, $4-AcC_6H_4$, $2-i-PrC_6H_4$, $4-i-PrC_6H_4$, $4-n-BuC_6H_4$, $4-n-BuOC_6H_4$, $4-n-octil-C_6H_4$, $4-NCC_6H_4$, $2-NCC_6H_4$, $4-PhOC_6H_4$, $2-PhC_6H_4$, $3-O_2NC_6H_4$, $4-MeO-2-MeC_6H_3$, Ciclopentil, Indan-5-ilo, $3,5-Me_2C_6H_3$, $4-CF_3C_6H_4$, o $3,5-(CF_3)_2C_6H_3$.

35 Los compuestos de la presente divulgación se ilustran aquí abajo para mayor claridad.









Los composiciones farmacéuticas conforme a la invención se caracterizan porque inhiben la actividad de ACIX y ACXII relacionadas con el tumor en mayor medida que inhiben la actividad de ACI y ACII in vitro.

5 Se proporcionan además composiciones farmacéuticas y su uso para inhibir la invasión, y/o inducir la muerte celular de las células de cáncer de mama humano en hipoxia.

Se proporcionan además composiciones farmacéuticas y su uso para deteriorar el mantenimiento de células madre del cáncer de mama a través de la inhibición de la actividad de ACIX.

10 Se proporcionan además composiciones farmacéuticas y su uso para agotar la población de las células madre del cáncer en el cáncer de mama humano mediante la inhibición de la actividad de ACIX.

La composición farmacéutica para el uso en un método de tratar el cáncer metastásico o hipóxico conforme a la presente invención comprende MST-119, o MST-104.

15 Se proporcionan también las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención.

Otros aspectos y funciones de la presente invención se harán evidentes a aquellos ordinariamente cualificados en el arte al revisar la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención conjuntamente con las figuras, tablas, fórmulas y ejemplos acompañantes.

20 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

25 La figura 1 muestra los análisis Kaplan-Meier de la asociación de expresión de ACIX con la supervivencia libre de recidiva (A), supervivencia libre de recidiva a distancia (B) y la supervivencia específica de cáncer de mama (C), logrando niveles muy altos de significación estadística ($p < 10^{-17}$, $p < 10^{-16}$, y $p < 10^{-13}$, respectivamente). Las tasas de supervivencia libre de recidiva a distancia y de supervivencia específica del cáncer de mama a 10 años en los grupos de ACIX positiva versus los de ACIX negativa fueron del 57% en comparación con el 73%, y el 62% en comparación con el 78%, respectivamente. En los análisis multivariados, incluyendo todas las variables estándares de pronóstico y los subtipos biológicos, la expresión de ACIX permaneció un factor fuerte independiente de mal pronóstico con una razón de riesgo de 1.4.

35 La figura 2 muestra (A) cultivos celulares para tres líneas celulares 67NR, 66cl4 y 4T1 juntos con modelos de ratón que demuestran un marcaje bioluminiscente de las células tumorales in vivo y (B) una tabla de expresión de genes inducida por hipoxia para los tres tipos de tumores (expresión alta, oscurecido; expresión baja, claro).

La figura 3 muestra una inmunotransferencia de tipo Western, "Western blot", señalando la sobreexpresión de ACIX en los tumores primarios. NMG = glándula mamaria normal. La beta-actina se sirvió como control de la carga.

La figura 4 muestra (A) el gráfico de los datos relacionados con la expresión de ACIX en las células metastásicas (4T1, 66cl4) y no metastásicas (67NR) incubadas durante 72 horas medido por qRT-PCR (gráfico) y Western blot de los lisados (gel). Los datos se expresan como media $\pm$ s.e.m. (error estándar de la media) $n=3$, $**P<0.005$, $***P<10^{-3}$. Se muestra la beta-actina como control de la carga. (B) Las células 4T1 que expresan ARNhc no silenciador, hc indica de horquilla corta, (NShc), o ARNhc cuya diana ("target") es ACIX (ACIXhc) incubadas por 72 horas. Dos clones independientes (C2, C5) que expresan ACIXhc fueron analizados. En el panel inferior, los lisados se evaluaron por el Western blot para la expresión de ACIX. La beta-actina se sirvió como control de la carga.

La figura 5 incluye imágenes representativas de células TUNEL positivas (flechas) de (A) en la parte superior, las células 4T1 que expresan ACIXhc y cultivadas durante 48 horas en hipoxia y la cantidad de muerte celular se comparó con las células 4T1 que expresan NShc. En el panel superior, imágenes representativas de células TUNEL positivas (flechas). Barra de escala = 100 μ m. (A) En el panel inferior, un gráfico que muestra la cuantificación de las células TUNEL positivas a través de contar 5 campos aleatorios/línea celular a un aumento de 20x. Los datos se expresan como cambio múltiplo en las células TUNEL positivas, en comparación con las células de control cultivadas en normoxia. $n = 5$. (B) Las células 4T1 que expresan NShc o ACIXhc fueron cultivadas en las condiciones indicadas durante 72 horas y los niveles intracelulares de ATP se determinaron de lisados celulares totales. $*P<0,01$, en comparación con los niveles de ATP en normoxia.

La figura 6 muestra (A) imágenes bioluminiscentes representativas de metástasis espontánea usando el modelo de tumor 4T1. Mapas de calor (claro, menos intenso; más oscuro, más intenso;) se muestran superpuestos en imágenes de cuerpo en escala grises. (B) La misma perspectiva, pero con células 4T1 que expresan NShc o ACIXhc y células parentales 4T1 inoculadas en la glándula mamaria de 10 ratones BALB/c. *denota la terminación de la escisión de tumor primario de los grupos de control.

La figura 7 ilustra el crecimiento de tumor primario reducido por las células de cáncer de mama humano con depleción de expresión de ACIX. Las células MDA-MB-231 que expresan NShc o ACIXhc y las células parentales MDA-MB-231 fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco de los ratones NOD.CB17-prkdc^{scid}/J (ratones inmunodeficientes NOD-SCID) y se monitorizaron los animales para determinar el crecimiento tumoral. $n=7$ para cada grupo. Diagrama: las células MDA-MB-231 que expresan ARNhc micro-adaptado ("shRNAir" en inglés) que actúan sobre ACIX humana (ACIXhc) o una secuencia de control no silenciadora (NShc) fueron cultivadas en normoxia o hipoxia durante 72 horas y se analizaron para la expresión ACIX inducida por hipoxia (se muestra el Western blot). La β -actina se sirvió como control de la carga.

La figura 8 muestra que el agotamiento de ACIX inhibe la formación de metástasis pulmonares en un modelo de metástasis experimental. El panel (A) muestra imágenes bioluminiscentes representativas de la metástasis experimental por las células 4T1 que expresan ACIX. El panel (B) muestra la presencia de nódulos metastásicos en imágenes macroscópicas de los pulmones de ratón del grupo 4T1 NShc. El panel (C) muestra la cuantificación del número de nódulos visibles en los diferentes grupos de tumores. El Panel (D) muestra la tinción inmunohistoquímica de ACIX en metástasis pulmonares derivadas de las células 4T1.

La figura 9 muestra (A) la estructura química de MST-017, o previamente identificado como "CAI-17" (Supuran, C. 2008, Nature. Vol 7: 168-181), (B) Las células se cultivaron durante 72 horas en la presencia de 10 μ M de MST-017. Se muestran imágenes representativas del inhibidor marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) ligado a las líneas celulares en las condiciones indicadas, (C) es una representación gráfica del cambio en el pH extracelular para las células cultivadas durante 72 horas con o sin MST-017 (400, 600 y 400 μ M para las células 4T1, 66cl4 y 67NR, respectivamente). $n = 3$. Se muestran los cambios medios en el pH extracelular $\pm$ s.e.m..

La figura 10 muestra los datos que señalan la eficacia in vivo de MST-017 para atenuar el crecimiento de los tumores primarios 4T1. (A) Los niveles de expresión de ACIX de las células 4T1 se analizaron mediante Western blot. (B) El panel izquierdo, el crecimiento tumoral fue monitorizado con la medición por calibre. La iniciación y la terminación del tratamiento se indican con flechas. Los animales tratados con y sin excipiente (vehículo) sirvieron como controles. (C) Los pesos de los animales tratados se monitorizaron como medida de la toxicidad general del inhibidor. Se pesaron los ratones justo antes de cada dosis del inhibidor de ACIX.

La figura 11 muestra las diferencias en el crecimiento tumoral de 67NR para los animales tratados como se gráfica y mediante el Western blot de ACIX. Para (A), las células 67NR fueron cultivadas en normoxia o hipoxia y se analizaron los niveles de expresión de ACIX mediante Western blot. Para (B), se inocularon los animales con las células 67NR y se

trataron como en la Figura 10. El gráfico de cuadro (C) muestra los datos que señalan que no se notaron diferencias significativas en los pesos entre los diferentes grupos de tratamiento y control.

La figura 12 muestra (A) la estructura química del inhibidor de ACIX, MST-119, y (B) imágenes bioluminiscentes representativas de metástasis establecidas después de la inyección intravenosa de células 4T1 y el tratamiento con MST-119. El gráfico de cuadro (C) ilustra los resultados de la cuantificación de la bioluminiscencia derivada de tumores.

La figura 13 muestra (A) imágenes bioluminiscentes representativas de metástasis establecidas después de la inyección intravenosa de células 4T1 y el tratamiento con MST-104. El gráfico de cuadro (B) ilustra los resultados de la cuantificación la bioluminiscencia derivada de tumores.

La figura 14 muestra la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de tumores de mama humanos implantados ortotópicamente en la glándula mamaria y tratados con el inhibidor de ACIX, MST-104. Se monitorizó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo. El diagrama muestra que estas células aumentan la expresión de ACIX cuando se crecen en hipoxia.

La figura 15 muestra que a diferencia de las células del cáncer de mama humano MDA-MB-231 parentales, las células MDA-213 LM2-4 altamente metastásicas del pulmón son invasivas cuando se cultivan en cultivos de 3D Matrigel™ en hipoxia.

La figura 16 muestra que los inhibidores de ACIX de ureido-sulfonamida (MST-104, MST-119, MST-107, MST-130) inhiben la invasión de células de cáncer de mama humano altamente metastásicas en cultivos de 3D Matrigel™ en hipoxia.

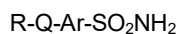
La figura 17 muestra los efectos diferenciales que las ureido-sulfonamidas tienen en la muerte celular en cultivos de 3D Matrigel™ en hipoxia. (A) Imágenes representativas del número de células TUNEL positivas. El gráfico de cuadro (B) ilustra los resultados de la cuantificación de células TUNEL positivas.

La figura 18 muestra que el agotamiento génico de la expresión de ACIX en las células de cáncer de mama 4T1 (A) aumenta el número de células requeridas para iniciar el crecimiento de tumoresferas en hipoxia y (B) disminuye el incremento inducido por hipoxia en las células madre del cáncer CD44⁺/CD24^{-baja}.

La figura 19 muestra que el tratamiento de los tumores ortotópicos de cáncer de mama humano con ureido-sulfonamida MST-104 agota la población de células madre del cáncer dentro del tumor. Cuadro (A) muestra gráficos de puntos FACS representativos que clasifican las células madre del cáncer ESA⁺ (antígeno de superficie epitelio). El gráfico de cuadro (B) ilustra los resultados de la cuantificación del número de células madre del cáncer de mama humano ESA⁺ presentes en los tumores.

DESCRIPCION DETALLADA

Las composiciones farmacéuticas de ureido-sulfonamidas adecuadas para el tratamiento del cáncer metastásico se sintetizan y se utilizan como se describe aquí. Comprenden Fórmula (I)



en la que R puede ser un grupo arilo, hetarilo, alquilo o cicloalquilo con o sin carga; Q puede ser el grupo de $-L(CH_2)_n-$, donde $n=0, 1$ o 2 y L puede ser el grupo de $-NH CXNH-$, $-NHC(S)SNH-$, $-NHCONHCSNH-$, o $-SO_2NH-$, donde X puede ser O o S; y Ar puede ser un grupo de C_6-C_{10} aromático o heteroaromático que contiene al menos un heteroátomo de oxígeno, nitrógeno o azufre.

Fórmula (1) en la que Q puede ser el grupo de $-NHCONH-$, Ar puede ser fenil y R puede ser $PhCH_2$, Ph_2CH , $4-FC_6H_4$, $4-ClC_6H_5$, $4-BrC_6H_4$, C_6F_5 , $2-MeOC_6H_4$, $4-AcC_6H_4$, $2-i-PrC_6H_4$, $4-i-PrC_6H_4$, $4-n-BuC_6H_4$, $4-n-BuOC_6H_4$, $4-n-octil-C_6H_4$, $4-NCC_6H_4$, $2-NCC_6H_4$, $4-PhOC_6H_4$, $2-PhC_6H_4$, $3-O_2NC_6H_4$, $4-MeO-2-MeC_6H_3$, Ciclopentil, Indan-5-ilo, $3,5-Me_2C_6H_3$, $4-CF_3C_6H_4$, $3,5-(CF_3)_2C_6H_3$ útiles en los métodos de la invención.

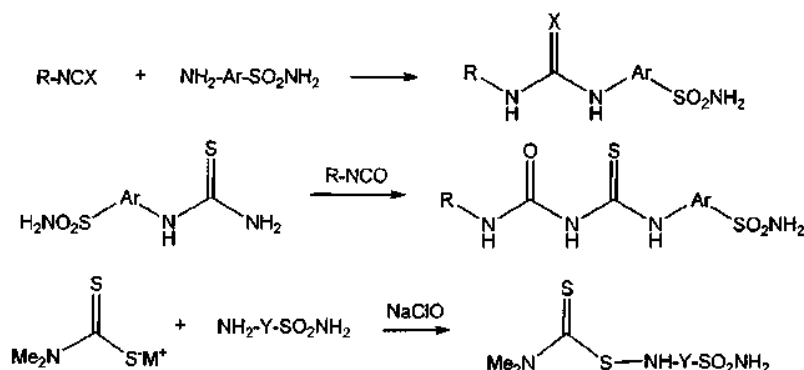
Los compuestos representativos son:

4-[[Bencilamino]carbonil]amino}bencenosulfonamida (MST-102);

4-[[Benzhidrilamino]carbonil]amino}bencenosulfonamida (MST-103);

- 4-[[[4'-Fluorofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-104);
- 4-[[[4'-Bromofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-105);
- 4-[[[Pentafluorofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-107);
- 4-[[[2'-Metoxifenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-108);
- 5 4-[[[4'-Acetilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-109);
- 4-[[[2'-iso-Propilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-110);
- 4-[[[4'-iso-Propilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-111);
- 4-[[[4'-n-Butilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-112);
- 4-[[[4'-Butoxifenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-113);
- 10 4-[[[4'-n-Octilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-114);
- 4-[[[4'-Cianofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-115);
- 4-[[[2'-Cianofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-116);
- 4-[[[4'-Fenoxifenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-117);
- 4-[[[Bifenil-2'-il]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-118);
- 15 4-[[[3'-Nitrofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-119);
- 4-[[[4'-Metoxi-2'-metilfenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-120);
- 4-[[[Ciclopentilcarbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-122);
- 4-[[[3',5'-Dimetilfenil]amino]carbonilamino]]bencenosulfonamida (MST-123);
- 4-[[[4'-Clorofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-124);
- 20 4-[[[2',3'-Dihidro-1*H*-inden-5'-ilamino]carbonilamino]]bencenosulfonamida (MST-125);
- 4-[[[4'-(Trifluorometil)fenil]aminocarbonil]amino]]bencenosulfonamida (MST-126);
- 4-[[[3',5'-bis(Trifluorometil)fenil]aminocarbonil]amino]]bencenosulfonamida (MST-127);
- 3-(3-(4'-Yodofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-128);
- 3-(3-(4'-Fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-129);
- 25 3-(3-(3'-Nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-130);
- 3-(3-(4'-Acetilfenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-131);
- 3-(3-(2'-Isopropilfenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-132);
- 3-(3-(Perfluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-133);
- 4-(3-(4'-cloro-2-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-134);

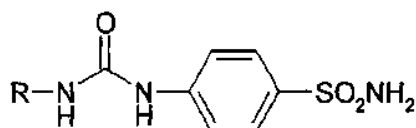
- 4-(3-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-135);
- 4-(3-(2'-fluoro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-136);
- 4-(3-(2',4',5'-trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-137);
- 4-(3-(2'-fluoro-5'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-138);
- 5 4-(3-(2'-fluoro-3'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-139);
- 4-(3-(2',3',4'-trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-140);
- 4-(3-(2'-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-141);
- 4-(3-(2',4'-difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-142);
- 4-(3-(3'-clorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-143);
- 10 4-(3-(2',5'-diclorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-144);
- 4-(3-(2'-Cloro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-145);
- 4-(3-(2'-Cloro-4'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-146);
- 4-(3-(2',6'-difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-147); o
- 4-(3-(perclorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-148).
- 15 Para mayor claridad, el grupo aromático de C₆-C₁₀ significa fenil o 1, o 2-naftilo, y un grupo heteroaromático significa un compuesto aromático heterocíclico de C₂-C₁₂ que contiene al menos un heteroátomo de oxígeno, nitrógeno o azufre. Además, 1,3,4-Tiadiazol es un grupo heterocíclico preferido.
- Se revelan adicionalmente compuestos de fórmula (I), en la que los compuestos inhiben la actividad de ACIX y ACXII relacionadas con tumores en mayor medida que inhiben la actividad de ACI y ACII, como se midió *in vitro*.
- 20 Un objeto adicional de la presente divulgación es un procedimiento para la preparación de los compuestos de la fórmula (I). Una reacción preferida se lleva a cabo entre un compuesto de la fórmula R-NCX, en la que R y X son como se han definido anteriormente, y un compuesto de la fórmula NH₂-Ar-SO₂NH₂ o NH₂CSNH-Ar-SO₂NH₂, donde Ar es como se ha definido anteriormente.
- 25 Otra reacción preferida es la tiocarbamilación oxidativa de un compuesto de la fórmula NH₂-Y-SO₂NH₂ con N,N-dimetil-/dietilditiocarbamato sódico/potásico, en la que Y es el grupo de -(CH₂)_nAR-, n= 0, 1, 2 y AR es un grupo C₆-C₁₀ aromático o heteroaromático que contiene al menos un heteroátomo de oxígeno, nitrógeno o azufre.
- Las condiciones de reacción se conocen entre aquellos que son expertos en la técnica, véase por ejemplo, A. Scozzafava y C.T. Supuran Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000, 10, 1117-1120; C.T. Supuran; F. Briganti; S. Tilli; W.R. Chegwidden; A. Scozzafava Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 703-714; C.T. Supuran; A. Scozzafava; B.C. Jurca; M.A. Ilies
- 30 Eur. J. Med. Chem. 1998, 33, 83-93.
- El siguiente esquema muestra un ejemplo de un procedimiento que se puede usar para preparar compuestos de acuerdo con la presente invención o divulgación.



Los compuestos son inhibidores selectivos de ACIX y ACXII. Por consiguiente, se proporcionan adicionalmente compuestos de la Fórmula (I), en la que los compuestos inhiben la actividad de ACIX y ACXII relacionadas con tumores en mayor medida que inhiben la actividad de ACI y ACII, como se midió in vitro. Estos compuestos son útiles en los métodos para reducir el crecimiento de cáncer de mama humano, para inhibir la invasión por células de cáncer de mama bajo condiciones hipóxicas típicas en los tumores sólidos, para matar las células de cáncer de mama humano en hipoxia, y para agotar las poblaciones de células madre del cáncer.

Las células madre del cáncer (CMC) se definen como una subpoblación de células de cáncer que tienen las propiedades de potencial de autorrenovación, la capacidad de dar origen a la progenie no CMC, y un potencial mucho mayor de iniciación de tumor en relación a otras células cancerígenas dentro del tumor (Chaffer and Weinberg, (2011) Science 331: 1559-1564; Clevers, (2011) Nat. Med. 17: 313-319; Hanahan and Weinberg, (2011) Cell. 144: 646-674). Las CMC se definen experimentalmente como células que tienen la capacidad de sembrar nuevos tumores cuando se implantan en un animal huésped apropiado (Chaffer and Weinberg, 2011; Hanahan and Weinberg, 2011). Se cree que son un componente de la resistencia a la terapia del cáncer.

Tabla 1: La inhibición de ACIh (h indica humana), ACIIh, (isoformas citosólicas) y ACIXh y ACXIIh (enzimas transmembrana, relacionadas con el tumor) con ureido-sulfonamidas. MST-101 a MST-127.



Nombre informal	R	Actividad de K _i (nM)			
		ACIh	ACIIh	ACIXh	ACXIIh
MST-101	Ph	760	3730	575	67,3
MST-102	PhCH ₂	92	2200	41,4	49,5
MST-103	Ph ₂ CH	83	3725	58,8	64,5
MST-104	4-FC ₆ H ₄	5080	9640	45,1	4,5
MST-105	4-BrC ₆ H ₄	1465	1290	69,3	7,9
MST-106	4-IC ₆ H ₄	5500	2634	24,5	4,3
MST-107	C ₆ F ₅	2395	5055	5,4	5,1

MST-108	2-MeOC ₆ H ₄	92	4070	465	61,2
MST-109	4-AcC ₆ H ₄	388	1060	5,4	4,6
MST-110	2-i-PrC ₆ H ₄	9,0	3,3	0,5	4,2
MST-111	4-i-PrC ₆ H ₄	4330	5005	541	49,7
MST-112	4-n-BuC ₆ H ₄	5530	2485	376	28,5
MST-113	4-n-BuOC ₆ H ₄	11,3	2,1	0,8	2,5
MST-114	4-n-octil-C ₆ H ₄	536	9600	47,1	52,8
MST-115	4-NCC ₆ H ₄	57,0	64,7	6,0	6,5
MST-116	2-NCC ₆ H ₄	10,9	2,4	0,3	4,6
MST-117	4-PhOC ₆ H ₄	604	85	69,1	7,1
MST-118	2-PhC ₆ H ₄	1170	9,7	65,7	65,1
MST-119	3-O ₂ NC ₆ H ₄	23,4	15	0,9	5,7
MST-120	4-MeO-2-MeC ₆ H ₃	89,2	3310	73,3	6,0
MST-121	9H-fluoren-2-il	1700	908	102	55,4
MST-122	Ciclopentil	470	2265	7,3	7,0
MST -123	3,5-Me ₂ C ₆ H ₃	6530	1765	6,9	6,2
MST-124	4-ClC ₆ H ₄	2150	781	58	5,3
MST-125	Indan-5-il	9,8	8,9	7,0	2,5
MST-126	4-CF ₃ C ₆ H ₄	9,7	1150	6,2	2,3
MST-127	3,5-(CF ₃) ₂ C ₆ H ₃	3690	75	53	39

Los compuestos de la invención son útiles para la preparación de medicamentos así como en un método para el tratamiento de un tumor hipóxico que tiene ACIX o ACXII altamente sobreexpresada. La "sobreexpresión" ("overexpression") significa la expresión excesiva de un gen, usualmente al producir demasiado de su efecto o producto.

- 5 Los medicamentos tienen una acción inhibidora sobre ACIX, y son particularmente efectivos en revertir la acidificación de un tumor hipóxico y su ambiente circundante.

Los compuestos de la invención son también capaces de deteriorar y/o erradicar las células madre del cáncer. Se cree que las células madre del cáncer son una base de resistencia por los tumores a agentes o técnicas terapéuticas tradicionales, tales como los quimioterapéuticos o la radiación.

- 10 En la mayoría de la terapia del cáncer, los agentes múltiples con modalidades complementarias de acción se utilizan típicamente como parte de un "cóctel" de quimioterapia. Se anticipa que las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención pueden usarse en tal cóctel que puede contener uno o más de los agentes antineoplásicos adicionales dependiendo de la naturaleza del cáncer que se esté tratando. Otros agentes quimioterapéuticos, tales como antimetabolitos (es decir, 5-fluorouracilo, floxuridina, tioguanina, citarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina, metotrexato,

- gemcitabina, capacitabina, pentostatina, trimetrexato o cladribina); agentes reticuladores y alquilantes de ADN (es decir, cisplatino, carboplatino, estreptozotocina, melfalán, clorambucilo, carmustina, mecloretamina, lomustina, bisulfán, tiotepa, ifosfamida o ciclofosfamida); agentes hormonales (es decir, tamoxifeno, roloxifeno, toremifeno, anastrozol o letrozol); antibióticos (es decir, plicamicina, bleomicina, mitoxantrona, idarubicina, dactinomicina, mitomicina, doxorubicina o daunorrubicina); inmunomoduladores (es decir, interferones, IL-2 o BCG); agentes antimitóticos (es decir, estramustina, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, o vinorelbina); inhibidores de topoisomerasa (es decir, topotecán, irinotecán, etopósido o tenipósido); y otros agentes (es decir, hidroxiurea, trastuzumab, altretamina, retuximab, L-asparaginasa, o gentuzumab ozogamicina) se pueden usar, por consiguiente, en combinación con las composiciones farmacéuticas descritas en la invención.
- 10 Las moléculas se pueden combinar con excipientes farmacéuticos conocidos tales como sales, agua, lípidos y/o azúcares simples para llegar a una formulación adecuada para la inyección, aplicación tópica o ingestión.
- La formulación farmacéutica involucra el desarrollo de una preparación del compuesto que es a la vez estable y aceptable para el uso humano. Se habrán probado las formulaciones de los compuestos para asegurar que el fármaco es compatible con cualquier agente solubilizante, estabilizante, liofilizante o hidratante.
- 15 El diseño de cualquier formulación implica la caracterización de las propiedades físicas, químicas, y mecánicas de un fármaco para elegir qué otros ingredientes se deben usar en la preparación.
- El tamaño de partícula, el polimorfismo, el pH, y la solubilidad, pueden todos influir en la biodisponibilidad y, por lo tanto, la actividad de un fármaco. El fármaco debe combinarse con aditivos inactivos mediante un método que asegura que la cantidad del fármaco presente sea consistente en cada unidad de dosificación, es decir cada tableta.
- 20 Es improbable que los estudios de formulación estén finalizados para cuando comiencen los ensayos clínicos. Esto significa que preparaciones simples se desarrollan inicialmente para su uso en los ensayos clínicos de fase I. La prueba de la estabilidad de estas formulaciones a largo plazo no es necesaria, ya que se utilizarán (se probarán) en cuestión de días.
- 25 En el momento en que lleguen los ensayos clínicos de fase III, la formulación del fármaco debería haberse desarrollado para ser parecida a la preparación que se utilizará finalmente en el mercado. Se realizan los estudios de estabilidad para comprobar si la temperatura, la humedad, la oxidación o la fotólisis (luz ultravioleta o luz visible) tienen algún efecto, y la preparación se analiza para ver si se han formado productos de degradación.
- En una realización, los compuestos de la invención se formulan en polietilenglicol con etanol y solución salina. En una realización particular, la formulación consiste en el 37,5% de PEG 400, el 12,5% de etanol y el 50% de solución salina.
- 30 Tal como se usa en este documento, se puede considerar el tumor cualquier cáncer primario o metastásico, tejido tumoral hipóxico o crecimiento maligno. Cualquier tumor susceptible a hipoxia y/o metástasis, particularmente los cánceres de mama, pulmón, cánceres renales, cervicales, pancreáticos, colorrectales, el glioblastoma, el cáncer prostático y ovárico pueden ser tratados conforme a las realizaciones de la invención. Están disponibles métodos para determinar adicionales tipos de cáncer adecuados para el tratamiento con las composiciones farmacéuticas de la invención, tales métodos están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica de detectar tejidos hipóxicos.
- 35 Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU.; U.S. Pat. Núm. 5.401.490 y 5.843.404 que revelan métodos para detectar la hipoxia o tejidos hipóxicos. Cualquiera de estas técnicas u otras conocidas por los expertos en la técnica puede usarse para identificar tejidos hipóxicos.
- 40 Los tumores susceptibles a tratamiento tendrán niveles elevados de ACIX o ACXII con respecto al tejido normal. Las isoenzimas ACIX y ACXII se encuentran predominantemente en las células tumorales y muestran una expresión restringida en tejidos normales. Se ha demostrado recientemente que mediante la hidratación eficaz del dióxido de carbono a protones y al bicarbonato, estas AC contribuyen significativamente a la acidificación extracelular de tumores sólidos, mientras que su inhibición revierte este fenómeno hasta cierto punto. ACIX y ACXII están sobreexpresadas en muchos de tales tumores en respuesta a la vía del factor inducible por hipoxia (HIF).

Como se demuestra en los datos, ACIX y ACXII están asociadas con hipoxia y metástasis. Por lo tanto, un tumor hipóxico y metastásico no necesitaría ser probado para demostrar los niveles elevados de ACIX y ACXII para indicar el tratamiento utilizando los compuestos de la invención debido a los datos que ya respaldan la suposición. Sin embargo, la Patente de EE.UU. Núm. US7378091 de Gudas et al. revela anticuerpos de ACIX útiles en la detección y el diagnóstico.

5 Los anticuerpos contra ACXII, así como sondas de ARN, se pueden usar para evaluar la sobreexpresión de ACXII en muestras de tumores biopsiadas.

ACXII se evalúa también en Battke et al., (2011) Cancer Immunol Immunother. May;60(5):649-58.

Se puede decir que el crecimiento, la persistencia y/o la propagación del tumor son suprimidos por los compuestos descritos en la invención, o por su uso en el tratamiento de mamíferos afligidos de esta manera. La "supresión" en este uso puede significar la inducción de regresión, la inhibición de crecimiento, y la inhibición de propagación, especialmente como estos términos se refieren a tumores y cánceres sufridos por mamíferos, particularmente los humanos.

10

Se pueden usar agentes quimioterapéuticos típicos incluyendo, pero no limitándose a docetaxel, alcaloides de vinca, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel, 5-FU, Herceptin, Avastin, Gleevec en combinación con los compuestos de la invención. De forma similar, la terapia de radiación se puede combinar con los programas de administración que incluyen los compuestos de la invención.

15

Cuando se lleva a cabo la intervención quirúrgica, los compuestos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse preoperatoriamente, perioperatoriamente o, posoperatoriamente. La dosificación se determina típicamente mediante programas de dosificación que usan el tamaño y el peso del paciente para calcular el área de la superficie corporal del paciente, que se correlaciona con el volumen de sangre, para determinar la dosificación inicial.

20 Las dosificaciones iniciales se resuelven generalmente durante las pruebas clínicas de los compuestos terapéuticos.

Los antecedentes y enfoques actuales para el enfoque clínico al tratamiento de tumores se pueden encontrar en Takimoto CH, Calvo E. "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" en Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 11 ed. 2008, que está disponible gratuitamente en <http://www.cancernetwork.com/cancer-management-11/chapter03/article/10165/1402628>.

Los siguientes ejemplos se usan para ilustrar aspectos de la invención.

25

Ejemplo 1

Preparaciones de compuestos específicos (compuestos MST-101 a MST-127 inclusive)

Procedimiento general para la preparación de los compuestos de la Fórmula (I)

Métodos en la química: Los espectros ^1H , ^{13}C y ^{19}F se registraron usando un espectrómetro Bruker Advance III 400 MHz. Los desplazamientos químicos se registran en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). Los espectros de infrarrojos se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum R XI como sólidos en placas de KBr. Se midieron los puntos de fusión (p.f.) en tubos capilares abiertos, a menos que se indique de otra manera, usando un aparato de punto de fusión Buchi Melting Point B-540, y no son corregidos. La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas con dorso de aluminio, gel de sílice 60 F₂₅₄, de Merck. La elución de las placas se llevó a cabo utilizando acetato de etilo—éter de petróleo como sistema de elución. La visualización se logró con luz UV a 254 nm, a través de sumergirla en una solución de tinción TLC de ninhidrina y calentarla con una pistola de aire caliente. La cromatografía en columna flash se llevó a cabo utilizando gel de sílice (obtenido de Aldrich Chemical Co., Milán, Italia) como adsorbente. El producto bruto se introdujo en la columna como una solución en el mismo sistema de elución con disolvente.

30

35

Se utilizaron disolventes y productos químicos como suministrados por Aldrich Chemical Co., Milán, Italia.

40

Se disolvió 4-aminobencenosulfonamida (2,9 mmoles) en acetonitrilo (20-30 mL) y luego se trató con una cantidad estequiométrica de un isocianuro. La mezcla se agitó a Ta (temperatura ambiente) o se calentó a 50°C durante 2 horas,

hasta su terminación (monitorización mediante TLC). El precipitado pesado formado se separó por filtración, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío.

4-[(anilino)carbonil]amino}bencenosulfonamida (MST-101):

- Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de fenilo (0,23 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta (temperatura ambiente) durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-101 como un sólido blanco con un rendimiento del 43,7%. p.f. 233-235 °C (Lit¹); TLC con gel de sílice R_f 0,63 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3340 (N-H urea), 1656 (C=O urea), 1595 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,00 (1H, tt, J 7,4, 0,8, 4'-H), 7,20 (2H, s, SO_2NH_2), 7,29 (2H, dd, J 8,2, 0,8, 2 x 3'-H), 7,47 (2H, dd, J 8,2, 1,2, 2 x 2'-H), 7,61 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,73 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 8,82 (1H, s, NH), 9,09 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 143,8, 140,2, 137,8, 129,8, 127,7, 123,1, 119,4, 118,4.

4-[(Bencilamino)carbonil]amino}bencenosulfonamida (MST-102):

- Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de bencilo (0,39 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 4 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-102 como un sólido blanco con un rendimiento del 42,3%. p.f. 194-196 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,58 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3313 (N-H urea), 1674 (C=O urea), 1591 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 4,35 (2H, d, J 6,0, 1'-H₂), 6,81 (1H, t, J 6,0, NH), 7,19 (2H, s, SO_2NH_2), 7,28 (1H, tt, J 6,8, 2,0, 5'-H), 7,35 (4H, m, 2 x 3'-H, 2 x 4'-H), 7,59 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,71 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 9,0 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 155,8 (C=O urea), 144,5, 141,0, 137,1, 129,3, 128,1, 127,8, 127,7, 117,8, 43,7 (C-1').

4-[(Benzhidrilamino)carbonil]amino}bencenosulfonamida (MST-103):

- Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de benzhidrilo (0,61 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-103 como un sólido blanco con un rendimiento del 42,4%. p.f. 235-236 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,76 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3338 (N-H urea), 1696 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 6,0 (1H, d, J 7,6, NH), 7,19 (2H, s, SO_2NH_2), 7,29 (2H, tt, J 7,2, 1,6, 2 x 4'-H), 7,38 (9H, m, 1'-H, 4 x 3'-H, 4 x 4'-H), 7,56 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,70 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,9 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 154,9 (C=O urea), 144,2, 143,8, 137,2, 129,5, 127,9, 127,8, 127,7, 117,7, 57,8 (C-1').

4-[(4'-Fluorofenil)carbamoil]amino}bencenosulfonamida (MST-104):

- Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-fluorofenilo (0,40 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 2 días, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-104 como un sólido blanco con un rendimiento del 55,5%. p.f. 242-243 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,53 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3338 (N-H urea), 1697 (C=O urea), 1593 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,17 (2H, t, J 9,0, 2 x 2'-H), 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,51 (2H, dd, J 9,0, 4,8, 2 x 3'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,86 (1H, s, NH), 9,09 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 158,5 (d, J_{C-F} 237, C-4'), 153,3 (C=O urea), 143,7, 137,8, 136,6 (d, J_{C-F} 3, C-1'), 127,7, 121,2 (d, J_{C-F} 7, C-2'), 118,4, 116,3 (d, J_{C-F} 22, C-3'); δ_F (376,5 MHz, DMSO- d_6) -121,0 (1F, s).

4-[(4'-Bromofenil)amino]carbonil}amino}bencenosulfonamida (MST-105):

- Se trató 4-amino-bencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-bromofenilo (0,57 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-105 como un sólido blanco con un rendimiento del 43,1%. p.f. 269-271 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,38 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3328 (N-H urea), 1652 (C=O urea), 1590 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,49 (2H, d, J 9,2, 2 x 2'-H), 7,51 (2H, d, J 9,2, 2 x 3'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,99 (1H, s, NH), 9,15 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,6 (C=O urea), 143,1, 139,3, 137,5, 132,0, 127,3, 120,9, 118,1, 114,1.

4-[[4'-Yodofenil]carbamoil]amino}bencenosulfonamida (MST-106):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-yodofenilo (0,71 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante una noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-106 como un sólido blanco con un rendimiento del 46,5%. p.f. 275-277 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,55 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3325 (N-H urea), 1652 (C=O urea), 1586 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,36 (2H, d, J 8,8, 2 x 2'-H), 7,63 (2H, d, J 6,8, 2 x 3-H), 7,66 (2H, d, J 6,8, 2 x 2-H), 7,77 (2H, d, J 8,8, 2 x 3'-H), 8,97 (1H, s, NH), 9,15 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 143,7, 140,3, 138,5, 138,1, 127,9, 121,7, 118,6, 86,2 (C-4').

4-[[Pentafluorofenil]carbamoil]amino}bencenosulfonamida (MST - 107):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de pentafluorofenilo (0,60 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-107 como un sólido blanco con un rendimiento del 97,7%. p.f. 251-253 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,49 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3329 (N-H urea), 1656 (C=O urea), 1597 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,61 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,74 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,65 (1H, s, NH), 9,48 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,9 (C=O urea), 144,0 (m, J_{C-F} 239, C-2'), 143,3, 139,6 (m, J_{C-F} 248, C-4'), 138,5, 138,2 (m, J_{C-F} 249, C-3'), 127,8, 118,8, 114,7 (ddd, $^2J_{C-F}$ 23, $^3J_{C-F}$ 14, $^4J_{C-F}$ 4, C-1'); δ_F (376,5 MHz, DMSO- d_6) -146,2 (2F, dd, 3J 24, 4J 5,1, 2 x 2'-F), -159,2 (2F, t, 3J 23, 2 x 4'-F), -164,0 (1F, dd, 3J 23,3, 4J 5,0, 2 x 3'-F).

4-[[2'-Metoxifenil]amino]carbonil}aminobencenosulfonamida (MST-108):

Se trató 4-amino-bencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 2-metoxifenilo (0,43 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante una noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-108 como un sólido blanco con un rendimiento del 40,4%. p.f. 234-236 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,47 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33 %); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3362 (N-H urea), 2838 (C-H alifático), 1684 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 3,92 (3H, s, CH_3), 6,94 (1H, ddd, J 8,2, 7,4, 1,4, 4'-H), 7,01 (1H, ddd, J 8,0, 7,4, 1,6, 5'-H), 7,07 (1H, dd, J 8,2, 1,2, 3'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 7,77 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 8,16 (1H, dd, J 8,0, 1,6, 6'-H), 8,38 (1H, s, NH), 9,73 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,0 (C=O, urea), 148,7, 143,8, 137,7, 129,2, 127,8, 123,2, 121,5, 119,4, 118,1, 111,7, 56,7 (CH_3).

4-[[4'-Acetilfenil]amino]carbonil}amino}bencenosulfonamida (MST-109):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-acetilfenilo (0,46 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-109 como un sólido blanco con un rendimiento del 46,6%. p.f. 258-260 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,27 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3300 (N-H urea), 1659 (C=O urea), 1590 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 2,56 (3H, s, CH_3), 7,26 (2H, s, SO_2NH_2), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2'-H), 7,67 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,79 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 7,96 (2H, d, J 8,8, 2 x 3'-H), 9,22 (1H, s, NH), 9,25 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 197,3 (C=O), 152,9 (C=O urea), 144,9, 143,4, 138,2, 131,7, 130,6, 127,8, 118,7, 118,4, 27,3 (CH_3).

4-[[2'-Isopropilfenil]amino]carbonil}amino}bencenosulfonamida (MST-110):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 2-isopropilfenilo (0,47 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 6 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-110 como un sólido blanco con un rendimiento del 48,7%. p.f. 226-227 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,65 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3361 (N-H urea), 2966 (C-H alifático), 1676 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,24 (6H, d, J 6,8, 2 x CH_3), 3,19 (1H, sept, J 6,8, CH), donde "sept" indica septeto, 7,14 (1H, ddd, J 7,9, 7,6, 1,6, 4'-H), 7,19 (ddd, J 7,9, 6,8, 1,2, 5'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,34 (1H, dd, J 7,6, 1,6, 3'-H), 7,65 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,68 (1H, dd, J 6,8, 1,2, 6'-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,11 (1H, s, NH), 9,37 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,8 (C=O urea), 144,0, 140,8, 137,6, 136,0, 127,8, 126,7, 126,3, 125,3, 124,8, 118,2, 27,8 (CH), 24,1 (2 x CH_3).

4-(((4'-Isopropilfenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-111):

Se trató 4-amino-bencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-isopropilfenilo (0,47 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 3 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-111 como un sólido blanco con un rendimiento del 58,5%. p.f. 226-227 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,50

5 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3351 (N-H urea), 2964 (C-H alifático), 1647 (C=O urea), 1590 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,22 (6H, d, J 6,8, 2 x CH_3), 2,87 (1H, sept, J 6,8, CH), 7,20 (2H, d, J 8,4, 2 x 3'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,40 (2H, d, J 8,4, 2 x 2'-H), 7,64 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 8,72 (1H, s, NH), 9,04 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 143,9, 143,2, 137,9, 137,6, 127,7, 127,5, 119,5, 118,3, 33,7 (CH), 24,9 (CH_3).

10 4-(((4'-Butilfenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-112):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-butilfenilo (0,51 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 3 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-112 como un sólido blanco con un rendimiento del 48,6 %. p.f. 243-245 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,54 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3333 (N-H urea), 2929 (C-H alifático), 1653 (C=O urea),

15 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 0,93 (3H, t, J 7,2, CH_3), 1,33 (2H, sext, J 7,4, CH_2), donde "sext" indica sexteto, 1,57 (2H, sept, J 7,4, CH_2), 2,56 (2H, t, J 7,6, CH_2), 7,14 (2H, d, J 8,6, 2 x 3'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,39 (2H, d, J 8,6, 2 x 2'-H), 7,63 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 8,71 (1H, s, NH), 9,04 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 143,9, 137,8, 137,6, 137,1, 129,5, 127,3, 119,5, 118,3, 35,1 (CH_2), 34,2 (CH_2), 22,6 (CH_2), 14,7 (CH_3).

20 4-(((4'-Butoxifenil)carbamoil)amino}bencenosulfonamida (MST-113):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-butoxifenilo (0,55 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-113 como un sólido blanco con un rendimiento del 46,0%. p.f. 236-239 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,60 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3361, (N-H urea), 2957 (C-H alifático), 1646 (C=O urea), 1592

25 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 0,97 (3H, t, J 7,6, CH_3), 1,48 (2H, sext, J 7,2, CH_2), 1,71 (2H, sext, J 6,8, CH_2), 3,96 (2H, t, J 6,4, CH_2), 6,90 (2H, d, J 9,2, 2 x 3'-H), 7,22 (2H, s, SO_2NH_2), 7,38 (2H, d, J 9,2, 2 x 2'-H), 7,63 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,75 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,62 (1H, s, NH), 9,02 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 155,1 (C=O urea), 153,3, 144,0, 137,5, 133,1, 127,7, 121,2, 118,2, 115,5, 68,2 (OCH_2), 31,7 (CH_2), 19,7 (CH_2), 14,6 (CH_3).

4-(((4'-Octilfenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-114):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-octilfenilo (0,67 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-114 como un sólido blanco con un rendimiento del 41,4%. p.f. 282-283 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,59 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3332 (N-H urea), 2924 (C-H alifático), 1653 (C=O urea), 1592

35 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 0,89 (3H, t, J 6,8, CH_3), 1,30 (12H, m, CH_2), 1,57 (2H, t, J 7,6, CH_2), 7,14 (2H, d, J 8,6, 2 x 3'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,39 (2H, d, J 8,6, 2 x 2'-H), 7,63 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 8,72 (1H, s, NH), 9,05 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 143,9, 137,8, 137,6, 137,1, 129,5, 127,7, 119,5, 118,2, 35,4 (CH_2), 32,2 (CH_2), 32,0 (CH_2), 29,7 (CH_2), 29,6 (CH_2), 29,5 (CH_2), 23,0 (CH_2), 14,9 (CH_3).

4-(((4'-Cianofenil)carbamoil)amino}bencenosulfonamida (MST-115):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-cianofenilo (0,42 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-115 como un sólido blanco con un rendimiento del 60,6%. p.f. 265-267 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,37 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3355 (N-H urea), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1695 (C=O urea), 1594

40 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,26 (2H, s, SO_2NH_2), 7,66 (2H, d, J 8,8), 7,68 (2H, d, J 9,2), 7,78 (2H, d, J 8,8, con solapamiento), 7,79 (2H, d, J 8,8, con solapamiento), 9,28 (1H, s, NH), 9,35 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,8 (C=O urea), 144,8, 143,2, 138,3, 134,2, 127,8, 120,1, 119,2, 118,8, 104,6 ($\text{C}\equiv\text{N}$).

4-(((2'-Cianofenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-116):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 2-cianofenilo (0,41 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó durante 1 día hasta que se formó un precipitado. El crudo obtenido se purificó mediante la cromatografía en columna con gel de sílice eluyendo con acetato de etilo/éter de petróleo 1/1 para dar MST-116 como un sólido blanco. p.f. 256-258 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,73 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3310 (N-H urea), 2231 ($C\equiv N$), 1696 (C=O urea), 1587 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,26 (1H, ddd, J 7,6, 7,2, 0,8, 4'-H), 7,27 (2H, s, SO_2NH_2), 7,67 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,70 (1H, ddd, J 8,4, 7,2, 1,6, 5'-H), 7,80 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 7,82 (1H, dd, 7,6, 1,6, 3'-H), 8,1 (1H, dd, J 8,4, 0,4, 6'-H), 8,90 (1H, s, NH), 9,78 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,8 (C=O urea), 143,2, 142,4, 138,4, 135,0, 134,1, 127,8, 124,5, 122,6, 118,7, 117,8, 103,6 ($C\equiv N$).

4-(((4'-Fenoxifenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-117):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-fenoxifenilo (0,61 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 5 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-117 como un sólido blanco con un rendimiento del 46,8%. p.f. 236-237 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,41 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3328 (N-H urea), 1653 (C=O urea), 1595 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,00 (2H, dd, J 8,8, 1,2, 3'-H), 7,03 (2H, d, J 9,0, 6'-H), 7,13 (1H, dt, J 7,5, 0,8, 8'-H), 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,40 (2H, dd, J 9,0, 7,5, 7'-H), 7,52 (2H, d, J 8,8, 2'-H), 7,65 (2H, d, J 9,2, 3-H), 7,76 (2H, d, J 9,2, 2-H), 8,84 (1H, s, NH), 9,08 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 158,5 (C=O urea), 153,3, 151,9, 143,8, 137,7, 136,2, 130,9, 127,7, 123,8, 121,2, 120,7, 118,7, 118,4.

4-[(Bifenil-2'-ilcarbamoil)amino]bencenosulfonamida (MST-118):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de bifenil-2-ilo (0,57 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-118 como un sólido blanco con un rendimiento del 40,0%. p.f. 229-231 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,75 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3365 (N-H urea), 1675 (C=O urea), 1584 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,20 (1H, d, J 7,4), 7,22 (2H, s, SO_2NH_2), 7,27 (1H, dd, J 7,4, 1,6), 7,39 (1H, dt, J 8,4, 1,6, 10'-H), 7,46 (2H, dt, J 6,8, 1,6), 7,54 (1H, d, J 7,6, 6'-H), 7,58 (2H, d, J 9,2, 2 x 3-H), 7,74 (2H, d, J 9,2, 2 x 2-H), 7,83 (1H, s, NH), 7,95 (1H, d, J 8,0, 3'-H), 9,41 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,6 (C=O urea), 144,0, 139,5, 137,8, 136,4, 134,2, 131,5, 130,2, 129,9, 128,9, 128,6, 127,9, 124,8, 124,0, 118,3.

4-[(3'-Nitrofenil)carbamoil]amino}bencenosulfonamida (MST-119):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 3-nitrofenilo (0,47 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante 1 día, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-119 como un sólido amarillo con un rendimiento del 44,3%. p.f. 246-248 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,39 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3370 (N-H urea), 1709 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,59 (1H, dd, J 8,4, 8,0, 5'-H), 7,65 (2H, d, J 9,0, 2 x 3-H), 7,73 (1H, ddd, J 8,4, 2,0, 0,8, 6'-H), 7,76 (2H, d, J 9,0, 2 x 2-H), 7,86 (1H, ddd, J 8,0, 2,4, 0,8, 4'-H), 8,58 (1H, t ap, J 2,2, 2'-H)—donde "t ap" indica triplete aparente—, 9,25 (1H, s, NH), 9,35 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 149,1, 143,3, 141,6, 138,3, 131,1, 127,7, 125,5, 118,8, 117,6, 113,3.

4-(((4'-Metoxi-2'-metilfenil)amino)carbonil)amino}bencenosulfonamida (MST-120):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-metoxi-2-metilfenilo (0,47 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante la noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-120 como un sólido blanco con un rendimiento del 40,1%. p.f. 240-241 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,35 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3313 (N-H urea), 2835 (C-H alifático), 1647 (C=O urea), 1591 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 2,25 (3H, s, CH_3), 3,76 (3H, s, OCH_3), 6,78 (1H, dd, J 8,8, 2,8, 5'-H), 6,84 (1H, d, J 2,8, 3'-H), 7,22 (2H, s, SO_2NH_2), 7,55 (1H, d, J 8,8, 6'-H), 7,63 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,75 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 7,96 (1H, s, NH), 9,26 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 156,6 (C=O urea), 153,7, 144,2, 137,4, 132,3, 130,7, 127,8, 125,3, 118,1, 116,4, 112,2, 56,1 (OCH_3), 19,0 (CH_3).

4-[[[(9H-Fluoren-2-ilamino)carbonil]amino]bencenosulfonamida (MST-121):

Se le añadió gota a gota isocianato de 9H-fluoren-2-ilo (0,59 g; 2,90 mmoles) disuelto en 10 ml de acetonitrilo a una solución de 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) en acetonitrilo (20 ml). La reacción se agitó durante 1 hora a Ta, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-121 como un sólido blanco con un rendimiento del 62,0%. p.f. 280-285 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,52 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3329 (N-H urea), 1648 (C=O urea), 1591 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 3,94 (2H, s, CH_2), 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,29 (1H, t ap, J 7,2, 4'-H), 7,39 (1H, t ap, J 7,2, 5'-H), 7,46 (1H, d, J 7,2, 3'-H), 7,58 (1H, d, J 7,2, 6'-H), 7,67 (1H, d, J 8,4, 2 x 3-H), 7,78 (1H, d, J 8,4, 2 x 2-H), 7,83 (3H, m, 2'-H, 7'-H, 8'-H), 8,94 (1H, s, NH), 9,14 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 144,9, 143,8, 143,5, 142,0, 139,3, 137,7, 136,4, 127,8, 127,6, 126,8, 125,9, 121,2, 120,2, 118,4, 118,2, 116,2, 37,4 (CH_2).

4-[(Ciclopentilcarbamoil)amino]bencenosulfonamida (MST-122):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de ciclopentilo (0,32 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a 50 °C durante 2 horas, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-122 como un sólido blanco con un rendimiento del 68,8%. p.f. 224-226 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,57 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3328 (N-H urea), 3055 (C-H alifático), 1684 (C=O urea), 1591 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,41 (2H, m, 2 x 3'-H_{ax}), 1,58 (2H, m, 2 x 2'-H_{ax}), 1,67 (2H, m, 2 x 2'-H_{ecuatorial}), 1,88 (2H, m, 2 x 3'-H_{ecuatorial}), 3,98 (1H, sext, J 6,8, 1'-H), 6,35 (1H, d, J 6,8, NH), 7,18 (2H, s, SO_2NH_2), 7,55 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,70 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,68 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 155,3 (C=O urea), 144,6, 136,8, 127,7, 117,6, 51,8 (C-1'), 33,7 (C-2'), 24,1 (C-3').

4-[[[(3,5-dimetilfenil)amino]carbonilamino]bencenosulfonamida (MST-123):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con 3,5-dimetilfenil isocianato (0,43 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante la noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-123 como un sólido blanco con un rendimiento del 60,6%. p.f. 235-236 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,58 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3343 (N-H urea), 2860 (C-H alifático), 1686 (C=O urea), 1595 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 2,27 (6H, s, 2 x CH_3), 6,68 (1H, s, 4'-H), 7,12 (2H, s, 2'-H), 7,23 (2H, s, SO_2NH_2), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,67 (1H, s, NH), 9,06 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,1 (C=O urea), 143,8, 140,1, 138,7, 137,7, 127,7, 124,7, 118,3, 117,1, 22,0 (2 x CH_3).

4-[[[(4'-clorofenil)amino]carbonilamino]bencenosulfonamida (MST-124):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con isocianato de 4-clorofenilo (0,44 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante la noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-124 como un sólido blanco con un rendimiento del 89,4%. p.f. 239-240 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,44 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3327 (N-H urea), 1652 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,24 (2H, s, SO_2NH_2), 7,38 (2H, d, J 8,8, 2 x 2'-H), 7,53 (2H, d, J 8,8, 2 x 3'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,97 (1H, s, NH), 9,13 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,1 (C=O urea), 143,6, 139,2, 137,9, 129,6, 127,7, 126,6, 120,9, 118,5.

4-[[[(2,3-dihidro-1H-inden-5-ilamino)carbonilamino]bencenosulfonamida (MST-125):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con 5-indanilisocianato (0,46 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante la noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-125 como un sólido blanco con un rendimiento del 60,6%. p.f. 233-235 °C; TLC con gel de sílice R_f 0,61 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3333 (N-H urea), 2844 (C-H alifático), 1653 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 2,04 (2H, c ap, J 7,4, 2'-H), en donde "c ap" indica cuarteto aparente, 2,85 (4H, c ap, J 7,4, 2 x 1'-H, 2 x 3'-H), 7,16 (1H, d ap, J 8,2, 6'-H), en donde "d ap" indica doblete aparente, 7,19 (1H, dd ap, J 8,2, 1,6, 7'-H), en donde "dd ap" indica doblete aparente, 7,25 (2H, s, SO_2NH_2), 7,42 (1H, s, 4'-H), 7,63 (2H, d, J 8,8, 2 x 3-H), 7,75 (2H, d, J 8,8, 2 x 2-H), 8,70 (1H, s, NH), 9,06 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O urea), 145,2, 143,9, 138,4, 137,6, 127,8, 125,2, 118,3, 117,7, 115,7, una señal de carbono con solapamiento, 33,48, 32,64, 26,15 (3 x CH_2).

4-[[[4-(trifluorometil)fenil]amino]carbonil]amino]bencenosulfonamida (MST-126):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con 4-trifluorometil-fenilisocianato (0,54 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante una noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-126 como un sólido blanco con un rendimiento del 96,1%. p.f. 281-283 °C; TLC con gel de sílice

- 5 R_F 0,49 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3334 (N-H urea), 1657 (C=O urea), 1592 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2), 7,66 (2H, d, J 8,8, 2 x 3'-H), 7,72 (4H, m, 2 x 2'-H, 2 x 3'-H), 7,78 (2H, d, J 8,8, 2 x 2'-H), 9,24 (1H, s, NH), 9,26 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,0 (C=O, urea), 144,0 (m, C-1'), 143,4 (C-4), 138,2 (C-1), 127,7 (2 x C-2), 127,0 (c, $^3J_{C-F}$ 3,8, C-3'), donde "c" indica cuarteto, 125,4 (c, J_{C-F} 269, CF_3), 123,0 (c, $^2J_{C-F}$ 32, C-4'), 119,0 (2 x C-2'), 118,7 (2 x C-3); δ_F (376,5 MHz, DMSO- d_6) -60,1 (3F, s).

10 4-[[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]aminocarbonil]amino]]bencenosulfonamida (MST-127):

Se trató 4-aminobencenosulfanilamida (0,50 g; 2,90 mmoles) con 3,5-bis(trifluorometil)fenilisocianato (0,74 g; 2,90 mmoles) y la reacción se agitó a Ta durante una noche, tratada como se describe en el procedimiento general anteriormente indicado para dar MST-127 como un sólido blanco con un rendimiento del 81,4%. p.f. 228-229 °C; TLC con gel de sílice R_F 0,62 (acetato de etilo/éter de petróleo al 33%); ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3374 (N-H urea), 1653 (C=O urea),

- 15 1596 (aromático); δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2), 7,69 (2H, d, J 9,0, 3-H), 7,71 (1H, s, 4'-H), 7,79 (2H, d, J 9,0, 2-H), 8,16 (2H, s, 2 x 2'-H), 9,43 (1H, s, NH), 9,54 (1H, s, NH); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O, urea), 143,1, 142,5, 138,5, 131,7 (c, $^2J_{C-F}$ 32, 2 x C-3'), 127,7 (2 x C-2), 124,2 (c, J_{C-F} 272, 2 x CF_3), 119,2 (m, 2 x C-2'), 119,1 (2 x C-3), 115,7 (m, C-4'); δ_F (376,5 MHz, DMSO- d_6) -61,7 (6F, s).

Compuestos Ureido-sustituídos (MST-128-133):20 Materiales y métodos

Los disolventes anhidros y todos los reactivos se compraron de Sigma-Aldrich, Alfa Aesar y TCI. Todas las reacciones que implican compuestos sensibles al aire o a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno utilizando técnicas de cristalería y jeringas secas para transferir soluciones. Los espectros de infrarrojos (IR) se registraron como placas de KBr y se expresan en cm^{-1} . Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) (1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, HSQC, HMBC) se registraron usando un espectrómetro Bruker Advance III 400 MHz en MeOH- d_4 o en DMSO- d_6 . Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). Los patrones de división se designan como se indica: s, singlete; d, doblete; sept, septeto; t, triplete; c, cuarteto; m, multiplete; s ancho, singlete ancho ("broad singlet"); dd, doble doblete; t ap, triple aparente ("apparent triplet"); c ap, cuarteto aparente ("apparent quartet"). La asignación de protones intercambiables (OH y NH) se confirmó mediante la adición de D_2O . La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de gel de sílice F-254 de Merck. Las purificaciones de cromatografía flash se realizaron en gel de sílice 60 de Merck (230-400 de malla ASTM) como la fase estacionaria y se utilizaron el acetato de etilo/ n -hexano o MeOH/DCM como eluyentes. Los puntos de fusión (p.f.) se realizaron en tubos capilares abiertos y no son corregidos.

3-(3-(4'-Yodofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-128):

- 35 3-(3-(4'-Yodofenil)ureido)bencenosulfonamida (**A**): p.f. 256-258 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3165, 3265, 1643, 1589; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,34-7,66 (9H, m, Ar-H, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 8,10 (1H, d, J , 2,1, 2-H), 8,79 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,08 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,1 (C=O), 145,6, 140,9, 140,3, 138,3, 130,3, 122,1, 121,6, 119,9, 116,1, 85,9; Elem. Anal. Calc. [C, 37,42; H, 2,90; N, 10,07]; Encontrado [C, 37,06; H, 2,79; N, 9,82]; m/z (ESI $^+$) 418 (M+Na) $^+$.

40 3-(3-(4'-Fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-129):

3-(3-(4'-Fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (**B**): p.f. 233-235 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3377, 3352, 1685, 1557; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,17 (1H, dd, J 8,8, Ar-H), 7,45 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,47-7,60 (5H, m, Ar-H), 8,10 (1H, d, J , 2,1, 2-H), 8,78 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,04 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 158,4 (d, J_{C-F} 237, C-4'), 153,4 (C=O), 145,6, 141,1, 136,6, 130,3, 122,0, 121,2, 119,8, 116,3, 116,1; δ_F (376 MHz,

DMSO- d_6) -121,14; Elem. Anal. Calc. [C, 50,48; H, 3,91; N, 13,58]; Encontrado [C, 49,98; H, 3,79; N, 13,49]; m/z (ESI⁺) 311 (M+Na)⁺.

3-(3-(3'-Nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-130):

5 3-(3-(3'-Nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (**C**): p.f. 252-255 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3380, 3350, 1689, 1550; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,41 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,48-7,64 (4H, m, Ar-H), 7,77 (1H, dd, J 7,2, 2,1, Ar-H), 7,87 (1H, dd, J 7,2, 2,1, Ar-H), 8,14 (1H, d, J 2,1, 2-H), 8,63 (1H, d, J 2,1, 2'-H), 9,23 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,31 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,3 (C=O), 149,1, 145,7, 141,7, 140,6, 131,0, 130,3, 125,4, 122,4, 120,2, 117,4, 116,4, 113,2; Elem. Anal. Calc. [C, 46,43; H, 3,60; N, 16,66]; Encontrado [C, 46,91; H, 3,55; N, 16,94]; m/z (ESI⁺) 337 (M+Na)⁺.

10 3-(3-(4'-Acetilfenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-131):

15 3-(3-(4'-Acetilfenil)ureido)bencenosulfonamida (**D**): p.f. 267-269 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3402, 3351, 2014, 1933, 1912, 1593; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 2,56 (3H, s, CH_3), 7,41 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,48-7,55 (3H, m, 4-H, 5-H, 6-H), 7,60 (2H, d, J 7,2, 2 x 2'-H), 7,97 (2H, d, J 7,2, 2 x 3'-H), 8,13 (1H, t, J 2,0, 2-H), 9,18 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,19 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 197,2 ($CH_3C=O$), 153,0 (C=O), 145,7, 145,0, 140,7, 131,6, 130,5, 130,4, 122,2, 120,2, 118,2, 116,2, 27,2; Elem. Anal. Calc. [C, 54,04; H, 4,54; N, 12,60]; Encontrado [C, 54,31; H, 4,47; N, 12,96]; m/z (ESI⁺) 334 (M+Na)⁺.

3-(3-(2'-Isopropilfenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-132):

20 3-(3-(2'-Isopropilfenil)ureido)bencenosulfonamida (**E**): p.f. 175-176 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3328, 3300, 1690, 1556; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,23 (6H, d, J 6,2, 2 x 8'-H₃), 3,19 (1H, sept, J 6,2, 7'-H), 7,14 (2H, m, Ar-H), 7,35 (1H, d, J 7,2, Ar-H), 7,37 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,59-7,70 (4H, m, Ar-H), 8,00 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 8,10 (1H, t, J 2,0, 2-H), 9,30 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,9 (C=O), 145,6, 141,3, 140,7, 136,1, 130,3, 126,7, 126,2, 125,2, 124,7, 121,7, 119,5, 115,8, 27,8, 24,0; Elem. Anal. Calc. [C, 57,64; H, 5,74; N, 12,60]; Encontrado [C, 58,14; H, 5,73; N, 12,70]; m/z (ESI⁺) 334 (M+Na)⁺.

3-(3-(Perfluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-133):

25 3-(3-(Perfluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (**F**): p.f. 224-227 °C; ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3390, 3287, 1785, 1560; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,38 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,50 (2H, m, Ar-H), 7,63 (1H, d, J 7,2, Ar-H), 8,09 (1H, s, 2-H), 8,63 (1H, s, $ArNHCONH$, intercambio con D_2O), 9,47 (1H, s, $ArNHCONH$, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,9 (C=O), 145,6, 144,1 (d, J^1_{C-F} 245), 140,7, 139,6 (d, J^1_{C-F} 253), 138,2 (d, J^1_{C-F} 245), 130,4, 122,3, 120,4, 116,4, 114,7 (t, J_{C-F} 12); δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -146,3 (2F, dd, J 19,2, 4,8, 2 x 2'-F), -159,2 (1F, t, J 22,9, 4'-F), -164,0 (2F, dt, J 22,6, 4,8, 2 x 3'-F); Elem. Anal. Calc. [C, 40,95; H, 2,11; N, 11,02]; Encontrado [C, 40,68; H, 1,74; N, 11,00]; m/z (ESI⁺) 382 (M+Na)⁺.

Tabla 2: Datos de inhibición de AC con sulfonamidas ureido-sustituidas MST-128 a -133.

Compuesto		Ki(nM)		
	AC Ih	AC Ilh	AC IXh	ACX Ilh
MST-128	426	67	13,1	4,5
MST-129	414	59	10,2	5,8
MST-130	614	41	7,9	8,2
MST-131	762	74	15,1	12,8
MST-132	593	38	18,5	13,7
MST-133	69	5,4	4,2	4,8

Síntesis de Ureido-sulfonamidas Correspondientes a MST-134-1484-(3-(4'-cloro-2-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-134):

- 5 4-(3-(4'-Cloro-2-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,26-7,30 (3H, s ancho, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O , 5'/6'-H), 7,52 (1H, dd, J , 8,2, 2,1, 5'/6'-H), 7,64 (2H, d, J , 8,2, 2 x 2/3-H), 7,78 (2H, d, J , 8,2, 2 x 2/3-H), 8,19 (1H, dd, J , 9,0, 8,2, 3'-H), 8,79 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,47 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 152,8 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 245, C-2'), 152,7 (C=O), 143,2, 138,2, 127,8, 127,4, (d, $J_{\text{C-F}}$ 10), 126,7 (d, $J_{\text{C-F}}$ 10), 125,6, 122,5, 118,4, 116,6 (d, $J_{\text{C-F}}$ 23); δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -126,38.

4-(3-(4'-bromo-2'-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-135):

- 10 4-(3-(4'-Bromo-2'-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,40 (1H, d, J , 9,2 5'/6'-H), 7,64 (3H, m, 2 x 2/3-H, 5'/6'-H), 7,78 (2H, d, J , 9,2, 2 x 2/3-H), 8,16 (1H, t, J , 8,8, 3'-H), 8,79 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,48 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 152,8 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 245, C-2'), 152,7 (C=O), 143,2, 138,2, 128,5, 127,9, 127,7 (d, $J_{\text{C-F}}$ 6), 122,8, 119,2 (d, $J_{\text{C-F}}$ 22), 118,4, 114,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ 9); δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -126,38.

4-(3-(2'-fluoro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-136):

- 15 4-(3-(2'-Fluoro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,28 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,60 (1H, dd, J , 9,2, 6,8, 6'-H), 7,70 (2H, d, J , 9,2, 2 x 2/3-H), 7,80 (2H, d, J , 9,2, 2 x 2/3-H), 7,96 (1H, m, 4'-H), 9,13 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,18 (1H, m, 6'-H), 9,57 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 156,0 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 251, C-2'), 154,8 (C=O), 144,9, 142,9, 138,6, 129,3 (d, $J_{\text{C-F}}$ 12), 127,9, 119,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ 9), 118,7, 117,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ 22), 115,7; δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -119,43.

4-(3-(2',4',5'-trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-137):

- 25 4-(3-(2',4',5'-Trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,68 (3H, m, 2 x 2/3-H, 3'-H), 7,78 (2H, d, J , 9,2, 2 x 2/3-H), 8,22 (1H, m, 6'-H), 8,58 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,47 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 152,7 (C=O), 148,2 (dd, $J^1_{\text{C-F}}$ 240, 12,2), 146,4 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 237, 15,8), 144,4 (dd, $J^1_{\text{C-F}}$ 250, 12,0), 143,3, 138,3, 127,8, 125,0 (m), 118,5, 109,5 (dd, $J_{\text{C-F}}$ 24,5, 2,9), 106,4 (dd, $J_{\text{C-F}}$ 25,6, 22,0); δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -130,64 (d, $J_{\text{F-F}}$ 13,9), -141,75 (m), -143,06 (d, $J_{\text{F-F}}$ 24,4).

4-(3-(2'-fluoro-5'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-138):

- 30 4-(3-(2'-Fluoro-5'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,28 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,47 (1H, m, 4'-H), 7,55 (1H, dd, J , 10,8, 8,8, 3'-H), 7,67 (2H, d, J , 8,8, 2 x 2/3-H), 7,79 (2H, d, J , 8,8, 2 x 2/3-H), 8,63 (1H, m, 6'-H), 9,03 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,56 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 154,0 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 247, C-2'), 152,8 (C=O), 143,0, 138,5, 129,30 (d, $J_{\text{C-F}}$ 11,3), 127,9, 126,2 (dd, $J_{\text{C-F}}$ 31,8, 3,3), 123,5, 120,7 (m), 118,6, 117,7, 117,0 (d, $J_{\text{C-F}}$ 20,5); δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -60,7 (3F, C-F₃), -123,8 (1F, 2'-F).

4-(3-(2'-fluoro-3'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-139):

- 35 4-(3-(2'-Fluoro-3'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida: $\nu_{\max}$ (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,43 (2H, m, 5'-H, 6'-H), 7,65 (2H, d, J , 8,8, 2 x 2/3-H), 7,79 (2H, d, J , 8,8, 2 x 2/3-H), 8,46 (1H, m, 4'-H), 8,96 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,53 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) 152,7 (C=O), 150,0 (d, $J^1_{\text{C-F}}$ 250, C-2'), 143,1, 138,3, 129,4 (d, $J_{\text{C-F}}$ 9), 127,8, 125,9 (d, $J_{\text{C-F}}$ 43,9), 124,9, 122,2, 120,4, 118,7, 117,5 (dd, $J_{\text{C-F}}$ 32,1, 3,2); δ_{F} (376 MHz, DMSO- d_6) -59,8 (3F, d, $J_{\text{F-F}}$ 13,2, C-F₃), -132,2 (1F, c, J , 13,2, 2'-F).
- 40

4-(3-(2',3',4'-trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-140):

4-(3-(2',3',4'-Trifluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,27 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,34 (2H, m, 5'/6'-H), 7,65 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,77 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,88 (1H, m, 5'/6'-H), 8,82 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,45 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,9 (C=O), 146,6 (d, J^1_{C-F} 237), 143,2, 141,8 (d, J^1_{C-F} 240), 139,6 (d, J^1_{C-F} 242), 138,3, 127,8, 126,0 (m), 118,5, 116,7 (m), 112,6 (dd, J_{C-F} 18, 4); δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -143,1 (1F, d, J_{F-F} 21,7, 2'/4'-F), -148,4 (1F, d, J_{F-F} 21,7, 2'/4'-F), -161,1 (1F, t, J_{F-F} 21,7, 3'-F).

4-(3-(2'-fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-141):

4-(3-(2'-Fluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,07 (1H, m, 3'-H), 7,20 (1H, m, 4'-H), 7,26 (3H, s ancho, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O , 5'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,80 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 8,20 (1H, m, 6'-H), 8,70 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,46 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,1 (d, J^1_{C-F} 240), 152,9 (C=O), 143,4, 138,1, 128,1, 127,8, 125,4, 123,8, 121,7, 118,3, 116,6 (d, J_{C-F} 19); δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -129,59.

4-(3-(2',4'-difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-142):

4-(3-(2',4'-Difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,08 (1H, m, 3'/5'-H), 7,25 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,36 (1H, m, 3'/5'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,78 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 8,11 (1H, m, 6'-H), 8,64 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,41 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 158,1 (dd, J_{C-F} 243, 13), 153,4 (dd, J_{C-F} 244, 12), 153,0 (C=O), 143,4, 138,1, 128,1, 127,8, 124,5 (d, J_{C-F} 9), 123,2 (d, J_{C-F} 8), 118,4, 112,0 (d, J_{C-F} 21), 104,8 (t, J_{C-F} 25); δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -117,52, -124,3.

4-(3-(3'-clorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-143):

4-(3-(3'-Clorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,07 (1H, d, J 8,8, 4'-H), 7,25 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,33 (2H, m, 5'-H, 6'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,77 (3H, m, J 8,8, 2 x 2/3-H, 2'-H), 9,04 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,17 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,1 (C=O), 143,5, 141,8, 138,0, 134,1, 131,3, 127,7, 122,7, 118,7, 118,6, 117,8.

4-(3-(2',5'-diclorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-144):

4-(3-(2',5'-Diclorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3166, 3270, 1640, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,15 (1H, dd, J 8,8, 2,8, 4'-H), 7,28 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,55 (1H, dd, J 8,8, 2,8, 3'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,79 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 8,35 (1H, d, J 2,8, 6'-H), 8,60 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,90 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,7 (C=O), 143,1, 138,4, 137,8, 132,9, 131,5, 127,9, 124,0, 121,3, 121,1, 118,7.

4-(3-(2'-Cloro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-145):

4-(3-(2'-Cloro-5'-nitrofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3164, 3271, 1641, 1592; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,29 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,70 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,82 (3H, m, 2 x 2/3-H, 3'-H), 7,93 (1H, dd, J 8,9, 2,2, 4'-H), 8,84 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,20 (1H, d, J 2,2, 6'-H), 9,99 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,7 (C=O), 147,5, 142,9, 138,6, 137,7, 131,3, 128,9, 127,9, 118,8, 118,5, 115,6.

4-(3-(2'-Cloro-4'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-146):

4-(3-(2'-Cloro-4'-(trifluorometil)fenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3169, 1639, 1560; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,29 (2H, s, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O), 7,69 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,74 (1H, dd, J 8,8, 4,0, 5'-H), 7,80 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,92 (1H, dd, J 4,0, 3'-H), 8,50 (1H, d, J 8,8, 6'-H), 8,76 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 10,0 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 152,5, 143,0, 140,4, 138,5, 128,7, 127,9, 127,2 (m), 125,8 (m), 124,0 (d, J_{C-F} 33,0), 13,2, 122,7, 121,4; δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -60,42.

4-(3-(2',6'-difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-147):

4-(3-(2',6'-Difluorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3164, 3270, 1641, 1590; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,33 (4H, m, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O , 2 x 5'-H), 7,37 (1H, m, 4'-H), 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,76 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 8,30 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,38 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 158 (d, $J^{1\text{ C-F}}$ 247, C-2', C-6'), 153,27 (C=O), 143,7, 138,0, 128,3 (m), 127,7, 118,5, 115,9 (t, $J_{\text{C-F}}$ 16, C-4'), 112,6 (d, $J_{\text{C-F}}$ 23, 2 x C-3'); δ_F (376 MHz, DMSO- d_6) -118,73.

4-(3-(perclorofenil)ureido)bencenosulfonamida (MST-148):

4-(3-(perclorofenil)ureido)bencenosulfonamida: ν_{max} (KBr) cm^{-1} , 3168, 3275, 1641, 1590; δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 7,24 (2H, m, SO_2NH_2 , intercambio con D_2O) 7,64 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 7,75 (2H, d, J 8,8, 2 x 2/3-H), 8,29 (1H, s, NH, intercambio con D_2O), 9,38 (1H, s, NH, intercambio con D_2O); δ_C (100 MHz, DMSO- d_6) 153,2 (C=O), 142,0, 139,2, 130,1 (señales con solapamiento), 127,4, 125,5.

Tabla 3: Los datos de inhibición de AC con las sulfonamidas ureido-sustituídas MST-134-148

Compuesto	Ki(nM)			
	AC Ih	AC IIh	AC IXh	AC XIIh
MST-134	436	162	5,1	7,9
MST-135	373	418	6,3	7,4
MST-136	519	276	7,3	7,6
MST-137	569	215	7,6	6,2
MST-138	363	170	7,4	10,1
MST-139	395	196	8,7	8,5
MST-140	484	335	9,6	6,4
MST-141	550	33,0	7,7	7,3
MST-142	275	60,6	3,7	7,1
MST-143	158	10,0	8,4	8,5
MST-144	747	58,2	8,9	6,8
MST-145	307	0,94	8,2	6,1
MST-146	192	0,97	8,4	8,2
MST-149	158	0,93	6,1	8,3
MST-150	538	362	6,3	7,6

Para los ejemplos restantes, los siguientes métodos e información adicional serán una referencia útil.

Ha de notar que los compuestos no incluidos dentro del ámbito de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Cultivo celular y exposición hipóxica

La adquisición, la generación y el cultivo de las líneas celulares 4T1, 66cl4 y 67NR de cáncer de mama de ratón y las líneas celulares MDA-231 y MDA-231 LM2-4 de cáncer de mama humano que expresan la luciferasa se han descrito anteriormente (Lou et al, (2008) Dev Dyn 237:2755-2768; Lou et al, (2011) Cancer Res, 71:3364-3376). Para el cultivo en hipoxia, las células se mantuvieron en O_2 al 1% y en CO_2 al 5% equilibrado con N_2 a 37°C en una incubadora humidificada en una estación de trabajo anaeróbica sellada.

Generación de células estables

Los vectores de ARNhc micro-adaptado ("shRNAmir") que actúan sobre ACIX de ratón y una secuencia no silenciadora (Open Biosystems) se transfectaron en células confluentes al 90% usando LipofectAMINEPLUS™ (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Debido a la utilización previa de puromicina, las células transfectadas se seleccionaron usando higromicina. Se derivaron clones estables de ACIXhc mediante la clonación de dilución limitada. Para la (re-)introducción de ACIX en las células, ACIX humana (regalo del Dr. Jacques Pouyssegur, Universidad de Niza) se transfirió en células 4T1 siguiendo el mismo procedimiento y se utilizó la Zeocina para la selección.

Medición del pH extracelular

Los cambios en el pH de la solución se evaluaron utilizando procedimientos publicados previamente. En resumen, las células se plaquearon a una densidad apropiada (1×10^4 células/cm² para las células 4T1 y sus derivados transfectados, 2×10^4 células/cm² para las células 66cl4, 1×10^4 células/cm² para células 67NR y sus derivados transfectados) en portaobjetos de 60 mm y se les permitió recuperar durante la noche. A continuación se añadió un volumen estándar de 3 ml de medio fresco/portaobjetos y se incubaron las células en normoxia (aire + CO₂ al 5%) o hipoxia (O₂ al 1% y CO₂ al 5% equilibrado con nitrógeno) durante 72 horas. Se tomó la precaución de asegurar que los cultivos cultivados en normoxia e hipoxia estuvieron de confluencia similar y que contuvieron números de células similares en el momento de recoger el medio. Los medios gastados que se recogieron se mantuvieron a 37°C y el pH se midió inmediatamente usando un pH-metro digital. Se realizaron recuentos de células para asegurar que los números de células para una determinada línea celular fueron comparables en ambas condiciones ambientales. Las células se obtuvieron en hielo para análisis de qRT-PCR y Western blot.

Inhibidores farmacológicos

Las propiedades químicas de la sulfonamida, MST-017, se han descrito anteriormente bajo el nombre de ACI 17 ("CAI 17" en inglés) (Supuran, C. 2008, Nature. Vol. 7: 168 - 181). Las ureido sulfonamidas son nuevas. Para los estudios in vitro, los compuestos se disolvieron en DMSO, se mantuvieron a -80°C y se diluyeron en el medio de cultivo justo antes de la aplicación. Las células subconfluentes se incubaron con MST-017 durante 72 horas en normoxia o en hipoxia, se lavaron 3 veces en PBS (tampón fosfato salino) y se capturaron imágenes utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan™. Para los estudios in vivo, el inhibidor MST-017 se administró mediante inyección por vía i.p. (las dos primeras dosis se administraron por vía i.v.) a 75 mg/kg y 150 mg/kg 3 veces por semana durante 2 semanas. Las concentraciones y programas de dosificación para los otros inhibidores se indican en los ejemplos apropiados que siguen. Los compuestos se solubilizaron en PEG400/etanol/solución salina antes de la inyección. Los componentes de excipiente se mantuvieron constantes a medida que se variaron las concentraciones de inhibidor.

Análisis de ARNm y expresión de proteína

La técnica PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se llevó a cabo en placas de 384 pocillos en un instrumento de Applied Biosystems utilizando una Roche Universal Probe Library (UPL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, 1 µg de ARN total de células subconfluentes o de tejido congelado instantáneamente se utilizó para fabricar ADNc.

Se cargaron en cada pocillo 10 µl de mezcla de qRT-PCR que contenía 100 nM de sonda UPL, 200 nM de cada cebador (Invitrogen) y mezcla maestra de PCR de TaqMan™ (Applied Biosystems) durante 40 ciclos de PCR (44). Los datos de la cuantificación de la expresión génica relativa se adquirieron y se analizaron usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT y el método estándar de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando la β -actina como el gen constitutivo. Para la inmunotransferencia, las células o el tejido de tumor congelado instantáneo se lisaron en tampón de Triton X-100 al 1% (50 mM Hepes, pH=7,5, 150 mM de NaCl, glicerol al 10%, 1 mM de EGTA y 2 mM de EDTA), suplementado con los inhibidores apropiados. Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles SDA-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Para mejorar la detección de HIF-1 α antes de la degradación, las células a densidades iguales se lisaron directamente en tampón de carga de 4x SDS en hipoxia. Se realizaron los Western blot usando los anticuerpos ACIX de ratón (1:500), HIF-1 α (1:250), ACIX humana (1:1000) (todos de R & D Systems) y β -actina (1:10.000, Sigma).

Modelos de tumor de ratón

Todos los estudios y procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Animal Care Committee del BC Cancer Research Center y la Universidad de British Columbia (Vancouver, BC, Canadá).

Tumores ortotópicos singénicos y metástasis espontánea

Se implantaron ortotópicamente las células 4T1 (1×10^6) o células 67NR (2×10^6) en la cuarta almohadilla de grasa mamaria de ratones hembras BALB/c de 7 a 9 semanas de edad como se ha descrito anteriormente (Lou et al, (2011) Cancer Res 71: 3364-3376; Lou et al, (2008) Dev Dyn 237:2755-2768). La inyección de números de células de esta magnitud es estándar para la propagación de estos tumores, y los números están muy por debajo de los usados en otros modelos de crecimiento tumoral (Erler, JT. Bennewith, KL. Icolau, M. Nature 440: 1222-1226). Las tasas de crecimiento del tumor primario se calcularon a través de las medidas por calibre usando la fórmula elipsoide modificada $(L \times W^2)/2$. Se monitorizaron y se cuantificaron la formación de tumores y la progresión de metástasis utilizando bioluminiscencia por

imágenes como se ha descrito anteriormente (Ebos et al., (2009) Cancer Cell 15:232-239.; Lou et al., (2008) Dev Dyn 237:2755-2768).

Ensayos de metástasis

Para los estudios que implican el agotamiento génico de ACIX, se inyectaron células 4T1 o 67NR (5×10^5) directamente en la vena de la cola de ratones hembras BALB/c de 7 a 9 semanas de edad. Se captaron imágenes de los ratones una vez por semana para seguir el crecimiento de las metástasis. Se les aplicó la eutanasia a los ratones 20 días después de la inyección y se resecaron los pulmones para un análisis posterior. La carga tumoral en el pulmón se cuantificó contando manualmente los nódulos visibles en la superficie pulmonar. Para los estudios que utilizaron inhibidores de sulfonamidas, se inyectaron células 4T1 ($1-5 \times 10^5$) como se ha descrito anteriormente (Pacchiano et al, (2011) J Med Chem 54:1896-1902).

Tumores de xenoinjerto humano

Para los estudios que implican el agotamiento del ACIX, 1×10^7 de células MDA-MB-231 suspendidas en una solución de Matrigel/PBS al 50% se implantaron subcutáneamente en ratones hembras NOD.CB17-prkdc^{scid}/J de 6 a 8 semanas de edad. Para los xenoinjertos de tumores de mama primarios que usaban la variante MDA-MB-231 LM2-4^{Luc+} (Ebos et al, (2009) Cancer Cell 15:232-239), se implantaron 2×10^6 de células ortotópicamente en ratones como se ha descrito anteriormente. La terapia se inició cuando los tumores alcanzaron 200 mm³. Para ambos modelos, el crecimiento tumoral se monitorizó con la medición por calibre.

Ensayo de invasión de 3D Matrigel

Se realizó un ensayo de cultivo "en la parte superior" de 3D Matrigel ("3D "on top" Matrigel"), como se ha descrito anteriormente (Lee et al, (2007) Nat Methods 4:359-365). En resumen, se resuspendieron las células MDA-231 LM2-4 Luc+ (1.5×10^4 células/cm²) en medios de cultivo de 100 µl/pocillo que contenían 2 veces la concentración final del inhibidor y se plaquearon en portaobjetos de cámaras de 8 pocillos previamente recubiertas con Matrigel. Las células se dejaron unir durante 45 minutos con agitación de lado a lado cada 10-15 minutos para evitar la aglutinación de células en el centro del pocillo. Se les añadió a las células un medio adicional de 100 µl/pocillo que contenía Matrigel al 10% y los cultivos se incubaron en hipoxia durante 4 días. Se captaron las imágenes y se fijaron los cultivos para TUNEL usando la metodología de "fijación completa del cultivo" ("whole culture fixation") descrita en Lee et al. (2007) Nat Methods 4:359-365).

Cultivo de tumoresferas

Se cultivaron las células 4T1 como monocapas con subcultivo dos veces por semana en DMEM (Gibco) que contenía el 5% de suero bovino fetal (FBS) (Sigma). Posteriormente, las células 4T1 de NShc y ACIXhc se cultivaron como tumoresferas en medios de MammoCult™ (StemCell Technologies, Vancouver, B.C., Canadá) según las instrucciones del fabricante.

(Los tumoresferas son estructuras tridimensionales (a menudo de forma esférica) compuestas de células de cáncer adherentes que se forman cuando las células tumorales se cultivan in vitro bajo condiciones de crecimiento específicas (Fillmore y Kuperwasser, (2008) Breast Cancer Res. 10: R25). Los tumoresferas generalmente crecen en cultivos de suspensión y se consideran el sustituto in vitro de tumores in vivo.)

Análisis citométrico de flujo

Los tumoresferas 4T1 se incubaron con tripsina, se lavaron una vez en tampón HF, "HF Buffer", (HBSS que contenía un 2% de suero bovino fetal), luego se tiñeron con anti-CD24-APC y anti-CD44-PECy7 usando 0,3 µl de anticuerpo por 106 células en 100 µl de HF, y se incubaron en hielo durante 10 min. Después de la incubación, las células se lavaron una vez con tampón HF y se resuspendieron en 300 µl de tampón HF que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; concentración final, 1 µg/ml). Las células se separaron en un clasificador de células Aria (BD Biosciences, San José, California, EE.UU.). Las células vivas se separaron según la dispersión frontal y lateral, y las células individuales se separaron según la dispersión frontal y el ancho de pulso. Los portales, o "gates", se determinaron mediante un análisis de células no teñidas, controles con especificidad de isotipo, y tinciones individuales. Las células CD44⁺CD24^{-baja} o CD44⁺CD24⁺ no se evaluaron en cuanto a la pureza debido al bajo número de células obtenidas. El contador de células de los citómetros de flujo se utilizó para determinar el número de células. Se recogieron las células en un medio de DMEM o tampón de HF.

Inmunohistoquímica

Dos horas antes de la escisión del tumor, los ratones se inyectaron por vía i.p. con una solución salina que contenía 1500 mg/kg de BrdUrd (Sigma) y 60 mg/kg de Pimonidazole (Chemicon), y por vía i.v. 5 minutos antes con DiOC7(3) (70 µl, 0,6 mg/ml; Molecular Probes). Se cortaron criosecciones de tumores en serie (10 µm) con un Cryostar™ HM560 (Microm International), se secaron al aire durante 24 horas, y se capturaron imágenes para la fluorescencia de tejido con DiOC7(3) para visualizar el flujo sanguíneo. Las secciones se fijaron en acetona/metanol al 50% (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente. La tinción se realizó utilizando el anticuerpo anti-PECAM/CD31 (clon 1:2000, 2H8, BD Pharmingen) y anti-hámster secundario Alexa 647 (1:200, Invitrogen) para la vasculatura, anti-pimonidazole policlonal de conejo (1:2000, Hydroxyprobe Inc.) y anti-conejo secundario Alexa 488 (1:200, Molecular Probes) para la hipoxia, TUNEL (Roche Diagnostics) con dUTP marcado con un TMR rojo ("TMR red tagged") para la apoptosis. Después de captar las imágenes por fluorescencia los portaobjetos se transfirieron a agua destilada durante 10 min seguido de 1 hora de tratamiento con 2 M de HCl y 5 minutos de neutralización con 0,1 M de borato de sodio.

El BrdUrd incorporado por el ADN se detectó usando anticuerpo conjugado de peroxidasa anti-BrdUrd monoclonal de rata (1:500, clon BU1/75, Sigma) y anti-ratón (1:200, Sigma) y un sustrato de DAB reforzado con metal (1:10, Pierce). Los portaobjetos contrateñidos con hematoxilina se deshidrataron y se montaron utilizando Permount (Fisher Scientific) antes de captar las imágenes. La adquisición y el análisis de imágenes se realizaron como se ha descrito anteriormente (Kyle, AH., Huxham, LA., Yeoman, DM., et al 2007. Clin Cancer Res 13:2804-2810). Las secciones tumorales embebidas en parafina también se tiñeron para ACIX (1:100 para tumores primarios, 1:50 para metástasis pulmonares, Santa Cruz Biotechnology) y HIF-1α (1:100, R&D Systems) como se ha descrito anteriormente (Luo et al.). Para los estudios de linfangiogénesis, las secciones de tejido congelado se fijaron con PFA al 2% durante 20 minutos, y se tiñeron con anti-LYVE-1 de conejo (1:100, R&D Systems) y anti-CD31 de rata (1:100, BD Pharmingen) disueltos en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 10% y suero de cabra al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente en un recipiente con humidificación. Los anticuerpos anti-conejo Alexa 488 y anti-rata Alexa 546 se usaron como anticuerpos secundarios durante 1 hora seguida del medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) que contenía tinción de contraste nuclear DAPI para su montaje.

Ensayo de proliferación celular

El crecimiento celular se midió usando un kit de proliferación celular MTT (Roche Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se plaquearon en portaobjetos de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/cm² y se dejaron recuperar durante la noche. Muestras paralelas luego se incubaron en normoxia e hipoxia durante 48 a 72 horas antes de realizar el ensayo.

Ensayo de Apoptosis

Se empleó el marcado TUNEL (Roche Applied Science) para el análisis de la apoptosis en su mayoría de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células subconfluentes cultivadas en cubreobjetos se incubaron durante 48 horas bajo normoxia o hipoxia en suero al 1%, secadas al aire, fijadas en paraformaldehído al 4% durante 60 minutos y permeabilizadas durante 10 minutos en PBS y Triton-X-100 al 0,1% a temperatura ambiente. Las capas celulares luego se incubaron con los reactivos TUNEL durante 60 minutos a 37°C, se lavaron en PBS y se contratiñeron con una dilución de H33342, 1:10.000.

Análisis Clínico Histórico

Una micromatriz de tejido (TMA, o "tissue microarray") de 4.444 pacientes con un nuevo diagnóstico de cáncer de mama invasivo en la provincia de Columbia Británica de 1986 a 1992 se creó basada en muestras tumorales entregadas a un laboratorio central de receptores de estrógenos. Los métodos usados para crear las TMA se han descrito (Cheang, MD., Chia, SK., Vodu, D et al. 2009. J Natl Cancer Inst 101:736-750). La cohorte de TMA representaba aproximadamente el 70% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados durante este tiempo que fueron referidos a la British Columbia Cancer Agency. 3.630 casos tuvieron resultados adecuados de tumores y tinción para la evaluación de todos los biomarcadores. La inmunohistoquímica para ER, PR, HER2, CK 5/6, EGFR y Ki67 se realizó concurrentemente en secciones en serie y se puntuó como se ha descrito anteriormente (Cheang MD et al.). Se evaluó la expresión de ACIX usando un anticuerpo monoclonal murino (M75; 1:50) (Choi, SW., Kim, JY., Park, JY. 2008 Hum Pathol 39:1317-1322). La puntuación de la expresión de ACIX fue 0: nada de tinción o 1: algo de tinción y se realizó de forma independiente y a ciegas por 2 patólogos. La aprobación previa del estudio se obtuvo del Comité de Ética, "Ethics Committee", de la Universidad de Columbia Británica.

Análisis estadístico

Los resultados estuvieron sujetos a un análisis estadístico utilizando el Data Analysis ToolPack™ en el programa Excel. Los valores de p bilaterales se calcularon utilizando la prueba t de Student. Los datos se consideraron significativos para $p < 0,05$. El análisis estadístico para los resultados clínicos se realizó usando SPSS 13.0 (Chicago, Illinois), S-Plus 6.2 (Seattle, WA) y R 2.1.1 (<http://www.r-project.org>). En el análisis univariado, BCSS (la supervivencia específica del cáncer de mama; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de la muerte con el cáncer de mama como causa primaria o subyacente) y RFS (supervivencia libre de recidiva; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de una recurrencia local, regional o distante) y RFS distante (supervivencia libre de recidiva a distancia; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de una recurrencia a distancia) se estimaron por curvas Kaplan-Meier. Se utilizó la prueba de rango logarítmico para estimar las diferencias de supervivencia. Para el análisis multivariado, se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para estimar las razones de riesgo ajustado y su significación. Para evaluar las violaciones de modelos de riesgo proporcional, se utilizaron curvas suavizadas de residuos ponderados de Schoenfeld.

Ejemplo 2ACIX es un marcador pronóstico en una amplia cohorte de pacientes con cáncer de mama

Aunque estudios previos han informado que la expresión de ACIX en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, se correlaciona con el mal pronóstico del paciente como se ha descrito anteriormente, los tamaños de muestra han sido relativamente pequeños y los tratamientos adyuvantes no son uniformes. Para validar ACIX como marcador pronóstico importante en una población de muestra grande sujeta a un tratamiento estandarizado, analizamos la expresión de ACIX en una micromatriz de tejido (TMA) de tumor de mama primario que contenía 3992 muestras de pacientes con un seguimiento medio de 10,5 años.

Los métodos usados para crear las TMA se han descrito (Cheang, MD., Chia, SK., Vodu, D et al., 2009. J Natl Cancer Inst 101:736-750). La cohorte de TMA representaba aproximadamente el 70% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados durante este tiempo que fueron referidos a la British Columbia Cancer Agency. La expresión de ACIX se evaluó usando un anticuerpo monoclonal murino (M75; 1:50) (Choi, SW., Kim, JY, Park, JY. 2008 Hum Pathol 39:1317-1322). La puntuación de la expresión de ACIX fue 0: nada de tinción o 1: algo de tinción y se realizó de forma independiente y a ciegas por dos patólogos. La aprobación previa del estudio se obtuvo del Comité de Ética de la Universidad de Columbia Británica.

Análisis estadístico

Los resultados estuvieron sujetos a un análisis estadístico utilizando el Data Analysis ToolPack™ en el programa Excel. Los valores de p bilaterales se calcularon utilizando la prueba t de Student. Los datos se consideraron significativos para $p < 0,05$. El análisis estadístico para los resultados clínicos se realizó usando SPSS 13.0 (Chicago, Illinois), S-Plus 6.2 (Seattle, WA) y R 2.1.1 (<http://www.r-project.org>). En el análisis univariado, BCSS (la supervivencia específica del cáncer de mama; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de la muerte con el cáncer de mama como causa primaria o subyacente) y RFS (supervivencia libre de recidiva; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de una recurrencia local, regional o distante) y RFS a distancia (supervivencia libre de recidiva a distancia; la fecha de diagnóstico de cáncer de mama primario hasta la fecha de una recurrencia a distancia) se estimaron por curvas Kaplan-Meier. Se utilizó la prueba de rango logarítmico para estimar las diferencias de supervivencia. Para el análisis multivariado, se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox para estimar las razones de riesgo ajustado y su significación. Para evaluar las violaciones de modelos de riesgo proporcional, se utilizaron curvas suavizadas de residuos ponderados de Schoenfeld.

La expresión de ACIX se observó en el 15,6% de los tumores evaluables y ACIX se expresó diferencialmente entre los subtipos biológicos, con la mayor correlación en los cánceres de mama basales (el 51%) y la menor proporción en el subtipo A luminal (el 8%) (Tabla 5 abajo).

En los análisis de Kaplan-Meier, la expresión de ACIX se asoció significativamente con peor supervivencia libre de recidiva (Figura 1A), supervivencia libre de recidiva a distancia (Figura 1B) y supervivencia específica de cáncer de mama (Figura 1C), logrando niveles muy altos de significación estadística ($p < 10^{-17}$, $p < 10^{-16}$, y $p < 10^{-13}$, respectivamente). Las tasas de supervivencia libre de recidiva y supervivencia específica de cáncer de mama a 10 años en los grupos de ACIX positiva frente a los de ACIX negativa fueron del 57% en comparación con 73% y 62% en comparación con 78%, respectivamente. En los análisis multivariados, incluyendo todas las variables pronósticas estándares y subtipos biológicos, la expresión de ACIX permaneció un factor fuerte independiente de mal pronóstico con

una razón de riesgo de 1,4. Estos datos confirman y amplían los resultados de estudios previos que han demostrado que ACIX es un marcador pronóstico en un gran número de pacientes con cáncer de mama.

Este ejemplo proporciona evidencia de que los compuestos descritos en la invención serán terapéuticos para cualquiera de los cánceres susceptibles a metástasis, o aquellos que sobreexpresan ACIX, una diana ("target") mostrada en una gran base de datos de pacientes que se asocia con la supervivencia disminuida en pacientes.

Tabla 4. Expresión de ACIX según el subtipo biológico

Subtipo de Cáncer de Mama	N Total	N positivas en ACIX	% positivas en ACIX
LumA (ER o PR +, Her2 -, ki67 -)	1437	120	8%
LumB (ER o PR +, Her2-, ki67 +)	815	88	11%
Lum/HER2+ (Her2 +, ER o PR +)	213	36	17%
Her2+ (Her2+, ER -, PR-)	239	80	33%
Basal (ER-, PR-, Her2 -, CK56 o EGFR +)	327	168	51%

Arriba, LumA es luminal A; LumB es luminal B; ER es receptor de estrógeno; PR es receptor de progesterona; EGFR es receptor de factor de crecimiento epitelial.

Ejemplo 3

Los tumores metastásicos 4T1 se caracterizan por hipoxia y la expresión de ACIX

La Figura 2 muestra cultivos celulares, modelos de ratón con marcado bioluminiscente, y una tabla de expresión génica inducida por hipoxia para tres líneas celulares tumorales. En resumen, se inocularon las líneas celulares metastásicas (4T1, 66cl4) y no metastásicas (67NR) de tumor mamario de ratón que expresan la luciferasa de forma estable en la almohadilla de grasa mamaria de ratones. La formación de tumores y la progresión metastásica fueron monitorizadas por imágenes bioluminiscentes. Se aislaron las células de tumores primarios por la microdissección por captura láser y se realizó el análisis de expresión génica diferencial en células tumorales aisladas. (B) Se analizó el tejido tumoral de tres ratones de cada modelo celular para determinar la expresión de genes inducidos por hipoxia (expresión alta, oscurecido; expresión baja, claro).

Los tumores 67NR no metastásicos exhibían una alta densidad vascular, carecían en gran medida de hipoxia, y tenían un bajo número de células apoptóticas. Por el contrario, los tumores primarios derivados de las líneas celulares metastásicas, especialmente la línea celular 4T1, estaban mal vascularizados, y tenían grandes áreas de hipoxia y necrosis con un alto número de células apoptóticas (Figura 2). Entre los genes inducibles por hipoxia identificados en estos tumores, la expresión de ACIX, en particular, estaba elevada en ambas variantes metastásicas (Figuras 2 y 2).

Observamos niveles elevados de proteína ACIX localizada en la membrana plasmática en los tumores metastásicos, mientras que la expresión de ACIX estaba ausente en los tumores 67NR no metastásicos. En la Figura 3 se reproduce un Western blot que muestra la sobreexpresión de ACIX en los tumores primarios. NMG = glándula mamaria normal. La beta-actina sirvió como control de la carga.

Estos datos indican que la expresión de ACIX inducida por hipoxia puede ser crítica para aumentar el potencial metastásico de los tumores de mama primarios.

Ejemplo 4

Validación del modelo 4T1 con respecto a la expresión de ACIX, la regulación del pH y la supervivencia celular en hipoxia

Para estos experimentos, las células 4T1 se cultivaron durante 48 horas en normoxia o hipoxia y los niveles de expresión de ACIX se analizaron utilizando qRT-PCR y los Western blot con la beta-actina sirviendo de control. Los datos se expresan como media $\pm$ s.e.m. $n = 3$, $^{**}P < 0,005$, $^{***}P < 10^{-3}$. En un segundo paso, las células 4T1 expresando ARNhc no silenciador (NShc) o ARNhc que actúan sobre ACIX (ACIXhc) se incubaron durante 72 horas. Se analizaron dos clones independientes (C2, C5) que expresaban ACIXhc. Los datos se expresan como medias $\pm$ s.e.m. $n = 3$. $^{***}P < 0,0005$, en comparación con células cultivadas en normoxia. La expresión génica de ACIX en las células 4T1 se silenció mediante constructos de expresión estable que actúan sobre ACIX de ratón y se cultivaron las células en hipoxia para determinar la eficacia de ARNhc para inhibir la expresión de ACIX inducida por hipoxia.

Por consiguiente, las líneas celulares metastásicas, especialmente la línea celular 4T1, indujeron la expresión de ACIX en respuesta a la hipoxia (Figura 4A). Por el contrario, el cultivo en hipoxia no indujo la expresión de ACIX en la línea celular 67NR no metastásica. Las células 4T1 que expresaban un ARNhc no silenciador de control (NShc) aumentaron drásticamente la expresión de ACIX en hipoxia (Figura 4B), mientras que la expresión de ACIX inducida por hipoxia se atenuó notablemente en dos clones independientes (C2, C5) que expresaban ARNhc cuya diana es ACIX (ACIXhc; Figura 4B).

ACIX está funcionalmente ligado al control del pH de tumor a través de su regulación del pH intracelular y extracelular. La acidosis extracelular inducida por hipoxia es una medida de la actividad biológica de ACIX. La acidificación del medio extracelular en hipoxia se bloquea en los clones 4T1 que expresan ACIXhc en relación con las células 4T1 parentales y las 4T1 que expresan NShc, lo que sugiere que el silenciamiento de la expresión del gen ACIX induce la inhibición funcional de la regulación de pH en las células 4T1 metastásicas.

Las células 4T1 con depleción de ACIX mostraron una mayor muerte celular en comparación con las células de control no silenciadoras cuando se cultivaron en hipoxia (Figura 5). Esto sugiere que ACIX es importante para la supervivencia de las células de cáncer de mama metastásico en ambientes hipóxicos.

Ejemplo 5

Demostración In Vivo

El agotamiento estable de ACIX en el modelo de tumor de mama de ratón 4T1 inhibe el crecimiento y la metástasis del tumor primario como se muestra en la Figura 6. Específicamente, se usan imágenes bioluminiscentes representativas de metástasis espontánea utilizando el modelo de tumor 4T1 para demostrar este hallazgo. Se muestran mapas de calor en pseudo-color (claro, menos intenso; oscurecido, más intenso;) superpuestos en imágenes de los cuerpos murinos. Para estos estudios, las células 4T1 que expresan NShc o ACIXhc y las células parentales 4T1 se inocularon en la glándula mamaria de ratones BALB/c. Se monitorizaron los animales para el crecimiento tumoral. n=10 para cada grupo. Los resultados se expresan como medias $\pm$ s.e.m. *denota la terminación de la escisión del tumor primario de los grupos de control. *** $P < 10^{-11}$ con una prueba *t* de Student bilateral, en comparación con el grupo NShc.

Los resultados muestran que las células 4T1 forman fácilmente tumores que crecen de forma constante durante 30 días mientras que los tumores establecidos a partir de las células con depleción de ACIX retrocedieron significativamente después del crecimiento tumoral inicial (Figura 6A). La regresión de los tumores parecía estable, ya que sólo había dos ratones con recurrencia de tumor primario que surgió hacia el final del estudio (Figura 6B). Por lo tanto, la eliminación de la expresión de ACIX tiene un efecto dramático sobre la supervivencia total de los ratones. Mientras que los animales que tienen tumores que expresan ACIX se tienen que sacrificar debido a la enfermedad metastásica progresiva, la tasa de supervivencia de los animales inoculados con células 4T1 con depleción de ACIX permaneció al 100%.

La expresión de ACIX se disminuye en los tumores derivados de células 4T1 con depleción de ACIX. No hay diferencia en los niveles de expresión de ACXII entre los tumores 4T1 de ACIXhc y los tumores de control, lo que sugiere que la supresión del crecimiento tumoral en este modelo ocurre en presencia de ACXII, y que ACIX es la enzima crítica para la supervivencia y el crecimiento de tumores de mama hipóxicos.

Ejemplo 6

Modelos de tumores mamarios

El agotamiento estable de ACIX en el modelo de tumor de mama de ratón 4T1 inhibe el crecimiento y la metástasis del tumor primario. En la Figura 6(A) se visualizan metástasis espontáneas utilizando el modelo tumoral 4T1 utilizando mapas de calor de bioluminiscencia (más claro, menos intenso, más oscuro, más intenso;) superpuestos en imágenes de cuerpo en escala de grises. (B) Se inocularon las células 4T1 que expresan NShc o ACIXhc y células 4T1 parentales en la glándula mamaria de ratones BALB/c. Se monitorizaron diez animales en cada grupo para determinar el crecimiento tumoral. Las flechas indican cambios en el número de animales, y se indican los valores revisados. Los resultados se expresan como medias $\pm$ s.e.m. Un *** denota la terminación del tumor primario de los grupos de control. *** $P < 10^{-11}$ con una prueba *t* de Student bilateral, en comparación con el grupo NShc.

El agotamiento de ACIX en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama humano con ACIX ARNhc muestra una inhibición significativa de la expresión de ACIX inducida por hipoxia en estas células en relación con las células de control parentales y no silenciadoras (Figura 7). Además, el agotamiento de ACIX atenúa drásticamente el crecimiento tumoral de los xenoinjertos MDA-MB-231.

Figura 7 ilustra la evidencia de que el agotamiento estable de ACIX en un modelo de tumor de mama humano inhibe el crecimiento del tumor primario. Las células MDA-MB-231 que expresan NShc o ACIXhc y las células MDA-MB-231 parentales fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco de ratones NOD.CB17-prkdc^{scid}/J y se monitorizaron los animales para el crecimiento tumoral (n=7 para cada grupo). *P<0,01 con una prueba *t* de Student bilateral, en comparación con los tumores de control de NShc. En el diagrama de Figura 7, las células MDA-MB-231 que expresan ARNh_c micro-adaptado ("shRNA_{mir}") que actúan sobre ACIX humana (ACIXhc) o una secuencia de control no silenciadora (NShc) se cultivaron en normoxia o hipoxia durante 72 horas y se analizaron para determinar la expresión de ACIX inducida por hipoxia. Se muestra el Western blot. La β -actina sirvió como control de la carga.

Ejemplo 7

Modelo de metástasis

La línea celular 4T1 inyectada por vía intravenosa formó metástasis pulmonares fomicas y se les aplicó la eutanasia a los ratones dentro de 3 semanas posteriores a la inyección debido a la progresión metastásica, pero no se observó metástasis en los ratones que habían sido inoculados con las células con depleción de ACIX (Figura 8A). Las células tumorales con depleción de ACIX mostraron casi ninguna metástasis visible en los pulmones y permanecen completamente sanas (Figura 8B). Las células 67NR de control negativo, que no son espontáneamente metastásicas, muestran poca evidencia de metástasis después de tres semanas posteriores a la inyección, a pesar de que las células se concentraron en los pulmones a las 24 horas posteriores a la inyección.

Un análisis de los pulmones de los animales inyectados con las células que expresan ACIX mostró un gran número de nódulos en la superficie pulmonar, mientras que los pulmones de ratones inyectados con células con depleción de ACIX eran esencialmente normales (Figura 8C). El agotamiento estable de ACIX inhibe el establecimiento de metástasis pulmonares en el modelo 4T1.

La expresión de ACIX localizada en la membrana fue evidente en secciones histológicas de pulmones de animales de control, pero no de los ratones que tenían células con depleción de ACIX (Figura 8D).

Ejemplo 8

(Ejemplo de referencia)

Selectividad de MST-017

Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia de 10 μ M de MST-017. La Figura 9 muestra imágenes representativas del inhibidor marcado con FITC ligado a las líneas celulares en las condiciones indicadas. (C) Las células se cultivaron durante 72 horas con o sin MST-017 (400, 600 y 400 μ M para las células 4T1, 66c4 y 67NR, respectivamente). n=3. Se muestran los cambios medios de pH extracelular $\pm$ s.e.m.. Para cada línea celular, los cambios de pH extracelular en hipoxia se evaluaron con respecto a los valores basales del pH extracelular medidos en cultivos paralelos cultivados en normoxia. * P<0,001 con una prueba *t* de Student bilateral, en comparación con las células cultivadas sin el inhibidor.

El pH extracelular disminuyó drásticamente en hipoxia en las líneas celulares metastásicas 66c4 y 4T1 que expresan ACIX, pero se mantuvo al mismo nivel en los cultivos de 67NR que no expresan ACIX. El tratamiento de las células con MST-017 revirtió la acidificación del medio extracelular en condiciones de hipoxia en los cultivos de células 66c4 y 4T1 (Figura 9C).

Ejemplo 9

(Ejemplo de referencia)

Inhibición de tumor in vivo usando el compuesto de sulfonamida MST-017

El actuar sobre la actividad de ACIX con un inhibidor específico de molécula pequeña atenúa el crecimiento de tumores primarios 4T1 (Figura 10). En la Figura 10 (A), las células 4T1 se cultivaron en normoxia o hipoxia y los niveles de expresión de ACIX se analizaron mediante Western blot.

Los animales se inocularon ortotópicamente con células 4T1. Se dejaron establecer los tumores durante 14 días. Se inyectaron los ratones con las dosis indicadas de MST-017 3 veces por semana durante 2 semanas. En el panel izquierdo, el crecimiento tumoral se monitorizó con la medición por calibre. La iniciación y la terminación del tratamiento

se indican con las flechas (Figura 10B). Los animales tratados y no tratados con excipiente sirvieron de control. *P <0,02, **P <0,01 usando una prueba t de Student bilateral, en comparación con los controles de excipiente.

Los pesos de los animales tratados se monitorizaron como una medida de la toxicidad general del inhibidor. Los ratones se pesaron justo antes de cada dosis del inhibidor de ACIX. No se observaron diferencias significativas en los pesos entre los diversos grupos de tratamiento y control (Figura 10C).

Por consiguiente, el tratamiento de ratones que tenían los tumores 4T1 establecidos con MST-017 mostró una inhibición significativa de crecimiento tumoral en los ratones tratados en comparación con los controles de excipiente. Las concentraciones del inhibidor y el programa de dosificación se toleraron bien, ya que no se observó una reducción significativa de peso en los ratones tratados.

Los ratones tratados que tenían los tumores derivados de 67NR establecidos con concentraciones idénticas de MST-017 no mostraron ningún efecto significativo del inhibidor en comparación con el control de excipiente (Figura 11) y no se observó una reducción significativa de peso.

Ejemplo 10

Inhibición de metástasis in vivo con sulfonamidas novedosas, MST-104 y MST-119

El inhibidor de ACIX novedoso, MST-119, reduce la formación de metástasis por las células tumorales mamarias 4T1. La estructura química del inhibidor de ACIX, MST-119, se muestra en la Figura 12A. Las imágenes bioluminiscentes representativas de metástasis establecidas después de la inyección intravenosa de células 4T1 y el tratamiento con MST-119 se muestran en la figura 12B. Los animales se trataron 24 horas posteriores a la inoculación de las células. Se administraron tres dosis mediante inyección por vía i.p. durante 6 días y se captaron imágenes de los ratones 24 horas después de la tercera dosis del inhibidor. MST-119 se suministró en un excipiente compuesto del 37,5% de PEG400, el 12,5% de etanol y el 50% de solución salina. La cuantificación de la bioluminiscencia derivada del tumor se muestra en la figura 12C. Las regiones de interés se situaron alrededor de focos metastásicos y se calculó el flujo total (fotones/segundo) en la superficie del ratón. Los datos se informan como la media $\pm$ s.e.m. N = 4 por grupo. *P<0,05.

El inhibidor de ACIX novedoso, MST-104, reduce la formación de metástasis por las células tumorales mamarias 4T1 (Figura 13). Las células 4T1 se inyectaron directamente en la vena de cola de ratones BALB/c. El tratamiento diario durante 5 días con excipiente o MST-104 se inició a las 24 horas posteriores a la inoculación de las células y se captaron imágenes de los ratones 24 horas después de la dosis final. El excipiente y el inhibidor se administraron mediante una inyección por vía i.p.. Se muestran las imágenes representativas de la bioluminiscencia derivada de células tumorales en los animales de control y los tratados con inhibidores. (B) El gráfico muestra la cuantificación de la bioluminiscencia derivada del tumor. n = 6 por grupo. *P<0,01. La cuantificación de la señal bioluminiscente reveló una disminución estadísticamente significativa en la formación de metástasis en los ratones tratados. Estos datos proporcionan un ejemplo adicional de la inhibición de la formación de metástasis pulmonares por las células de cáncer de mama en respuesta a la inhibición que actúa sobre ACIX usando sulfonamidas novedosas.

Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento del tumor de mama primario humano con sulfonamidas novedosas

El inhibidor de ACIX novedoso, MST-104, reduce el crecimiento de los xenoinjertos de cáncer de mama primarios humanos. Las células MDA-MB-231 LM2-4^{Luc+} metastásicas se implantaron ortotópicamente en ratones NOD/SCID. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 200 mm³, los animales recibieron las dosis indicadas de MST-104 diariamente mediante la administración por vía i.p. y el crecimiento del tumor se cuantificó usando mediciones por calibre. Se indican la iniciación y la terminación del tratamiento con inhibidor. n = 8/grupo. *P<0,03, **P<0,001. Diagrama, Western blot que muestra la expresión de ACIX por las células LM2-4^{Luc+} cultivadas en normoxia (N) e hipoxia (H).

Para evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad de ACIX in vivo, tratamos ratones que tenían tumores MDA-231 LM2-4 establecidos (Ebos et al., 2009) con MST-104. Se observó que estas células indujeron fuertemente ACIX en hipoxia (Figura 14, diagrama). Observamos inhibición significativa, dependiente de la dosis, del crecimiento tumoral en ratones tratados con el inhibidor, en comparación con los controles de excipiente (Figura 14). Estos datos muestran la capacidad de los inhibidores de ACIX basados en sulfonamidas de actuar específicamente sobre los tumores de mama humanos que expresan ACIX.

Ejemplo 12Inhibición de la invasión inducida por hipoxia y supervivencia de las células de cáncer de mama humano cultivadas en cultivos de 3D Matrigel™ por Sulfonamidas novedosas

Las células MDA-MB-231 LM2-4^{LUC+} cultivadas en cultivos 3D Matrigel™ son invasivas en hipoxia (Figure 15). Se cultivaron las células en "la parte superior" de un ensayo de 3D Matrigel™ durante 4 días en normoxia e hipoxia como se ha descrito en los métodos. Se muestran las imágenes de contraste de fase representativas de los cultivos de 3D. La invasión inducida por hipoxia por la variante LM2-4, pero no por las células MDA-231 parentales.

El tratamiento con los inhibidores de ACIX de sulfonamidas novedosos atenúa la invasión inducida por hipoxia de las células de cáncer de mama humano cultivadas en los cultivos de 3D Matrigel™ (Figura 16). Se cultivaron las células en "la parte superior" de ensayos de 3D Matrigel™ durante 4 días en hipoxia en la presencia de inhibidores. Los cultivos de células tratados con DMSO sirvieron de control. Se indican el porcentaje de la concentración de DMSO y la concentración molar de inhibidores. Se muestran las imágenes de contraste de fase representativas. Estos datos muestran que las sulfonamidas inhiben la invasión de las células de cáncer de mama humano metastásico en hipoxia.

Los inhibidores de ACIX de ureido-sulfonamidas muestran efectos diferenciales sobre la muerte celular de las células de cáncer de mama humano en hipoxia (Figura 17). Se cultivaron las células en "la parte superior" de los ensayos de 3D Matrigel™. Se cultivaron las células en la presencia de inhibidores durante 4 días en hipoxia. Los cultivos de células tratados con DMSO sirvieron de control. (A) Imágenes representativas de células TUNEL positivas (flechas). (B) Un gráfico que muestra la cuantificación de las células TUNEL positivas a través de contar 5 campos aleatorios por condición. Los datos se expresan como el número medio de células TUNEL positivas/20x campo de visión (FOV—"field of view"). Estos datos muestran que los inhibidores de ACIX de sulfonamidas pueden inducir la muerte de las células de cáncer de mama humano en hipoxia.

Ejemplo 13El agotamiento génico de la expresión de ACIX en las células de cáncer de mama reduce la población de células madre del cáncer en hipoxia

La proliferación in vitro en suspensión, en condiciones libres de suero como tumoresferas no adherentes, es una característica de las células madre del cáncer de mama. La población de células madre del cáncer de mama se ha caracterizado previamente por mostrar la firma CD44⁺CD24^{-baja} (Al-Hajj et al, (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:3983-3988); (Ponti et al, (2005) Cancer Res 65:5506-5511). La Figura 18 muestra que la expresión de ACIX es necesaria para el crecimiento de la población "iniciadora de tumoresferas" y la eficiencia de formación de tumoresferas en hipoxia. (A) Se cultivaron las células NShc y ACIXhc de 4T1 a diluciones dobles y se cultivaron en condiciones que causan la formación de tumoresferas en normoxia o hipoxia. Se evaluó el número de células necesarias para iniciar el crecimiento de tumoresferas. Se muestra la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. *P<0,03, **P<0,006. (B) Se cultivaron las células NShc y ACIXhc de 4T1 como tumoresferas en normoxia o hipoxia, desagregadas y la población CD44⁺CD24^{-baja} se evaluó mediante análisis FACS. Los datos mostrados son los cambios medios en % de células CD44⁺CD24^{-baja} $\pm$ SEM, de 3 experimentos independientes. *P<0,004, **P<0,025.

No se observó una diferencia significativa en el número de células requeridas para formar tumoresferas entre NShc y ACIXhc de 4T1 en normoxia, ya que ACIX no se induce en ninguna de las dos líneas celulares con niveles normales de oxígeno (Figura 18A). El número de células NShc de 4T1 requeridas para formar tumoresferas se redujo significativamente en hipoxia, en comparación con los controles de normoxia, lo que sugiere que el porcentaje de células madre de cáncer (CMC) es significativamente mayor en los cultivos hipóxicos (Figura 18A). Es importante notar que la disminución de la expresión de ACIX mediada por ARNi ("RNAi") aumentó de manera significativa el número de células de propagación requeridas para formar una tumoresfera en hipoxia, lo que muestra que la expresión de ACIX es necesaria para la expansión similar a CMC observada en hipoxia con células de control NShc de 4T1.

En la Figura 18B, las células NShc y ACIXhc de 4T1 se cultivaron en condiciones que causan la formación de tumoresferas, en normoxia o hipoxia, y se analizaron mediante FACS para cuantificar la presunta población similar a CMC marcada como CD44⁺CD24^{-baja}. En los controles de NShc, la población CD44⁺CD24^{-baja} se aumenta significativamente en condiciones de cultivo hipóxico, en comparación con los controles de normoxia (Figura 18B). Sin embargo, la disminución de ACIX mediada por ARNi agota significativamente esta población en hipoxia, lo que muestra que se requiere ACIX para la expansión similar a CMC de CD44⁺CD24^{-baja} en hipoxia (Figura 18B).

Ejemplo 14MST-104 puede agotar la población de células madre del cáncer en tumores ortotópicos de mama humanos in vivo

- 5 La Figura 19 muestra que el tratamiento de xenoinjertos de cáncer de mama primarios humanos con el inhibidor de ACIX, MST-104, actúa sobre la población de células madre del cáncer in vivo. Las células MDA-MB-231 LM2-4^{luc+} se implantaron ortotópicamente en ratones NOD/SCID. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de 200 mm², los animales recibieron un excipiente o 38 mg/kg de MST-104 diariamente mediante inyección por vía i.p.. (A) Se retiraron los tumores primarios, se evaluaron las poblaciones de células disociadas y ESA+ mediante el análisis FACS. Se muestran los gráficos de puntos FACS representativos que demuestran el porcentaje de células ESA+. (B) Los datos
- 10 indicados son los cambios medios en las células ESA+ $\pm$ SEM, de 3 ratones. **P<0,0224.

- Los tumores tratados con excipiente contenían una población media de ESA+ al 10%. En comparación, los tumores tratados con el inhibidor de ACIX de sulfonamida, MST-104, también mostraron una población de células ESA+ significativamente disminuida, en comparación con los tumores de control tratados con excipiente. Estos datos muestran que las sulfonamidas pueden agotar la población de células madre del cáncer de mama humano *in vivo*.
- 15

- Mientras que las realizaciones específicas de la invención se han descrito y se han ilustrado, tales realizaciones se deben de considerar ilustrativas de la invención solamente y no limitativas de la invención según se interpretan de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.
- 20

REVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 a. 4-[[[4'-Fluorofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-104); o
b. 4-[[[3'-Nitrofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-119)

para el uso en terapia.

10 2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica comprende 4-[[[4'-Fluorofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-104).

15 3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica comprende 4-[[[3'-Nitrofenil]carbamoil]amino]bencenosulfonamida (MST-119).

15 4. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición farmacéutica inhibe la actividad de ACIX relacionada con tumores en mayor medida que inhibe la actividad de ACI y ACII in vitro.

20 5. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición farmacéutica inhibe la actividad de ACXII relacionada con tumores en mayor medida que inhibe la actividad de ACI y ACII in vitro.

25 6. El uso de la composición farmacéutica descrito en cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para suprimir las metástasis de tumores, reduciendo el número de células o la masa de cáncer de mama, agotando células madre del cáncer en una población de células madre del cáncer mamífero, o induciendo la muerte celular en la células de cáncer hipóxicas en un mamífero.

30 7. El uso descrito en la reivindicación 6, en el que el mamífero se trata también con agentes anticancerígenos adicionales.

8. El uso descrito en la reivindicación 6, en el que el tumor sobreexpresa ACIX o ACXII.

35 9. El uso descrito en la reivindicación 6, en el que el tumor es un carcinoma de mama.

40 10. El uso de la composición farmacéutica descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer para prevenir o reducir las metástasis en un mamífero, en el que el mamífero tiene cáncer de mama, carcinoma pulmonar, carcinoma pancreático, carcinoma renal, carcinoma ovario, carcinoma prostático, carcinoma cervical, glioblastoma o carcinoma colorrectal.

40 11. El uso de la composición farmacéutica descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores y metástasis en un mamífero.

45 12. El uso descrito en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 en el que el mamífero es humano.

45 13. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en suprimir las metástasis de tumores, reduciendo el número de células o la masa de cáncer de mama, agotando células madre del cáncer en una población de células madre del cáncer mamífero, o induciendo la muerte celular en la células de cáncer hipóxicas en un mamífero.

50 14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento del cáncer para prevenir o reducir las metástasis en un mamífero, en el que el mamífero tiene cáncer de mama, carcinoma pulmonar, carcinoma pancreático, carcinoma renal, carcinoma ovario, carcinoma prostático, carcinoma cervical, glioblastoma o carcinoma colorrectal.

55 15. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento de tumores y metástasis en un mamífero.

Figura 1

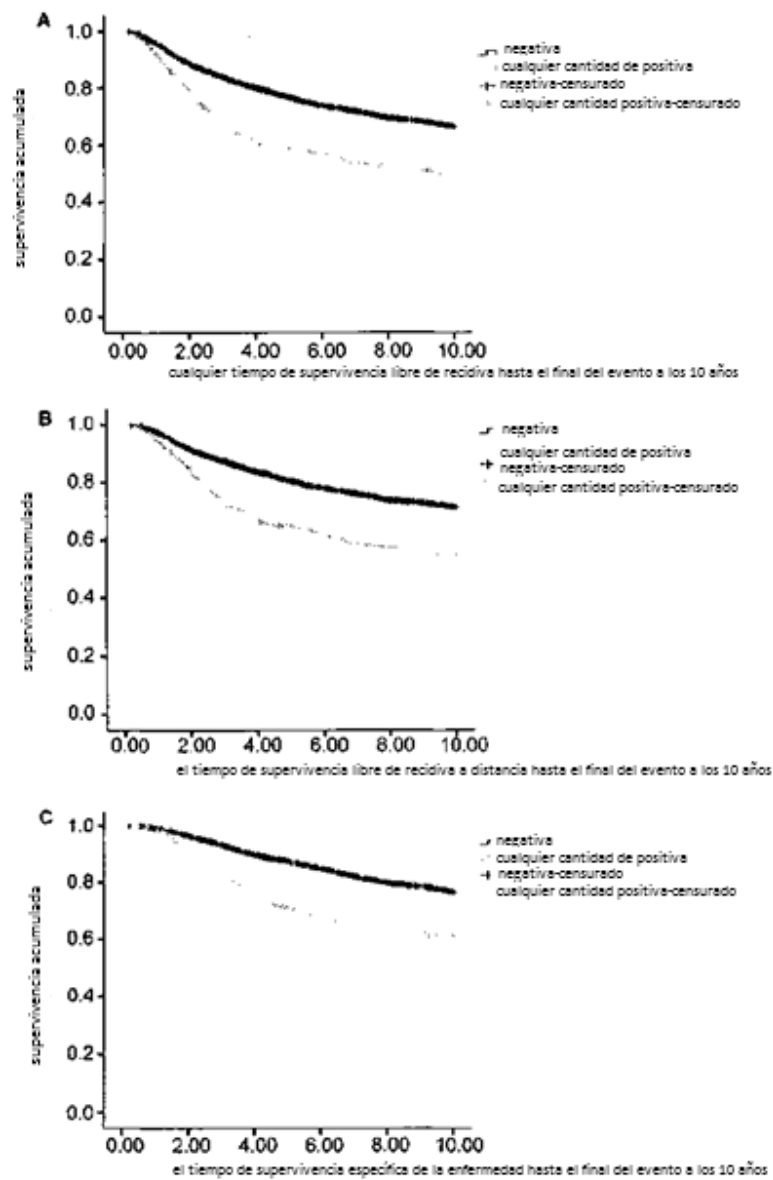


Figura 2

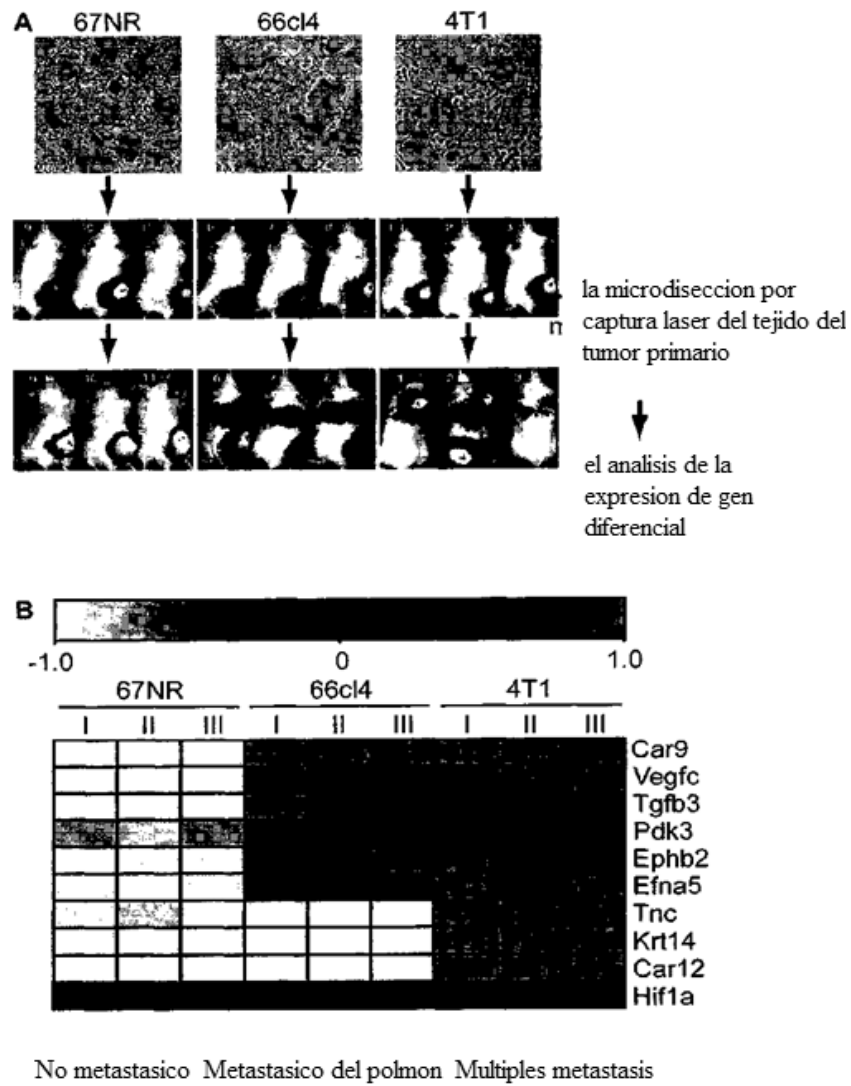


Figura 3

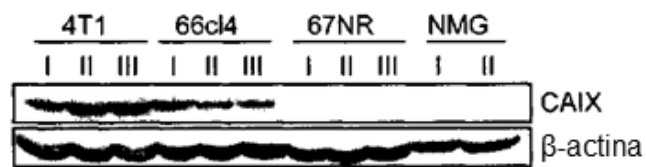


Figura 4

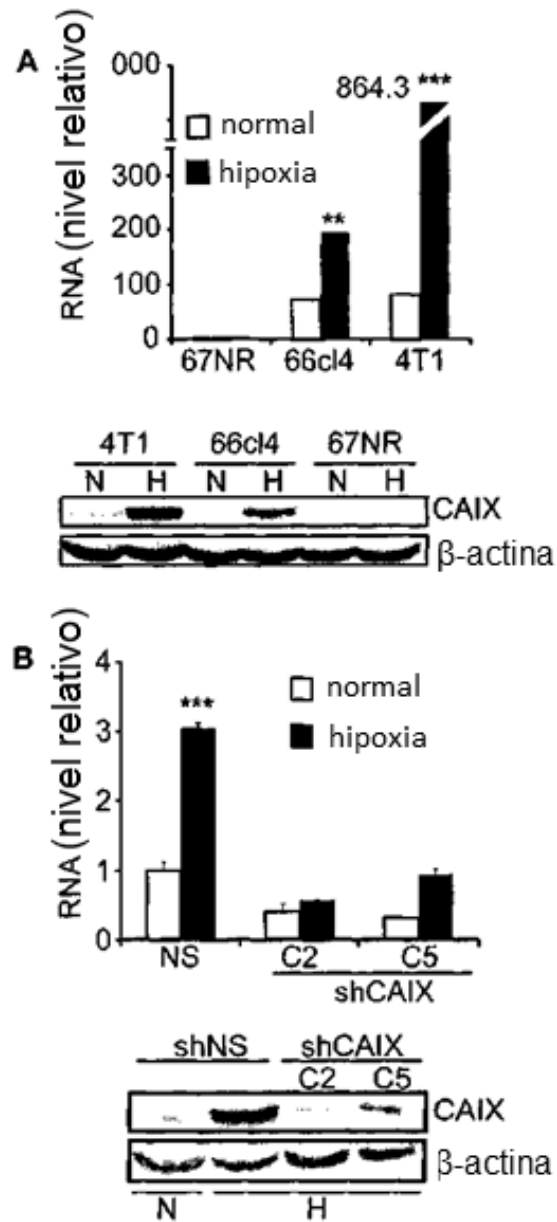


Figura 5

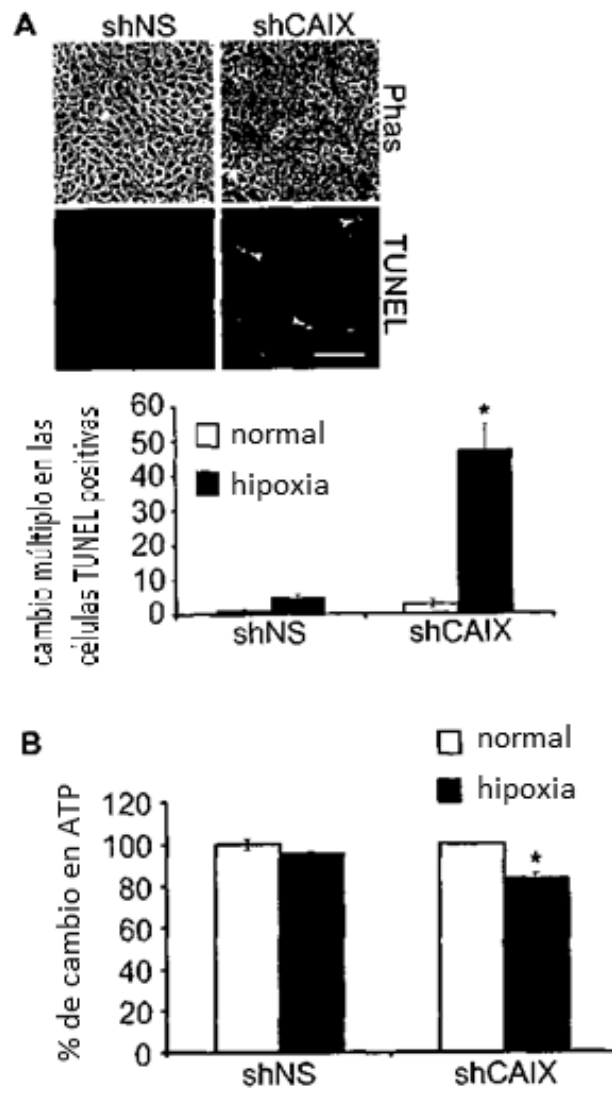


Figura 6

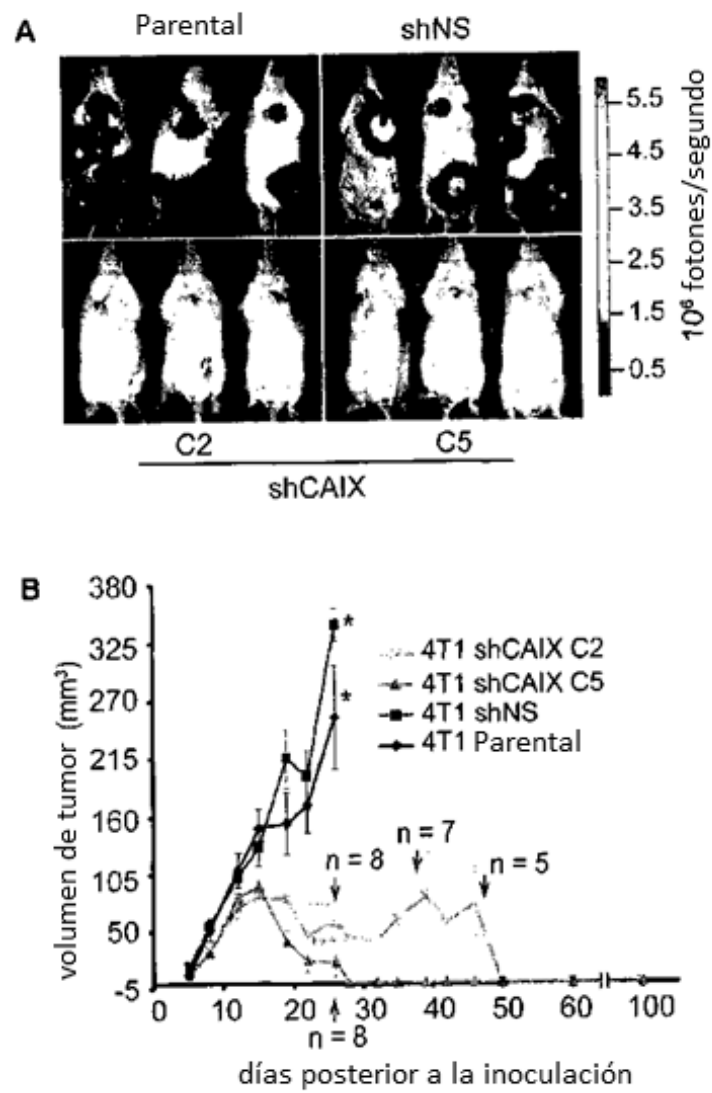


Figura 7

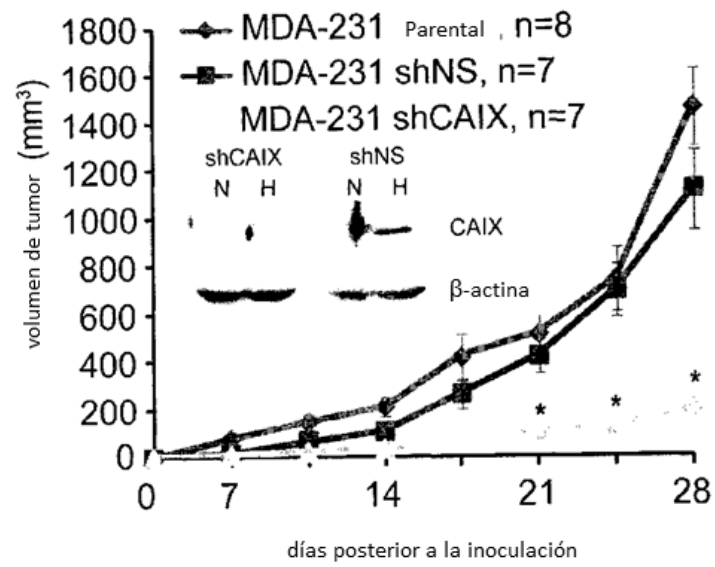


Figura 8

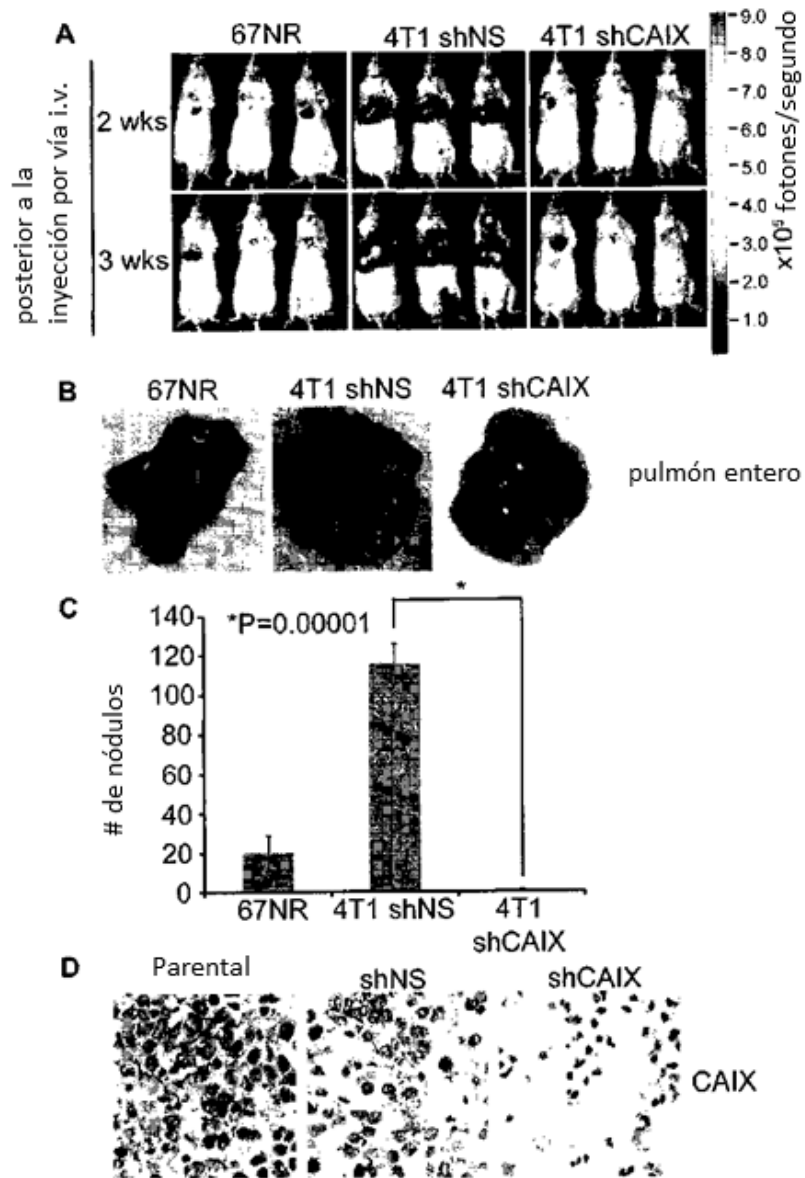


Figura 9

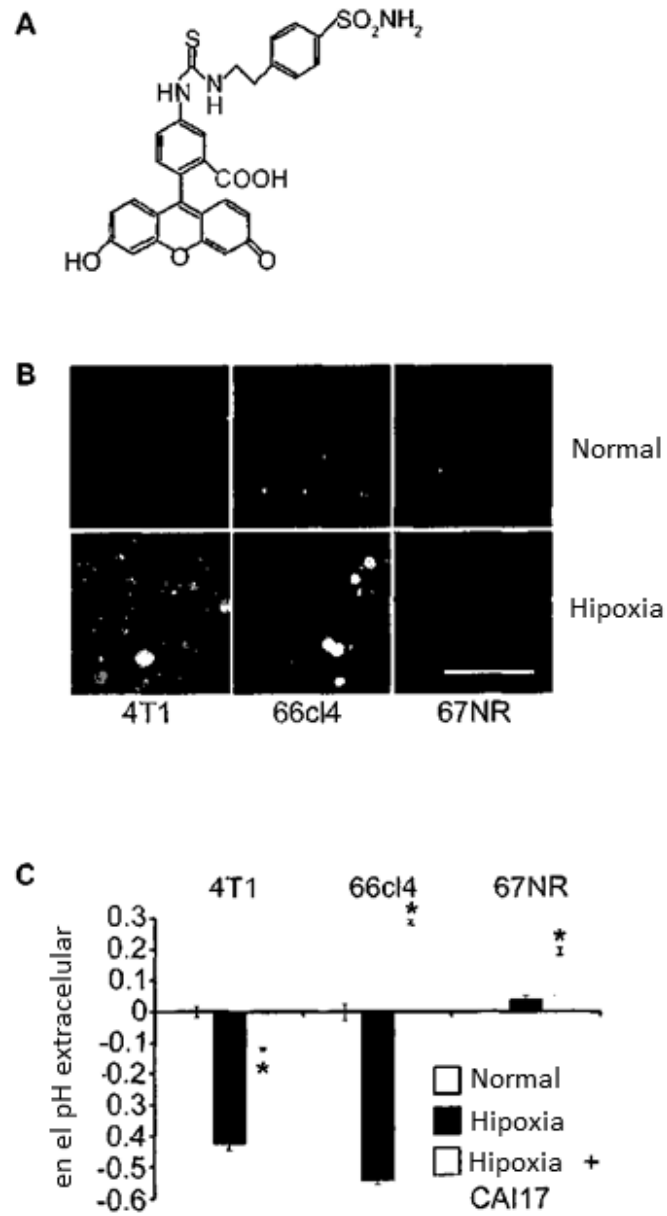


Figura 10

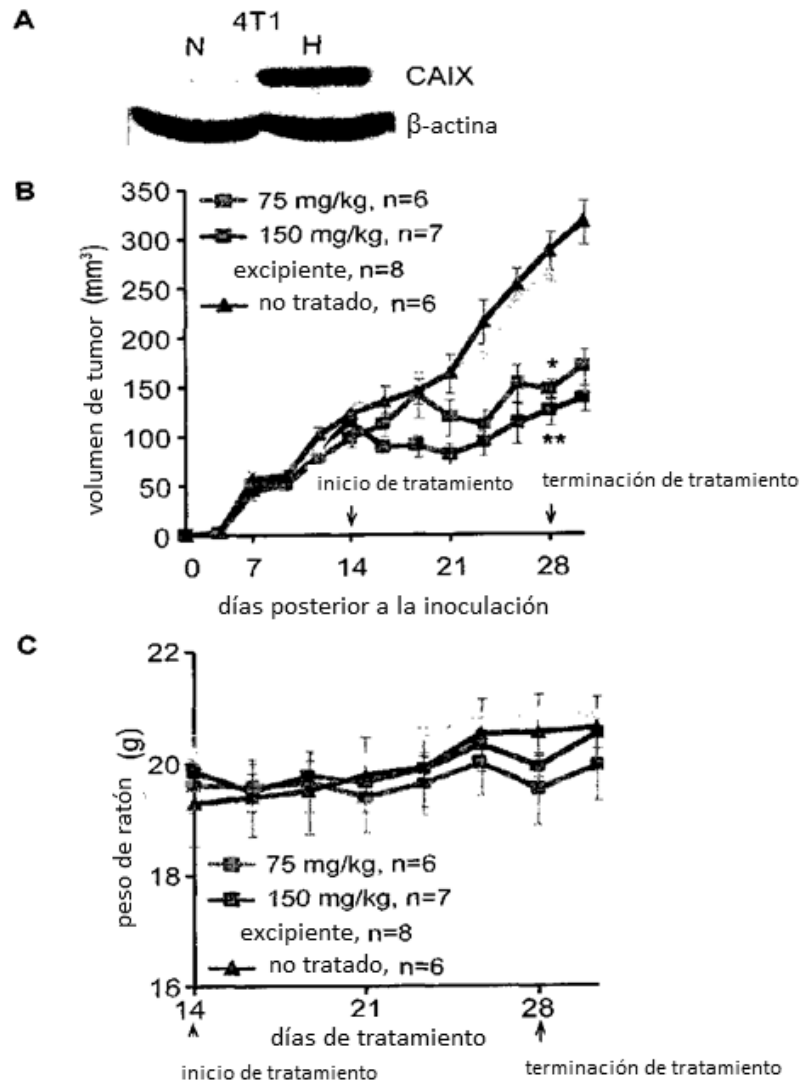


Figura 11

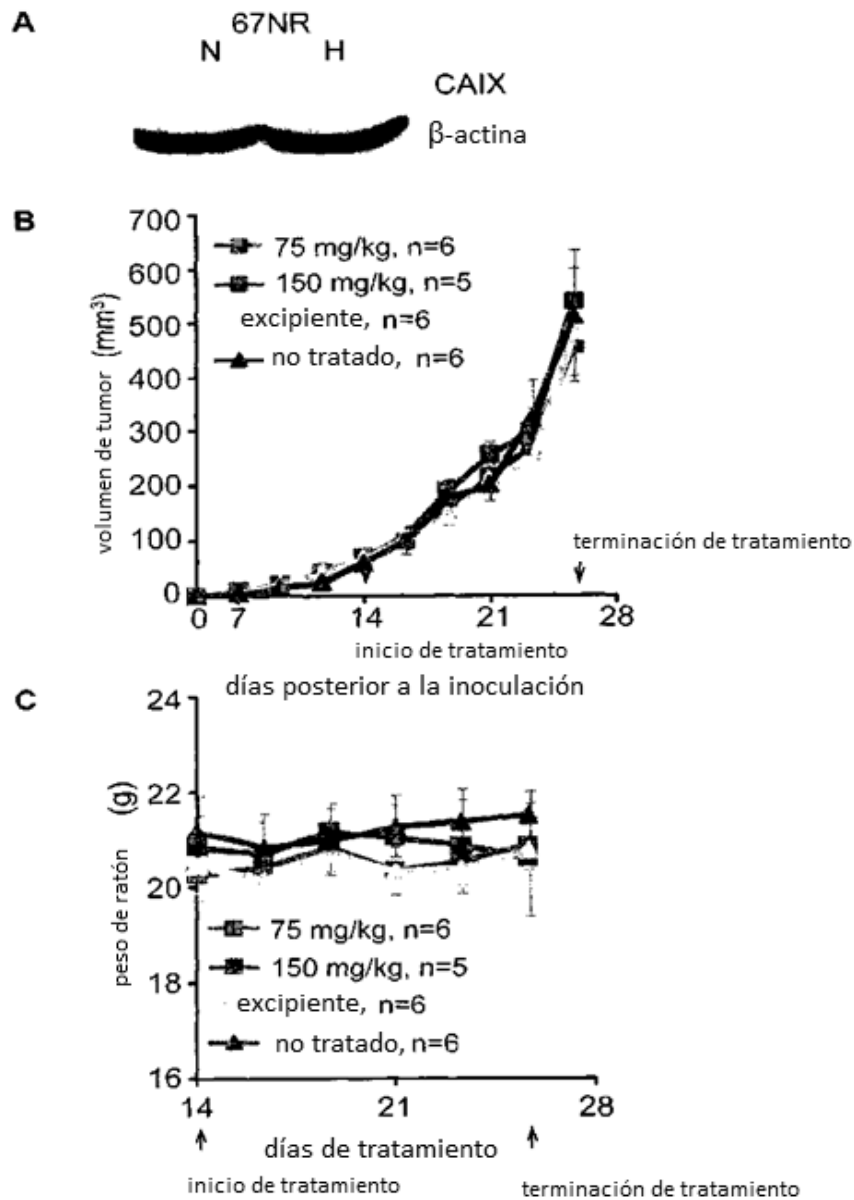


Figura 12

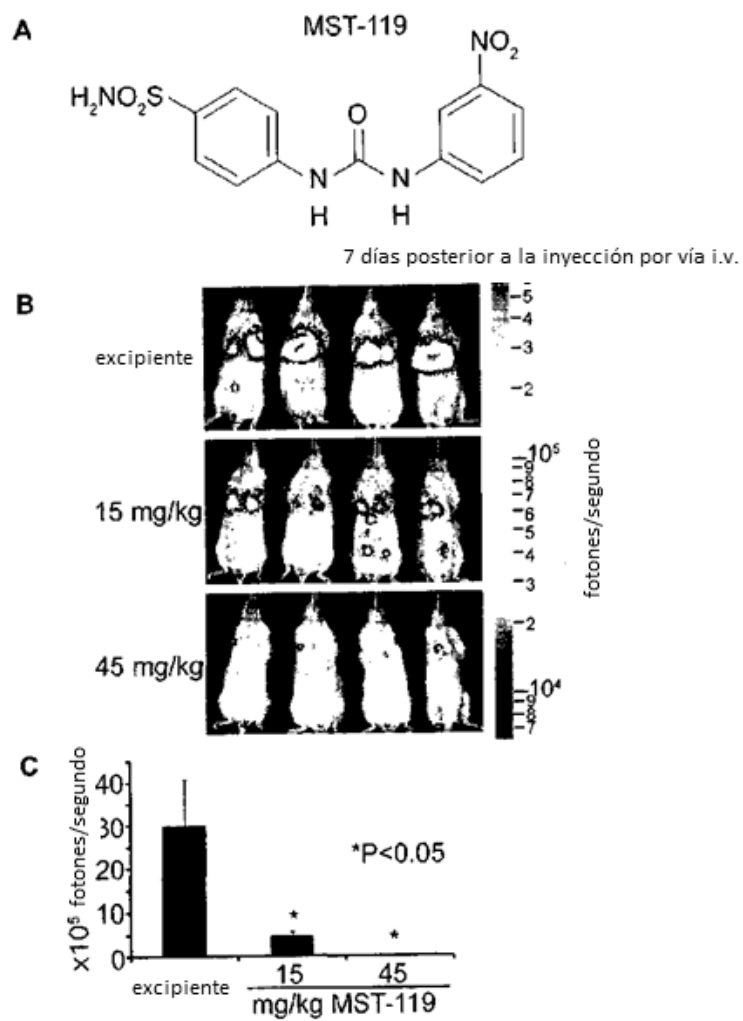


Figura 13

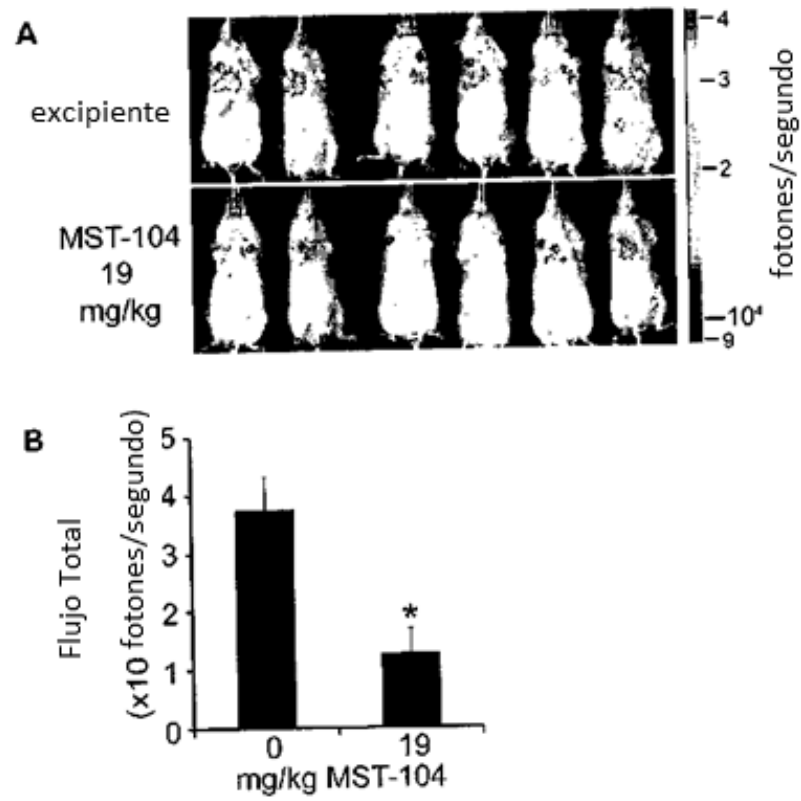


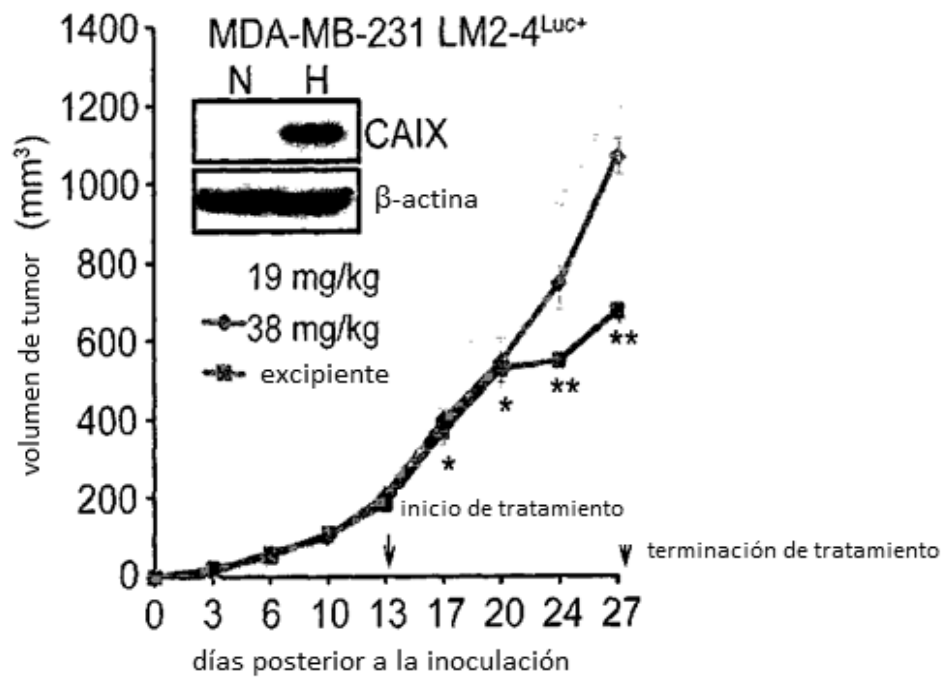
Figura 14

Figura 15

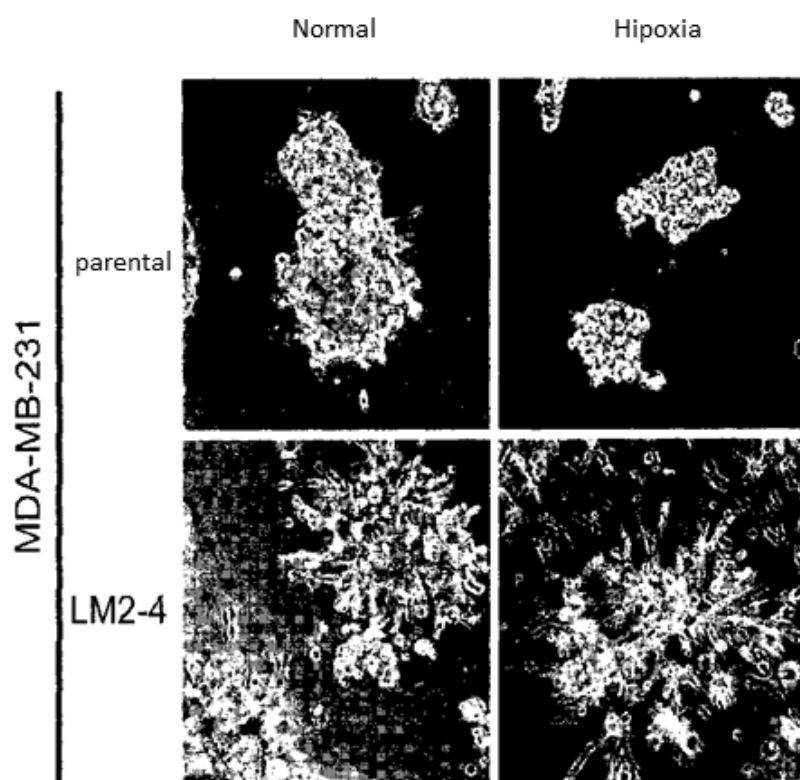


Figura 16

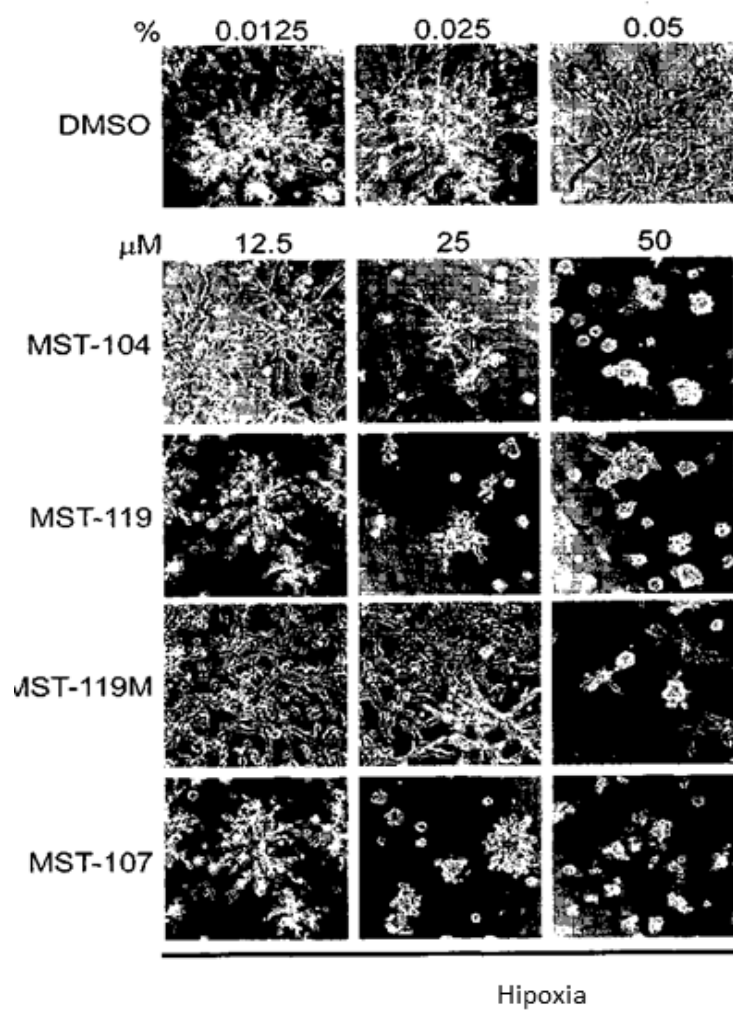


Figura 17

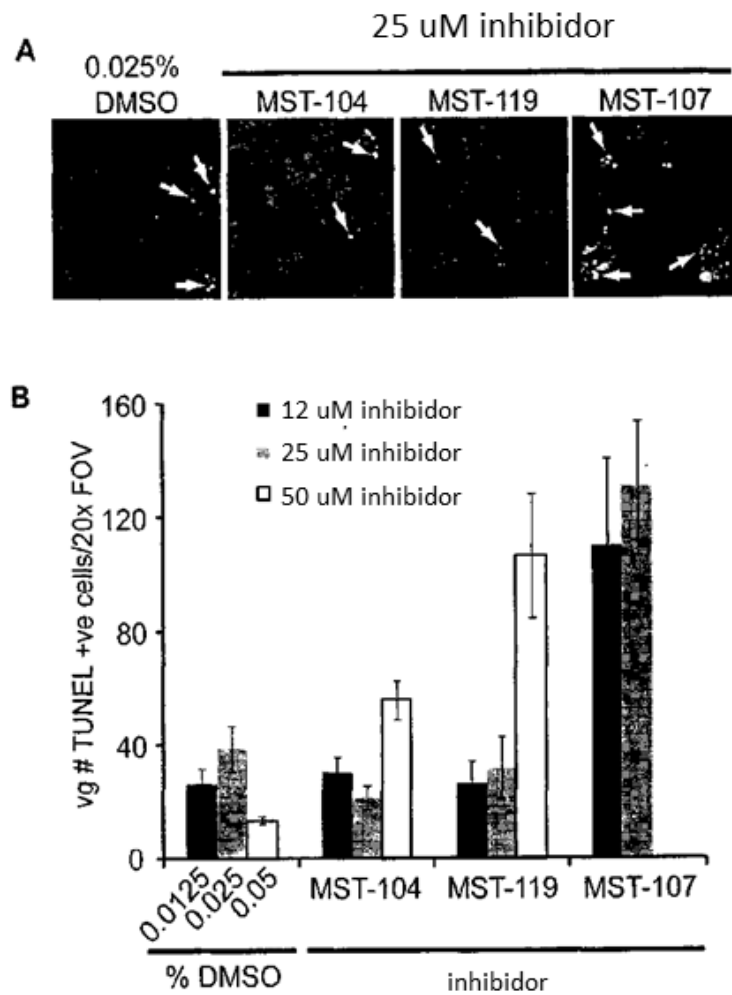


Figura 18

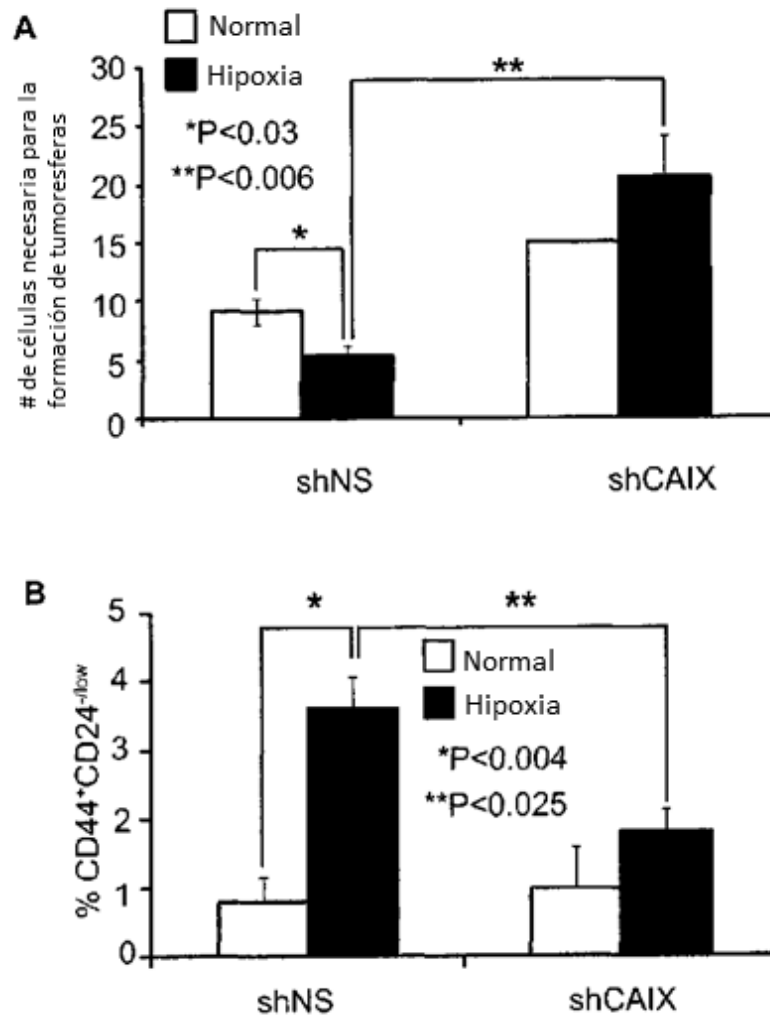


Figura 19

