

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 882 126**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01)
A61K 31/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2015 PCT/US2015/059738**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073983**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2015 E 15856956 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3215144**

(54) Título: **Inhibición de ornitina aminotransferasa con análogos de GABA para el tratamiento de carcinoma hepatocelular**

(30) Prioridad:

07.11.2014 US 201462076980 P

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

01.12.2021

(73) Titular/es:

**NORTHWESTERN UNIVERSITY (50.0%)
633 Clark Street
Evanston, IL 60208, US y
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**SILVERMAN, RICHARD, B. y
ILAN, YARON**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 882 126 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

Inhibición de ornitina aminotransferasa con análogos de GABA para el tratamiento de carcinoma hepatocelular

5 Esta solicitud reivindica prioridad respecto a y el beneficio de la solicitud con número de serie 62/076.980 presentada el 7 de noviembre, 2014.

Esta invención se hizo con apoyo del gobierno bajo R01 DA030604 concedido por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10

Antecedentes de la invención

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el tumor sólido más común en el mundo, la tercera causa principal de muertes por cáncer en el mundo, y la novena causa principal de muertes por cáncer en los Estados Unidos. Además, la incidencia del CHC en los EE UU está subiendo debido a la propagación de la infección por virus de la hepatitis B y C. Aproximadamente el 90 % de los cánceres de hígado primarios en los EE UU son CHC. Los individuos obesos o esos con diabetes también están en riesgo para CHC y una variedad de otros cánceres. Se estima que el CHC es responsable, o está implicado en, hasta aproximadamente 1.250.000 muertes al año, y como tal es numéricamente una de las enfermedades malignas principales del mundo.

20

El pronóstico del CHC es malo, con la tasa de frecuencia mundial que casi iguala a la tasa de mortalidad. Después del diagnóstico, el tiempo de supervivencia mediana es menos de cuatro meses. La supervivencia a largo plazo, definida como supervivencia más larga de un año después del diagnóstico, se ve solo ocasionalmente. La mayoría de los pacientes de CHC sucumben o bien las complicaciones de insuficiencia hepática con o sin hemorragia masiva, o a los efectos generales de una gran carga tumoral, con caquexia, malnutrición, infección y septicemia. Aunque se producen metástasis distantes (hasta el 90 % de los pacientes tienen tumores metastásicos en el momento de la muerte), la enfermedad hepática con la mayor frecuencia limita la supervivencia.

30

Las terapias actuales disponibles para el médico son en conjunto ineficaces como una cura para esta enfermedad. Para pacientes con CHC avanzado que no son candidatos a extirpación quirúrgica, trasplante de hígado, ablación tumoral localizada o quimioterapia sistémica permanecen la base de la terapia. Desafortunadamente, el CHC es un trastorno proliferativo relativamente resistente a quimioterapia; por tanto, los desenlaces usando este modo de tratamiento son insatisfactorios. La resistencia a quimioterapia puede estar causada por la expresión universal de la proteína de genes multirresistentes en la superficie de las células malignas, lo que produce un flujo activo de agentes quimioterapéuticos. La quimioterapia habitualmente no está bien tolerada y parece ser menos eficaz en pacientes con CHC con disfunción hepática subyacente. Los pacientes más jóvenes con cirrosis bien compensada debido a infecciones crónicas de hepatitis B o C tienen mejor desenlace con quimioterapia que los pacientes mayores con cirrosis alcohólica y otras enfermedades comórbidas.

40

Los fármacos de agentes individuales más activos ensayados han sido doxorubicina, cisplatino, y fluorouracilo. Las tasas de respuesta son aproximadamente el 10 %, y el tratamiento no muestra impacto claro sobre la supervivencia global. Más recientemente, gemcitabina y capecitabina se han evaluado en ensayos clínicos, pero las tasas de respuesta han sido bajas y a corto plazo.

45

La ornitina aminotransferasa (OAT) es una enzima de la matriz mitocondrial que cataliza una reacción reversible de interconversión entre ornitina y alfa cetoglutarato a delta-1-pirrolina-5-carboxilato y glutamato. La enzima se expresa en muchos tejidos, incluyendo hígado, riñón, intestino delgado, cerebro y ojo. Las enzimas de hígado y riñón se diferencian significativamente en su regulación, y se creía que eran dos enzimas distintas. Sin embargo, la secuenciación del ADN demostró que las dos enzimas están codificadas por un único gen.

50

Como se ha indicado anteriormente, el glutamato es el producto de la reacción catalizada por la OAT. Este producto se puede usar como sustrato por glutamina sintetasa para sintetizar glutamina, que es crítica para el crecimiento de células proliferativas, apoyando la síntesis de proteínas y nucleótidos y proporcionando una fuente principal de energía. Por tanto, una actividad aumentada de OAT podría hacer una célula tumoral independiente de cualquier suministro de glutamina y conferir una ventaja de crecimiento a la célula. Por tanto, sin estar vinculado a ninguna teoría, se puede hipotetizar que reducir el nivel de las concentraciones tisulares de glutamina por inactivación de la OAT puede producir la inhibición en proliferación celular y crecimiento tumoral. El documento WO 2008/023364 se refiere a la inhibición de la ornitina aminotransferasa (OAT) para la supresión de proliferación de células tumorales.

60

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a los compuestos para uso como se define en las reivindicaciones 1 y 5 con las formas de realización preferidas presentadas en las reivindicaciones dependientes. A la luz de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos, composiciones y compuestos o composiciones para uso en métodos relacionados de uso para la inhibición selectiva de la ornitina aminotransferasa, superando de esta manera varias deficiencias y defectos del estado de la técnica incluyendo los esbozados anteriormente. Los expertos en la materia

entenderían que uno o más aspectos de esta invención pueden cumplir ciertos objetivos, mientras que uno o más otros aspectos pueden cumplir ciertos otros objetivos. Cada objetivo puede no aplicar igualmente, en todos sus respectos, a cada aspecto de esta invención. Como tal, los siguientes objetos se pueden ver en la alternativa con respecto a cualquier aspecto de esta invención.

- 5 Es un objeto de la presente invención proporcionar uno más compuestos no peptídicos de molécula pequeña, que muestran inhibición de aminotransferasa.
- 10 Puede ser otro objeto de la presente invención proporcionar uno o más de tales compuestos para uso y estudio *in vitro* en condiciones indicativas de uno o más estados de enfermedad de mamíferos.

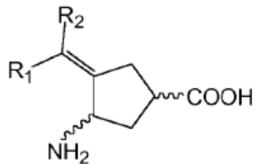
Alternativamente, también puede ser un objeto de la presente invención proporcionar uno o más de tales compuestos que permitan el tratamiento *in vivo* de tales estados de enfermedad.

- 15 También puede ser un objeto de la presente invención, solo o en combinación con uno o más de los objetos anteriores, proporcionar un compuesto o composición para la inhibición o inactivación de la OAT, inhibición o modulación de la proliferación celular y/o el tratamiento de un carcinoma hepatocelular, epilepsia y otras varias indicaciones.

- 20 Otros objetos, características, beneficios y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de este compendio y las siguientes descripciones de ciertas formas de realización de tales compuestos, composiciones y/o compuestos o composiciones para uso en los métodos y serán inmediatamente aparentes para los expertos en la materia que tienen conocimiento de las técnicas sintéticas descritas en el presente documento. Tales objetivos, características, beneficios y ventajas serán aparentes a partir de lo anterior tomado en combinación con los ejemplos, datos, figuras y referencias acompañantes, junto con todas las inferencias razonables que se van a extraer de los mismos.

- 25 En parte, la presente divulgación se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo patológico maligno en un sujeto en necesidad de ello. Tal método puede comprender administrar a tal sujeto un compuesto de una fórmula

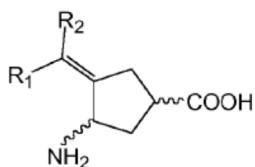
30



- 35 en donde R₁ y R₂ se pueden seleccionar de H y F, y al menos uno de R₁ y R₂ puede ser F, o una sal de tal compuesto. En ciertas formas de realización, R₁ y R₂ pueden ser F. En ciertas de tales formas de realización los sustituyentes amino y carboxi pueden tener una relación estereoquímica *cis*.

- 40 En parte, la presente divulgación se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo patológico maligno en un sujeto en necesidad de ello. Tal método puede comprender administrar a tal sujeto un compuesto de una fórmula

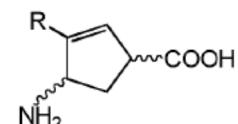
45



- en donde R₁ y R₂ se pueden seleccionar independientemente de H, F, Cl, Br y (CH₂)_nCF₃, donde n puede ser un número entero seleccionado de 0-2 y en donde al menos uno de R₁ y R₂ no es H, o una sal de tal compuesto. En ciertas de tales formas de realización los sustituyentes amino y carboxi pueden tener una relación estereoquímica *cis*.

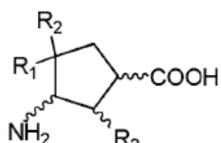
- 50 En parte, la presente divulgación también se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo patológico maligno en un sujeto en necesidad de ello. Tal método puede comprender administrar a tal sujeto un compuesto de una fórmula

55



en donde R se puede seleccionar de CF_3 y $[\text{C}(\text{H})_{2-n}(\text{F})_n]_m\text{CF}_3$, donde n puede ser un número entero seleccionado de 0-2 y m puede ser un número entero seleccionado de 1-2, o una sal de tal compuesto. En ciertas de tales formas de realización, los sustituyentes amino y carboxi pueden tener una relación estereoquímica *cis*.

5 En parte, la presente divulgación se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo patológico maligno en un sujeto en necesidad de ello. Tal método puede comprender administrar a tal sujeto un compuesto de una fórmula



10 en donde R_1 y R_2 se pueden seleccionar independientemente de H, F, Cl y Br, siempre que al menos uno de R_1 y R_2 no sea H, y R_3 se puede seleccionar de H, F, Cl y Br, o una sal de tal compuesto. En ciertas formas de realización, R_2 y R_3 pueden tener una relación estereoquímica *cis*. Independientemente, en ciertas de tales formas de realización, los sustituyentes amino y carboxi pueden tener una relación estereoquímica *cis*.

15 Independientemente, los compuestos útiles en combinación con esta invención son sin limitación estereoquímica o de configuración. Como se ilustra y discute posteriormente, tales compuestos y/o sus intermedios están disponibles como enantiómeros individuales, mezclas racémicas de las que se pueden resolver los isómeros, o diastereómeros de los que se pueden separar los correspondientes enantiómeros. Según esto, cualquier esteroecentro pueden ser (*S*) o (*R*) con respecto a cualquier otro esteroecentro. Como una consideración separada, independientemente de otra sustitución, por ejemplo, si es monofluoro o difluoro sustituido, los sustituyentes amino y carboxi pueden tener una relación estereoquímica *cis* o *trans*. Además, con respecto a las formas de realización de monofluorometileno, tales compuestos pueden tener una configuración Z o E. Como otra consideración separada, varios compuestos pueden estar presentes como una sal ácida, sea parcial o totalmente protonada. En ciertas de tales formas de realización, con respecto a un sustituyente amonio, el contraión puede ser una base conjugada de un ácido protíco. En ciertas de tales u otras formas de realización, con respecto a un sustituyente carboxilato, el contraión puede ser un catión alcalino, alcalinotérreo o amonio. Además, los expertos en la materia entenderán que cualesquiera uno o más de los compuestos de esta invención se puede proporcionar como parte de una composición farmacéutica que comprende un componente soporte farmacéuticamente aceptable para uso en combinación con un método de tratamiento o medicamento.

20 En parte, la presente invención también se puede dirigir a un compuesto o una composición para uso en un método para el tratamiento de carcinoma hepatocelular en un sujeto humano en necesidad de tal tratamiento. Tal método puede comprender administrar (por ejemplo, por vía oral) a tal sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto del tipo discutido anteriormente o descrito en otro lugar en el presente documento. La dosis de tal compuesto puede ser de aproximadamente 0,001 mg/sujeto de 60 kg/día hasta aproximadamente 10.000 mg/sujeto de 60 kg/día. En ciertas formas de realización, tal compuesto se puede proporcionar como parte de una composición farmacéutica.

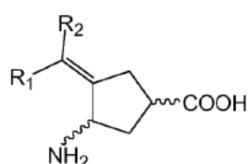
25 En parte, la presente invención también se puede dirigir a un compuesto o una composición para uso en un método de reducir o modular la actividad de una ornitina aminotransferasa expresada por un carcinoma hepatocelular humano. Tal método puede comprender proporcionar un compuesto del tipo discutido anteriormente o descrito en otro lugar en el presente documento; y poner en contacto tal compuesto con un medio celular que comprende un carcinoma hepatocelular que expresa una ornitina aminotransferasa con una cantidad de tal compuesto eficaz para reducir la actividad ornitina aminotransferasa. Tal método puede, por tanto, reducir o modular la producción de glutamato en tal medio celular. La dosis de tal compuesto puede ser de aproximadamente 0,001 mg/sujeto de 60 kg/día hasta aproximadamente 10.000 mg/sujeto de 60 kg/día. En ciertas formas de realización, tal compuesto se puede proporcionar como parte de una composición farmacéutica. Independientemente, tal contacto puede ser *in vitro* o *in vivo*.

30 En parte, la presente invención también se puede dirigir a un compuesto o una composición para uso en un método de reducir o modular la actividad de una ornitina aminotransferasa expresada por un tumor canceroso. Tal método puede comprender proporcionar un compuesto del tipo discutido anteriormente o descrito en otro lugar en el presente documento; y poner en contacto tal compuesto con un medio celular que comprende células cancerosas con una cantidad de tal compuesto eficaz para reducir la actividad ornitina aminotransferasa. Tal método puede mediante ello reducir o modular la producción de glutamato en tal medio celular. En ciertas formas de realización, tal compuesto se puede proporcionar como parte de una composición farmacéutica. Independientemente, tal contacto puede ser *in vitro* o *in vivo*.

Más en general, la presente invención también se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método que inhibe o inactiva una ornitina aminotransferasa. Tal método puede comprender proporcionar un compuesto del tipo discutido anteriormente o descrito posteriormente, sea o no parte de una composición farmacéutica, y administrar una cantidad eficaz de tal compuesto para contacto con una ornitina aminotransferasa. Tal contacto puede ser, como

5 se entendería en la técnica, para fines experimentales y/o de investigación o como se pueda diseñar para simular uno o más estados *in vivo* o fisiológicos. Tales compuestos pueden incluir los ilustrados mediante los siguientes ejemplos, figuras referenciadas y/o esquemas sintéticos acompañantes. En ciertas de tales formas de realización, tal compuesto y/o combinación del mismo puede estar presente en una cantidad al menos parcialmente suficiente para inhibir OAT, proliferación celular y/o crecimiento tumoral.

10 Además, en aún otra desviación del estado de la técnica, la presente invención también se puede dirigir a un compuesto o composición para uso en un método de usar una fracción metíleno exocíclica deficiente en electrones para inhibir la actividad ornitina aminotransferasa. Tal método de la divulgación puede comprender proporcionar un compuesto de una fórmula



20 en donde R₁ y R₂ se seleccionan de H, F y CF₃, y al menos uno de R₁ y R₂ es F o CF₃; tales compuestos incluyen sales de los mismos; y poner en contacto tal compuesto con una ornitina aminotransferasa. La fracción metíleno exocíclica de tal compuesto es capaz de unión y puede, mediante ello, unirse a un residuo del sitio activo de la enzima. Tales compuestos son monofluoro- o difluoro-, trifluorometil- o bis(trifluorometil)-sustituidos, y pueden variar dentro de la gama completa de consideraciones estructurales, iónicas, estereoquímicas y/o de configuración discutidas anteriormente. No obstante, se pueden usar ciertos isómeros *cis* y *trans*, como se discute posteriormente y se proporciona en los siguientes ejemplos, para demostrar uno o más aspectos respecto a la utilidad de esta invención.

25 Descripción detallada de los dibujos

Figura 1. Algunos inactivadores conocidos de (a) tanto OAT como GABA-AT, (b) solo GABA-AT, y (c) solo OAT (estado de la técnica).

30 Figura 2. Inhibición de OAT por varios aminoácidos cílicos, según ciertas formas de realización de esta invención (por ejemplo, compuestos 10-12).

35 Figura 3. Inactivación dependiente del tiempo de OAT por el compuesto 10, en comparación con la inactivación por varios otros aminoácidos cílicos.

Descripción detallada de ciertas formas de realización

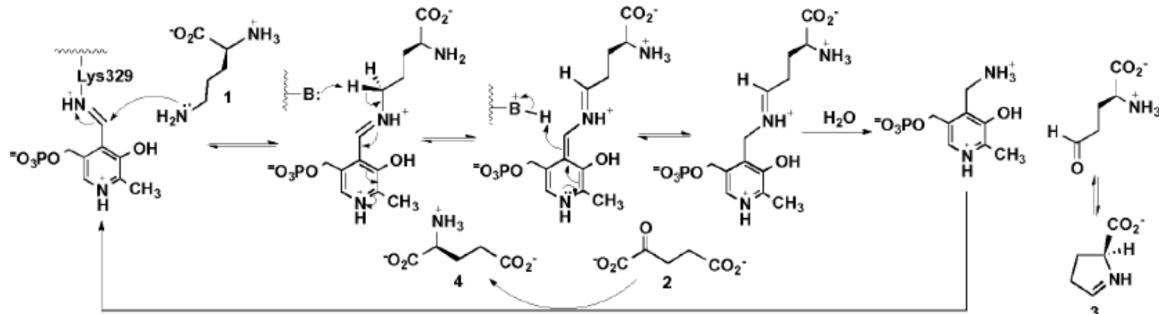
40 Varias formas de realización de esta invención se pueden considerar con un entendimiento del desarrollo de CHC y la correlación con la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en hígado. La ruta Wnt/β-catenina, una ruta evolutivamente conservada, es esencial para procesos celulares normales tales como crecimiento, desarrollo, supervivencia y regeneración. El mediador clave de la señalización de Wnt, β-catenina, ejerce varias funciones celulares generales: en un modo dinámico funciona en múltiples localizaciones celulares, incluyendo la membrana plasmática, donde β-catenina es importante para la estabilización de complejos adhesivos intercelulares; en el citoplasma, donde sus niveles están regulados; y en el núcleo, donde está implicada en la regulación transcripcional e interacciones de cromatina. La β-catenina ejerce tres papeles principales en la fisiología del hígado. En presencia de Wnt, β-catenina se transloca al núcleo, donde funciona para activar genes esenciales para proliferación, crecimiento, y regeneración del hígado. La β-catenina media la adhesión célula-célula mediante interacción con E-cadherina en la membrana de hepatocitos. En presencia de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la β-catenina se asocia con Met (Met es el receptor para HGF) en la superficie de hepatocitos, donde se fosforila y transloca al núcleo para aumentar genes para la proliferación y morfogénesis. Sin embargo, además de sus diversas funciones fisiológicas importantes en el hígado, la β-catenina también se asocia con el inicio y evolución del cáncer, en general como resultado de mutaciones en miembros de la ruta Wnt/β-catenina. Por ejemplo, se ha encontrado que las interacciones entre Met y una forma activa mutada de β-catenina facilitan el CHC.

55 La activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y el desarrollo concomitante en hígado de CHC, se correlaciona con el aumento de proteínas de la ruta OAT, transportador de glutamato GLT-1, y glutamina sintetasa. La pérdida de la actividad de β-catenina bloquea la síntesis de glutamina debido a la falta de inducción de esas tres proteínas. OAT, que se expresa en muchos tejidos, incluyendo hígado, riñón, intestino delgado, cerebro y ojo, es una enzima de la matriz mitocondrial dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP) que cataliza la conversión reversible de ornitina (**1**) y α-cetoglutarato (**2**) a L-glutamato semialdehído (que se cicla a Δ¹-pirrolina-5-carboxilato (**3**)) y L-glutamato

(4) (véase, el esquema 1). El L-glutamato formado de OAT es transportado fuera por GLT-1 de modo que no se acumule y se vuelva tóxico para la célula. El L-glutamato se convierte después por la glutamina sintetasa a L-glutamina.

Esquema 1. Conversión catalizada por ornitina aminotransferasa de ornitina (**1**) a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (**3**)

5



La glutamina es el aminoácido libre más abundante en el cuerpo; es esencial para el crecimiento de células tanto normales como neoplásicas. Sin embargo, las células tumorales absorben glutamina de forma más eficaz que las células normales, y el crecimiento del tumor está aumentado por glutamina. (Véase, por ejemplo, Souba, W. W. Glutamine and cancer. *Ann. Surgery* 1993, 218, 715-728; Medina, M. A. Glutamine and cancer. *J. Nutr.* 2001, 131 (9 Supl), 2539S-2542S). Con respecto a la glutamina, las células cancerosas se distinguen de las normales en que tienen un requisito aumentado para glutamina para apoyar procesos anabólicos que estimulan la proliferación. La glutamina proporciona una fuente de carbono para mantener conjuntos de intermedios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) y una fuente de nitrógeno (para reacciones de transaminación) para la biosíntesis de nucleótidos, aminoácidos no esenciales, y hexosamina. La glutamina también desempeña un papel crítico en suprimir la agresión oxidativa porque su catabolismo puede producir la biosíntesis de glutatión (GSH), un antioxidante intracelular principal.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Puesto que se requiere glutamina para el crecimiento del tumor, la prevención de su biosíntesis aumentada por oncogenes inhibe el crecimiento tumoral. La actividad aumentada de OAT (que hace L-Glu, que se convierte a L-Gln) por activación de Wnt/ β -catenina aumenta el crecimiento de las células tumorales independiente del suministro de glutamina, lo que permite una ventaja de crecimiento controlado a la célula tumoral. Por tanto, se ha sugerido reducir las concentraciones de glutamina aumentadas, que inhibe el crecimiento tumoral, por inhibición de OAT. (Véase, Amadasu A, Bertoldi M, Contestabile R, et al. Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr Med Chem* 2007, 14, 1291-324; y Dekaney CM, Wu G, Yin YL, et al. Regulation of ornithine aminotransferase gene expression and activity by all-transretinoic acid in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J Nutr Biochem* 2008, 19, 674-681. Véase, también, las patentes en los Estados Unidos Nos. 8.211.865 y 8.686.041).

La OAT pertenece al mismo subgrupo evolutivo de las enzimas dependientes de PLP como ácido γ -aminobutyrico aminotransferasa (GABA-AT), la enzima encontrada tanto en células de glía como en neuronas presinápticas, que cataliza la conversión del neurotransmisor inhibidor GABA y α -cetoglutarato a semialdehído succínico y L-glutamato. Estas dos enzimas comparten una alta homología estructural y, como todas las aminotransferasas, también tienen mecanismos catalíticos muy similares. Aunque OAT y GABA-AT tienen solo un 17 % de identidad de secuencia global, los residuos en los sitios activos de las dos enzimas son el 57 % similares. (Markova, M.; Peneff, C.; Hewlins, M.J.E.; Schirmer, T.; John, R.A., Determinants of Substrate Specificity in ω -Aminotransferases. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (43), 36409-36416). Las estructuras de OAT y GABA-AT unidas a ligando se compararon con sus estructuras sin ligando, y no se observaron cambios conformacionales a gran escala. Con OAT, el sitio de reconocimiento para el α -carboxilato de ornitina es R180 porque R413 se une a E235. Esto es similar a GABA-AT, donde E270 interacciona con R445 en un puente salino; el α -carboxilato de GABA interacciona con R192 para colocar correctamente el grupo γ -amino hacia el cofactor para la transaminación.

Las diferencias entre los residuos del sitio activo de OAT y GABA-AT podrían determinar la selectividad de sustrato (inhibidor) entre las enzimas. Las diferencias principales son que Tyr55 y Tyr85 de OAT están sustituidas por Phe351 e Ile72 en GABA-AT. Los residuos de Phe e Ile en el sitio activo de GABA-AT contribuyen al estrechamiento del sitio activo y su hidrofobicidad aumentada. En OAT los residuos de tirosina son los puntos de anclaje para el grupo amino cargado en la posición 2 del sustrato. Con la ayuda de estudios de modelado molecular, se ha encontrado que Tyr85 tiene un grado significativo de flexibilidad conformacional, que expone un bolsillo de unión accesorio no presente en otras aminotransferasas que hemos investigado.

55

Debido a las similitudes estructurales entre OAT y GABA-AT, algunos inactivadores de GABA-AT también inactivan OAT. Consistente con esta observación, GABA es un inhibidor competitivo de OAT. Gabaculina y ácido 4-aminohex-5-inoico (Figura 1) son inactivadores de GABA-AT, y también inactivan OAT con igual potencia tanto *in vitro* como *in vivo*. Vigabatrina, que se diferencia del ácido 4-aminohex-5-inoico con un grupo vinilo sp² en lugar de un grupo etinilo

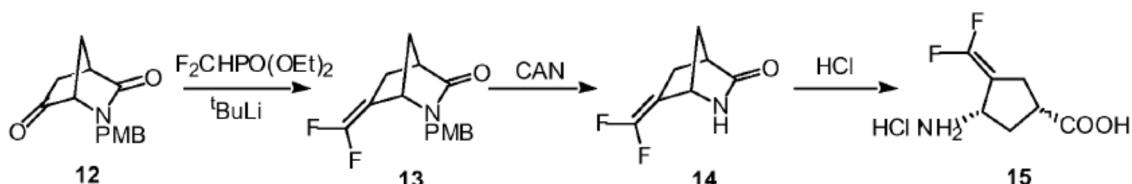
sp, no inactiva OAT. 5-Fluorometilornitina (5FMOrn) y L-canalina, ambos análogos del sustrato ornitina, son inhibidores irreversibles de OAT, pero no de GABA-AT. L-Canalina inactiva OAT al formar una oxima estable con el cofactor PLP. En base de la estructura cristalina de OAT inactivada por 5FMOrn, se sugirió que la especificidad de 5FMOrn y L-canalina hacia OAT podría resultar de interacciones con sus grupos α -amino. Con OAT inactivada por 5FMOrn, el grupo α -amino de 5FMOrn interacciona con Tyr55, y el grupo α -carboxilo está estabilizado por Arg180. En GABA-AT, Tyr55 está sustituida por Phe321 en esta posición, de modo que no se producen enlaces de hidrógeno con el grupo α -amino, presumiblemente la razón de que no tenga lugar la inactivación. Por tanto, esta diferencia en un residuo puede ser importante en el futuro diseño de inhibidores selectivos de OAT, como se discute posteriormente.

Como se ha indicado anteriormente, se sabe bien que la activación por oncogenes de la ruta de señalización Wtn/ β -catenina se corresponde con la activación de OAT, lo que produce una subida en la concentración de glutamina, que aumenta el crecimiento tumoral. No obstante, el estado de la técnica no se ha dirigido a la ruta Wtn/ β -catenina para el tratamiento de CHC, y no se ha dirigido hacia la inhibición de OAT como un mecanismo para el diseño de agentes terapéuticos para CHC. Debido a la falta de tratamientos eficaces para cánceres de hígado, hay una importante necesidad insatisfecha para identificar nuevas rutas para agentes terapéuticos. El enfoque tomado mediante la presente invención es el diseño de inactivadores basados en mecanismo de OAT, que produce inhibición irreversible. Varias características distinguen los inhibidores de enzimas basados en mecanismo de otros compuestos como potenciales agentes terapéuticos. Primero, son compuestos no reactivos que son estructuralmente similares al sustrato para la enzima diana y requieren que la actividad catalítica de la enzima diana los active. Debido a esto, hay una buena probabilidad (una vez se incorpora la selectividad de unión) que solo la enzima diana desencadene su propio mecanismo catalítico en estos inhibidores, convirtiéndolos a una forma activada que puede inactivar la enzima diana, un proceso conocido como inhibición basada en mecanismo. Esto da a estos inhibidores irreversibles mayor especificidad que otros inhibidores, ya que la inhibición requiere tanto reconocimiento como activación catalítica para su actividad. Segundo, a diferencia de los inhibidores reversibles, no se necesita mantener niveles de estado estacionario para sostener la producción disminuida de glutamato, que está dirigida por la síntesis *de novo* de la enzima. Por ejemplo, la semivida para la biosíntesis de OAT de hígado de rata es aproximadamente 1 día y de OAT de riñón de rata es aproximadamente 4 días. Si es similar en CHC, una pequeña cantidad de inactivador puede tener efecto duradero en disminuir las concentraciones de glutamato (y por tanto glutamina). Es particular deseable tener inhibición irreversible en combatir células tumorales. Estos fármacos pueden tener semivididas metabólicas relativamente cortas, aún ser muy eficaces debido a su semivida de unión muy larga. Esto apaga la producción de glutamina el tiempo suficiente para tener el efecto dañino deseado sobre el crecimiento tumoral.

Varios compuestos inhibidores de GABA-AT y composiciones relacionadas se describen en las patentes en los Estados Unidos Nos. 6.794.413 y 7.381.748. Uno de tales compuestos es ácido (1S,3S)-3-amino-4-difluoromelenil-1-ciclopentanoico (**10**, CPP-115, Figura 2). Este compuesto no inhibe alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, o glutamato descarboxilasa, incluso a concentración 6 mM, pero inhibe/inactiva OAT. No es activo en el panel Cerep de 111 dianas farmacológicas, no se une a tres transportadores de GABA humanos o a GABA_A, GABA_B, o GABA_C, no se une a canal hERG, no inhibe o induce citocromos P450, no es metabolizado por hepatocitos, no tiene efectos adversos en la respiración, y no produce mutaciones o anomalías cromosómicas.

Adoptando los números de referencia utilizados en las patentes mencionadas en el párrafo anterior, los compuestos útiles en combinación con los presentes métodos se pueden preparar como se muestra en los esquemas 2 y 3. Ilustrando tales formas de realización, el compuesto **15** se preparó a partir de **12** (Esquema 2). El compuesto **13** se preparó mediante una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons. (Piettre, S.R.; Cabanas, L. Reinvestigation of the Wadsworth-Emmons Reaction Involving Lithium Difluoromethylenephosphonate. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5881-5884.) Despues se desprotegió usando nitrato de amonio cérico (CAN) para dar **14** y se hidrolizó para dar **15**. (Qiu, J.; Silverman, R.B. A New Class of Conformationally Rigid Analogs of 4-Amino-5-halopentanoic Acids, Potent Inactivators of γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 706-720). (Véase, más en particular, los ejemplos 8-10, posteriormente).

Esquema 2

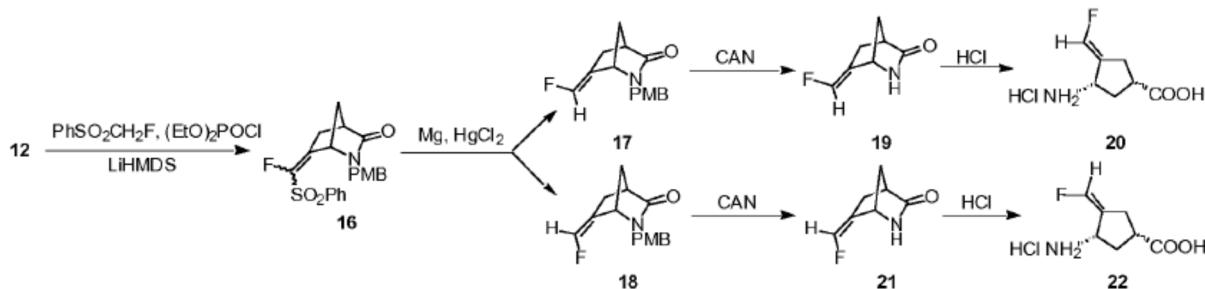


Como se describe en la anteriormente mencionada patente '413, se encontró que el compuesto **15** era un inactivador muy potente de GABA-AT incluso en presencia de 2-mercptoetanol 2 mM. Mientras que el isómero cis se muestra en el esquema 2, se pueden obtener resultados comparables con el isómero trans, ya que se puede preparar mediante una extensión directa de las técnicas sintéticas descritas en el presente documento, como entenderían los expertos en la materia.

Asimismo, esta invención contempla el uso de varios compuestos monofluoro sustituidos. Se muestran las síntesis de los compuestos **20** y **22** en el esquema 3. La reacción del material de partida del estado de la técnica **12** con fluorometilfenilsulfona y cloruro de dietilfosforilo dio **16** como una mezcla de dos isómeros, que después se sometió a la reducción con magnesio y cloruro de mercurio, dando **17** y **18** que se separaron y aislaron.

5 La desprotección adicional de la lactama y después hidrólisis dio **20** y **22**. (Véase los ejemplos 15 y 16, posteriormente). Consistente con lo anterior y según esta invención, los compuestos **20** y **22** también son potentes inhibidores dependientes del tiempo de GABA-AT. Se pueden demostrar actividades similares con los correspondientes isómeros trans.

10 Esquema 3



15 Los compuestos o las composiciones para uso de la presente invención también pueden, como entenderían los expertos en la materia, extenderse a o incluir compuestos o composiciones para uso en métodos que usan o en combinación con una composición farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor del tipo descrito en el presente documento y una formulación fisiológicamente o de otra manera adecuada. En algunas formas de realización, la presente invención incluye uno o más inhibidores de OAT, como se expone anteriormente, formulados en

20 composiciones junto con uno o más diluyentes, soportes, adyuvantes o vehículos fisiológicamente tolerables o aceptables que se denominan colectivamente en el presente documento soportes. Las composiciones adecuadas para tal contacto o administración pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas fisiológicamente aceptables, sean o no estériles. Las composiciones resultantes pueden ser, en combinación con los varios métodos descritos en el presente documento, para la administración o contacto con una ornitina aminotransferasa. Sea o no en combinación con una composición farmacéutica, "poner en contacto" significa que una 25 ornitina aminotransferasa y uno o más compuestos inhibidores se juntan para el fin de unir y/o complejarse tal compuesto inhibidor a la enzima. Las cantidades de un compuesto eficaz para inhibir una ornitina aminotransferasa se pueden determinar empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la capacidad de la técnica. La inhibición o afectar de otra manera la actividad de una ornitina aminotransferasa incluye reducción, mitigación y/o modulación, así como eliminación de la actividad OAT, producción de glutamato, síntesis de glutamina, proliferación 30 celular y/o crecimiento tumoral.

Los expertos en la materia entienden que la cantidad de dosis variará con la actividad de un compuesto inhibidor particular, estado de enfermedad, vía de administración, duración del tratamiento, y factores similares bien conocidos en las artes médicas y farmacéuticas. En general, una dosis adecuada será una cantidad que es la menor dosis eficaz 35 para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Si se desea, una dosis eficaz de tal compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición relacionada se puede administrar en dos o más subdosis, administradas por separado durante un periodo de tiempo apropiado.

40 Los métodos de preparar formulaciones o composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar un compuesto inhibidor con un soporte y, opcionalmente, uno o más adyuvantes o ingredientes adicionales. Por ejemplo, se pueden emplear técnicas de formulación farmacéutica estándar, tal como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.

45 Independientemente de la composición o formulación, los expertos en la materia reconocerán varias vías para la administración de medicamentos, junto con factores y parámetros correspondientes que se van considerar en hacer tal medicamento adecuado para la administración. Según esto, con respecto a una o más formas de realización, la presente invención proporciona el uso de uno o más de los presentes compuestos inhibidores para la fabricación de un medicamento para uso terapéutico en el tratamiento de carcinoma hepatocelular o la prevención del mismo.

50 En general, con respecto a varias formas de realización, esta divulgación se puede dirigir a compuestos o composiciones para uso en método(s) para el tratamiento de un trastorno proliferativo patológico. Como se usa en el presente documento, el término "trastorno" se refiere a un estado en que hay una alteración de funcionamiento normal. Una "enfermedad" es cualquier estado anómalo del cuerpo o la mente que produce molestia, disfunción o malestar a la persona afectada o esos en contacto con la persona. Algunas veces el término se usa en sentido amplio para incluir 55 lesiones, discapacidades, síndromes, síntomas, comportamientos anómalos, y variaciones atípicas de estructura y

función, mientras que en otros contextos estas se pueden considerar categorías distinguibles. Se debe indicar que los términos "enfermedad", "trastorno", "afección" y "dolencia", se usan igualmente en el presente documento.

Según ciertas formas de realización, un compuesto o una composición para uso de la divulgación puede ser específicamente aplicable para el tratamiento de trastornos proliferativos malignos. Como se usa en el presente documento para describir la presente invención, "cáncer", "tumor" y "neoplasia maligna" se refieren todos de forma equivalente a una hiperplasia de un tejido u órgano. Si el tejido es parte de los sistemas linfático o inmunitario, las células malignas pueden incluir tumores no sólidos de células circulantes. Las neoplasias malignas de otros tejidos u órganos pueden producir tumores sólidos. Según esto, el compuesto o la composición para uso de la presente invención se puede usar en el tratamiento de tumores no sólidos y sólidos.

La neoplasia maligna, como se contempla en la presente invención, se puede seleccionar del grupo que consiste en melanomas, carcinomas, leucemias, linfomas y sarcomas. Las neoplasias malignas que se pueden tratar, o como puede encontrar utilidad en el contexto de la presente invención, pueden comprender neoplasias malignas hematológicas (incluyendo leucemia, linfoma y trastornos mieloproliferativos), anemia hipoplásica y aplásica (tanto inducida por virus como idiopática), síndromes mielodisplásicos, todos los tipos de síndromes paraneoplásicos (tanto inmunitarios como idiopáticos) y tumores sólidos (incluyendo vejiga, recto, estómago, cuello uterino, ovárico, renal, pulmón, hígado, mama, colon, próstata, aparato digestivo, páncreas y Kaposi). Más en particular, según ciertas formas de realización, los compuestos usados en combinación con esta invención o cualquier composición que comprende los mismos, según la invención, se puede usar para el tratamiento o inhibición de cánceres no sólidos, por ejemplo, neoplasias malignas hematopoyéticas tal como todos los tipos de leucemia, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), síndrome mielodisplásico (SMD), leucemia de células cebadas, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfomas no hodgkinianos, linfoma de Burkitt y mieloma múltiple, así como para el tratamiento o la inhibición de tumores sólidos tal como tumores en el labio y la cavidad bucal, faringe, laringe, senos paranasales, glándulas salivares principales, glándula tiroides, esófago, estómago, intestino delgado, colon, colorrecto, canal anal, hígado, vesícula biliar, conductos biliares extraliegáticos, ampolla de Vater, páncreas exocrino, pulmón, mesotelioma pleural, hueso, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma y melanoma maligno de la piel, mama, vulva, vagina, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, trompas de Falopio, tumores trofoblásticos gestacionales, pene, próstata, testículo, riñón, pelvis renal, uréter, vejiga urinaria, uretra, carcinoma del párpado, carcinoma de la conjuntiva, melanoma maligno de la conjuntiva, melanoma maligno, retinoblastoma, carcinoma de la glándula lagrimal, sarcoma de la cavidad orbitaria, cerebro, médula espinal, sistema vascular, hemangiosarcoma y sarcoma de Kaposi.

Se debe indicar que todos los trastornos indicados en el presente documento como trastornos que pueden ser tratados por los compuestos o composiciones para uso de la invención, y/o en combinación con compuestos y/o las composiciones del tipo descrito anteriormente. Según esto, varios de tales compuestos y composiciones se pueden administrar en combinación con tal uso en cualquier modo adecuado. Por ejemplo, la administración comprende la administración oral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, transdérmica, intravaginal, intranasal, mucosal, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquier combinación de las mismas.

Según otras formas de realización, el sujeto tratado puede ser un sujeto mamífero. Aunque los compuestos o composiciones para uso de la divulgación se pretenden en particular para el tratamiento de trastornos proliferativos en seres humanos, se incluyen otros mamíferos. A modo de ejemplos, los sujetos mamíferos incluyen monos, equinos, ganado, caninos, felinos, ratones, ratas y cerdos.

Los términos "tratar, que trata, tratamiento" como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones significan mejorar uno o más indicios clínicos de actividad de enfermedad en un sujeto que tiene un trastorno patológico. "Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico. Esos en necesidad de tratamiento son sujetos mamíferos que padecen cualquier trastorno patológico. Mediante "paciente" o "sujeto en necesidad" se quiere decir cualquier mamífero para el que se desea la administración de un compuesto o cualquier composición farmacéutica del tipo descrito en el presente documento, con el fin de prevenir, superar, modular o ralentizar tal afección. Proporcionar un "tratamiento preventivo" o "tratamiento profiláctico" es actuar de una manera protectora, defender contra o prevenir algo, en especial un afección o enfermedad.

Más en general, esta invención puede estar dirigida a compuestos o composiciones para uso en los métodos para afectar, modular, reducir, inhibir y/o prevenir el inicio, evolución y/o metástasis (por ejemplo, del hígado a otro lugar o al hígado desde cualquier otro órgano o tejido) de un trastorno proliferativo patológico maligno asociado con la activación de la ruta de señalización Wtn/β-catenina y actividad de OAT aumentada. (Véase, por ejemplo, Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, et al. A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr Oncol Rep* 2010, 12, 314-318; Liu Wei; Le Anne; Hancock Chad; Lane Andrew N; Dang Chi V; Fan Teresa W-M; Phang James M. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109(23), 8983-8988; y Tong, Xuemei; Zhao, Fangping; Thompson, Craig B. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2009, 19(1), 32-37).

65

Ejemplos de la invención

Los siguientes ejemplos y datos ilustran varios aspectos y características referidos a los compuestos o composiciones para uso de la presente invención, incluyendo el tratamiento de carcinoma hepatocelular y/o la reducción de actividad ornitina aminotransferasa, que se pueda asociar con el mismo. En comparación con el estado de la técnica, los presentes métodos proporcionan resultados y datos que son sorprendentes, inesperados y contrarios al mismo. Mientras que la utilidad de esta invención se ilustra mediante el uso de varios compuestos y composiciones que se pueden usar con la misma, los expertos en la materia entenderán que resultados similares son obtenibles con varios otros compuestos.

Métodos químicos generales. Todos los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Varian Mercury 400 MHz o Varian Inova 500 MHz. Los desplazamientos químicos de ^1H se describen como valores δ en ppm campo abajo de Me_4Si como el estándar interno en CDCl_3 . Para muestras corridas en D_2O , la resonancia de HOD se ajustó a 4,80 ppm. Los desplazamientos químicos de ^{13}C se enumeran en ppm con el pico de carbono de CDCl_3 ajustado a 77,23 ppm. Para muestras corridas en D_2O , se usó DSS como el estándar externo. Los desplazamientos químicos de ^{19}F se enumeran en ppm con CFCl_3 como el estándar externo para muestras corridas en CDCl_3 y TFA como el estándar externo para muestras corridas en D_2O . Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas VG70-250SE. La cromatografía en columna se llevó a cabo con gel de sílice 60 (malla 230-400 ASTM) de Merck. La TLC se corrió con placas de vidrio precargadas con gel de sílice 60 F254 de EM Science. La resina de intercambio catiónico se compró de Bio-Rad Laboratories. Se usó un pH-metro de Orion Research 702 con un electrodo de combinación general para las medidas de pH. Todos los ensayos enzimáticos se registraron en un espectrómetro UV/Vis Perkin-Elmer Lambda 10.

Reactivos. Se compró fluorometil fenilsulfona de TCI America, Inc. Todos los otros reactivos se compraron de Aldrich Chemical Co. y se usaron sin purificación. Todos los solventes se compraron de Fisher Scientific. El THF anhídrido se destiló de metal sodio en nitrógeno.

Ejemplo 1

Psammomys obesus, la rata de arena, es un jerbo del desierto usado como un modelo de trastorno proliferativo y, puesto que se han descrito preneoplásico hepático y hepatomas espontáneos en las ratas de arena, un modelo para carcinoma hepatocelular. Los carcinomas hepatocelulares (CHC) espontáneos se observaron en ratas de arena de 12 meses de edad; el examen histológico reveló cambios malignos que incluyen pleomorfismo excesivo, pérdida de patrón trabecular, penetración del tumor a través de la pared de venas hepáticas, y CHC. Se realizó análisis de expresión génica basado en micromatriz de ADN comparando hígados que desarrollan CHC espontáneos y normales. El análisis de los datos de la micromatriz identificó siete genes cuyos niveles de expresión habían aumentado y 143 genes cuyos niveles de expresión habían disminuido en tejidos tumorales comparados con hígados normales. OAT era uno de los genes más prominentes aumentados en todos los tumores. Como se ha discutido anteriormente, OAT es una enzima mitocondrial para la transaminación de ornitina a glutamina, y se encontró que era un gen diana de beta-catenina.

Ejemplo 2

Se desarrollaron dos ensayos continuos nuevos para OAT para lectura de alto rendimiento que son más sensibles que métodos previos y miden la actividad en tiempo real. (Juncosa, J. I.; Lee, H.; Silverman, R. B. Two continuous coupled assays for ornithine- δ -aminotransferase. *Anal. Biochem.* 2013, 440, 145-149). Un ensayo se basa en la reducción de **3** (esquema 1) por Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa 1 (PYCRI), siguiendo la oxidación de NADH espectrofotométricamente, y es adecuado para estudiar la actividad de inhibidores/inactivadores de molécula pequeña de OAT. (Los valores de K_i para cada uno con OAT se muestran en la figura 2). El segundo ensayo se basa en la formación de L-glutamato (**4**, Esquema 1); esto se puede usar para medir la actividad de sustrato de moléculas pequeñas con OAT. Con estos dos ensayos en la mano, se investigó la actividad de una variedad de compuestos hechos previamente como potenciales inhibidores de GABA-AT. (Los valores correspondientes de K_i y k_{inact} se muestran en la figura 3).

Inhibición dependiente del tiempo de OAT por gabaculina y CPP-115: Se llevaron a cabo los ensayos de actividad OAT usando como sigue. OAT (0,25 μg) se incuba con varias concentraciones de gabaculina (0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM) y **CPP-115** (10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM) en tampón pirofosfato de potasio 100 mM, pH 8,0, que contiene alfa-cetoglutarato 1 mM en un volumen total de 20 μl a temperatura ambiente. A intervalos de tiempo, se añaden 80 μl de solución de ensayo que contiene PYCR1 (0,5 μg), alfa-cetoglutarato 12,5 mM, NADH 1 mM, PLP 0,03 mM, y L-ornitina 25 mM en tampón pirofosfato de potasio 100 mM, pH 8,0, a la mezcla de incubación y se ensaya la actividad OAT.

Con referencia a la figura 2, el inhibidor más potente es **13** (3 μM), que no inhibe GABA-AT incluso a concentración 10 mM. El acoplamiento de **13** en la estructura cristalina de GABA-AT muestra que los dos grupos trifluorometilo son demasiado grandes para ajustar en el bolsillo de unión largo estrecho. El siguiente mejor inhibidor de OAT es **CPP-115 (10)**. El acoplamiento en la estructura cristalina de OAT muestra menos interacciones hidrofóbicas debido al menor tamaño de 10 y enlaces de hidrógeno a los átomos de flúor. Estas parecen ser las interacciones más importantes que

determinan la eficacia de unión. Es interesante que el correspondiente compuesto diclorometilenilo (**18**) es un unidor muy débil a OAT (y también a GABA-AT). Los estudios de acoplamiento que comparan **10**, **13** y **18** confirmaron esta conclusión. El compuesto **10** se acopla bien en el sitio activo, y los átomos de flúor forman enlaces de hidrógeno con Glu235 y Tyr85. Los grupos trifluorometilo de **13** son grandes y no ajustan entre Glu235 y Tyr85, pero ajustan entre Tyr85 y Tyr55, y los átomos de flúor forman enlaces de hidrógeno con esos residuos. Los átomos de cloro de **18** son demasiado grandes para ajustar entre Glu235 y Tyr85 y el cloro no puede formar un enlace de hidrógeno como el flúor; por consiguiente, el grupo diclorometileno se orienta en dirección opuesta a este sitio y no tiene fuerza impulsora para ajustar entre Tyr85 y Tyr55.

10 Ejemplo 2b

Inactivación de OAT por CPP-115 y diálisis de la enzima inactivada: OAT (30 µg) se preincuba durante 24 horas con **CPP-115** 2 mM en tampón pirofosfato 100 mM (pH 8,0) que contiene alfa-cetoglutarato 5 mM en un volumen total de 60 µl a temperatura ambiente. OAT incubada sin el inactivador sirve como control. Después de 24 h, las soluciones de enzima se transfieren a un dializador D-Tube™ Mini y se dializa exhaustivamente frente al tampón (tampón pirofosfato 100 mM que contiene alfa-cetoglutarato 0,1 mM y PLP 0,1 mM, pH 8,0) a 4 °C protegido de la luz. El tampón de diálisis se intercambia tres veces cada 4 h y se deja durante la noche. Después de 48 h de diálisis, se ensaya la actividad OAT restante en cada una de las soluciones.

- 20 Para la determinación de los valores de K_i y k_{inact} , el logaritmo natural del porcentaje de la actividad OAT restante se representa frente al tiempo de preincubación a cada concentración de inhibidor para obtener el valor de k_{obs} (pendiente) para cada concentración. La k_{obs} es la constante de velocidad que describe la inactivación a cada concentración de inhibidor. Se vuelve a representar k_{obs} frente a la concentración de inhibidor usando un análisis de regresión no lineal (Graph-Pad Prism 6; GraphPad Software Inc.). Se estimaron k_{inact} y K_i de la ecuación siguiente: $k_{obs} = K_{inact}[I]/k_i + [I]$, donde k_{inact} es la velocidad máxima de inactivación, K_i es la concentración de inhibidor requerida para la inactivación semimáxima, y $[I]$ es la concentración de preincubación del inhibidor. La inactivación de OAT por gabaculina y **CPP-115** son dependientes del tiempo y la concentración. Las constantes de velocidad iniciales para la inactivación a varias concentraciones de los dos compuestos se determinan usando análisis de regresión no lineal.
- 30 Se encontró que algunos de los compuestos cíclicos eran inhibidores irreversibles dependientes del tiempo (no volvió actividad tras la diálisis durante 48 h en tampón difosfato de potasio 0,1 M pH 8,0 que contenía PLP 0,1 mM y α-cetoglutarato) de OAT (Figura 4). De nuevo, **13** es el más eficaz, seguido por **10**. Cinco compuestos (**5**, **19-22**) no mostraron inhibición reversible a concentración 1 mM, pero tras preincubación, se produjo pérdida de enzima; todos estos compuestos se unen poco a OAT. (El inactivador más potente fue gabaculina (**5**), que se sabe que inactiva OAT; sin embargo, gabaculina es muy tóxico).
- 35

Ejemplo 3

40 Se ensayó gabaculina (**5**) *in vitro* en ocho líneas celulares de CHC diferentes. Cuarenta y ocho horas después de la exposición de gabaculina 20 mM, la proliferación de CHC se ensayó usando un ensayo de ^3H -timidina. Gabaculina suprimió significativamente la proliferación de tres líneas celulares de CHC, Hep3B, PLC/PRF/5, y HepA1-6, en el 46-51 % (Figura 5A). Se evaluó la secreción de alfa-fetoproteína (AFP) como un biomarcador para CHC. Gabaculina disminuyó significativamente la secreción de AFP en el 20 % en células Hep3B (Figura 5B). No se advirtieron diferencias significativas en la supresión de AFP para las otras dos líneas celulares. La administración de gabaculina suprimió significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*. A los siete días de una dosis única a ratones que portan CHC, los niveles en suero de AFP disminuyeron en el 92 % en comparación con un aumento de 9,7 veces en los controles (Figura 5C).

Ejemplo 4

50 **Evaluación del efecto de gabaculina sobre el crecimiento de CHC *in vivo*:** Se acondicionaron ratones Balb/C atípicos con radiación subletal (400 cGy). 24 h después de la irradiación, los animales se inyectaron por vía subcutánea en el hombro derecho con 5×10^6 células Hep3B de hepatoma humano. Se obtuvieron muestras de sangre semanalmente por punción retrobulbar, y el suero se separó y congeló a -20 °C hasta que se ensayó. El día 45 los ratones se dividieron en dos grupos ($n = 8$ por tratado y controles) y se midió la AFP en suero basal. El grupo experimental se inyectó por vía intraperitoneal una vez con 500 microgramos/kg de gabaculina. Los ratones en el grupo control se inyectaron con solución salina. Los niveles de AFP en suero, que se correlacionan con crecimiento tumoral, se midieron el día 52 usando un ensayo de Elisa estándar.

Ejemplo 5

60 El compuesto **13** se ensayó *in vitro* para sus efectos sobre la supresión de los niveles de AFP en dos líneas celulares de CHC, Hep3B y HepG2; se observó una supresión profunda del crecimiento tumoral de CHC (datos no mostrados). La evaluación de la seguridad de **13** se determinó por administración *in vivo* de dosis de 0,5-5 mg/kg de **13** a ratones C57Bl/6, $n = 4$ por grupo de dosis. Cada ratón recibió dos dosis los días 1 y 4, y los ratones se ensayaron una semana

más tarde para enzimas hepáticas, peso, comportamiento, y aspecto de la piel. Con ninguna de las dosis ensayadas hubo ningún efecto notable (datos no mostrados).

La administración de **13** suprimió significativamente el crecimiento tumoral *in vivo*. Una reducción significativa en los niveles en suero de AFP y en el volumen tumoral, ambos normalizados al día de inicio de la terapia, se observaron en ambos grupos tratados en comparación con los controles sin tratar. Después de 14 días de tratamiento, se reprimieron los niveles de AFP en suero, aumentando solo en 3,4 veces en los animales tratados comparado con un aumento de 10,9 veces en los controles (de 7224 a 24857 frente a de 2671 a 29155 pg/ml, respectivamente). También se reprimió el tamaño tumoral, aumentando solo 2,45 veces en los animales tratados comparado con 8,4 veces en los controles (de 0,24 a 0,49 cm³ frente a de 0,034 a 0,287 cm³, respectivamente). Después de 21 días de tratamiento, los niveles de AFP en suero aumentaron en 8,15 veces en animales tratados frente a 49,8 veces en los controles; los tamaños tumorales se reprimieron, aumentando en 3,05 veces en animales tratados frente a 24,2 veces en los controles. El efecto antitumoral estaba asociado con un aumento del 20 % en apoptosis de células tumorales. Se realizaron biopsias de los tumores al final del experimento para la determinación del grado de apoptosis y necrosis tumoral usando un kit de detección de fosfatidilserina. La exposición de fosfatidilserina en el exterior de la célula se siguió en suspensiones celulares usando anexina V marcada con fluorocromo en citometría de flujo.

Ejemplo 6

El compuesto **10** se puede ensayar *in vitro* e *in vivo*, como se ha descrito anteriormente, para evaluar la represión de los niveles de AFP en líneas celulares de CHC y la represión de crecimiento tumoral.

Ejemplo 7

Análisis estadístico: Todos los análisis se pueden realizar usando Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, EE UU). Las variables se pueden expresar como media ± desviación estándar (DE). La comparación de dos grupos independientes se puede realizar usando la prueba de la t de Student. Todas las pruebas aplicadas pueden ser bilaterales. Se puede considerar que un valor P de 0,05 o menor es estadísticamente significativo.

Con referencia a los esquemas 2 y 3 anteriores, la correspondiente discusión y los números de referencia proporcionados en las anteriormente mencionadas patentes '413 y '748 incorporadas, los ejemplos 8-16 describen la síntesis y caracterización de los compuestos referenciados, según varias formas de realización de esta invención.

Ejemplo 8

(1S,4S)-6-Difluorometilenil-2-(4'-metoxibencil)-2-azabiciclo[2.2.1]heptan-3-ona (13). A -78 °C, ⁷BuLi (1,7 M en pentano, 1,73 ml, 2,94 mmol) se añadió lentamente a una solución agitada de (difluorometil)fosfonato de dietilo (0,48 ml, 2,94 mmol) en THF anhídrico (15 ml). Después de agitar durante 0,5 h a -78 °C, se añadió lentamente **12** (0,60 g, 2,45 mmol) en THF anhídrico (20 ml) a través de una jeringa. Se siguió agitando durante 1 h a -78 °C, después la solución se dejó calentar a temperatura ambiente y se calentó de refluxo durante 24 h. El compuesto 12 es conocido y está disponible en la técnica, y se puede preparar como se describe en Qiu, J.; Silverman, R.B. A New Class of Conformationally Rigid Analogues of 4-Amino-5-halopentanoic Acids, Potent Inactivators of γ-Aminobutyric Acid Aminotransferase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 706-720. Después de que se hubiera enfriado la reacción, se evaporó el THF, y se añadió solución saturada de NH₄Cl (20 ml) al residuo, que se extrajo con EtOAc (3 × 20 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (2 × 20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida, eluyendo con hexanos/aceto de etilo (2:1) para dar **13** (0,47 g, 68 %) como un aceite incoloro: ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,18 (d, J 8,4 Hz, 2H), 6,07 (d, J 8,4 Hz, 2H), 4,63 (d, J 14,8 Hz, 1H), 4,14 (s, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,78 (d, J 14,8 Hz, 1H), 3,00 (s, 1H), 2,50 (dt, J 15,2, 3,6 Hz, 1H), 2,27 (dd, J 15,2, 2,4 Hz, 1H), 2,00 (d, J 9,2 Hz, 1H), 1,53 (d, 9,6 Hz, 1H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 177,37, 159,13, 152,19 (dd, J 285,7, 281,2 Hz), 129,59, 128,47, 114,13, 88,95 (dd, J 25,6, 22,2 Hz), 58,38 (d, J 5,3 Hz), 55,50, 45,60, 44,59, 40,96, 27,43; ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ 42,64 y 41,01 (2 dd, J 60,2, 2,3 Hz, 2F), HRMS (EI) C₁₅H₁₅NO₂F₂ M calculada 279,1071, M determinada 279,10701.

Ejemplo 9

(1S,4S)-6-Difluorometilenil-2-azabiciclo[2.2.1]heptan-3-ona (14). El compuesto **13** (86,9 mg, 0,31 mmol) se disolvió en CH₃CN (1,75 ml). Una solución de nitrato de amonio cérico (512 mg, 0,93 mmol) en agua (0,87 ml) se añadió lentamente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó después con acetato de etilo (20 ml), se lavó con salmuera (2 × 10 ml), y se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico. Después de concentrar a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna rápida, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (1:1) para dar el producto deseado como un aceite incoloro (33,6 mg, 68 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,48 (br s, 1H), 4,40 (s, 1H), 2,93 (s, 1H), 2,54 (dd, J 15,2, 2,8 Hz, 1H), 2,32 (d, J 15,2 Hz, 1H), 2,15 (d, J 9,6 Hz, 1H), 1,64 (d, J 10,0 Hz, 1H); ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ 42,85 y 40,00 (2d, J 60,2 Hz, 2F); HRMS (EI) C₇H₇NO₂F₂ M calculada 159,0496, M determinada 159,04673.

Ejemplo 10

Ácido (1S,3S)-3-amino-4-difluorometilenil-1-ciclopentanoico (15) (es decir, compuesto 10, CPP-115, Figura 2).

A la lactama **14** (20,0 mg, 0,13 mmol) se añadieron 4 ml de HCl 4 N. La solución se agitó a 70 °C durante 10 h. Después de lavar con acetato de etilo (3 × 4 ml), la fase acuosa se evaporó a presión reducida para dar un sólido amarillo. La recristalización con etanol/éter dio un sólido blanco, que despues se cargó en una columna de intercambio catiónico (AG50W-X8) y se eluyó con hidróxido de amonio 0,2 N para dar el aminoácido libre **15** como un sólido blanco (16 mg, 72 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 4,44 (s, 1H), 2,92 (m, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,57 (dd, J 16,4, 3,6 Hz, 1H), 2,34 (m, 1H), 2,02 (d, J 14,8 Hz, 1H); ¹³C RMN (126 MHz, D₂O) 186,08, 155,30 (t, J 288,7 Hz), 92,19 (m), 53,16 (d, J 3,8 Hz), 48,01, 37,89, 32,45; ¹⁹F RMN (376 MHz, D₂O) δ -8,43 y -9,02 (2d, J 46,3 Hz, 2F); MS (ESI) C₇H₉NO₂F₂ calculada M+H 178, determinada M+H 178.

Ejemplo 11

(E/Z)-(1S,4S)-6-(1'-Fluoro-1'-fenilsulfonil)metilenil-2-(4'-metoxibencil)-2-azabiciclo[2.2.2]heptan-3-ona (16). A THF anhídrico (3 ml) se añadieron fluorometil fenilsulfona (130 mg, 0,75 mmol) y clorofosfonato de dietilo (0,11 ml, 0,74 mmol). Después de enfriar a -78 °C en nitrógeno, se añadió lentamente bis(trimetilsilil)amida de litio (1,0 M en THF, 1,65 ml, 1,65 mmol). Después de agitar durante 1 h, una solución de **12** (91,3 mg, 0,37 mmol) en THF anhídrico (3 ml) se añadió lentamente a través de una cánula. La solución de calentó despues a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Después de extinguir con solución saturada de NH₄Cl (10 ml), el THF se evaporó y la solución resultante se extrajo con acetato de etilo (3 × 10 ml). La fase orgánica se combinó, se lavó con salmuera, y se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico. Esta solución se concentró despues a presión reducida y se purificó con cromatografía en columna rápida, eluyendo con hexanos/acetato de etilo (de 1:0 a 1:2), dando una mezcla *cis/trans* inseparable (**16**) (4,4:1, visto de RMN, 119 mg, 80 %) como un aceite incoloro. ¹H RMN para el producto principal (400 MHz, CDCl₃) δ 7,94 (d, J 8,0 Hz, 2H), 7,72 (t, J 7,4 Hz, 1H), 7,61 (t, J 7,6 Hz, 2H), 7,33 (d, J 8,4 Hz, 2H), 6,90 (d, J 8,8 Hz, 2H), 5,24 (s, 1H), 4,77 (d, J 14,8 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,79 (d, J 14,8 Hz, 1H), 3,00 (s, 1H), 2,49-2,66 (m, 2H), 2,10 (d, J 9,2 Hz, 1H), 1,63 (d, J 8,8 Hz, 1H).

Ejemplo 12

(E)-(1S,4S)-6-Fluorometilenil-2-(4'-metoxibencil)-2-azabiciclo[2.2.2]heptan-3-ona (17) y (Z)-(1S,4S)-6-fluorometilenil-2-(4'-metoxibencil)-2-azabiciclo[2.2.2]heptan-3-ona (18). El compuesto **16** (100 mg, 0,25 mmol) se disolvío en metanol anhídrico (10 ml) en nitrógeno y se puso en un baño de hielo-sal. Se añadieron virutas de magnesio (0,30 g, 12,5 mmol) y cloruro de mercurio (II) (60 mg, 0,22 mmol). La solución se agitó durante 2 h, despues se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se echó en HCl 1 N (10 ml). El metanol se evaporó a presión reducida y la solución acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3 × 10 ml). La fase orgánica se combinó, se lavó con solución de NaHCO₃ saturada (2 × 10 ml), salmuera (2 × 10 ml), y se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico. Después de concentración a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna con hexanos/acetato de etilo (3:1), dando el compuesto **17** (33,8 mg, 52 %) y **18** (12,9 mg, 20 %), ambos como aceites incoloros.

Para **17**: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,15 (d, J 8,5 Hz, 2H), 6,87 (d, J 8,5 Hz, 2H), 6,65 (d, J 82,9 Hz, 1H), 4,66 (d, J 15,0 Hz, 1H), 3,83 (s, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,72 (d, J 15,0 Hz, 1H), 2,98 (s, 1H), 2,55 (dd, J 16,0, 2,5 Hz, 1H), 2,36 (dd, J 16,0, 1,5 Hz, 1H), 2,02 (d, J 8,0 Hz, 1H), 1,53 (d, J 9,5 Hz, 1H).

Para **18**: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (d, J 8,5 Hz, 2H), 6,87 (d, J 8,5 Hz, 2H), 6,54 (d, J 84,9 Hz, 1H), 4,67 (d, J 15,0 Hz, 1H), 4,36 (s, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,67 (d, J 15,0 Hz, 1H), 2,96 (s, 1H), 2,43 (d, J 14,0 Hz, 1H), 2,21 (d, J 15,0 Hz, 1H), 1,97 (d, J 9,5 Hz, 1H), 1,48 (d, J 9,5 Hz, 1H).

Ejemplo 13

(E)-(1S,4S)-6-Fluorometilenil-2-azabiciclo[2.2.2]heptan-3-ona (19). En un tubo eppendorf, se disolvío **17** (10,2 mg, 39 µmol) en acetonitrilo (0,22 ml). A esta solución se añadió una solución de nitrato de amonio célico (64 mg, 117 µmol) en agua (60 µl). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (10 ml), se lavó con salmuera (2 × 5 ml), y se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico. Después de concentración a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna eluyendo con hexanos/acetato de etilo (1:1) para dar **19** como un aceite incoloro (2,0 mg, 36 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,83 (d, J 83,2 Hz, 1H), 5,48 (br s, 1H), 4,15 (s, 1H), 2,90 (s, 1H), 2,60 (d, J 16,8 Hz, 1H), 2,39 (d, J 15,6 Hz, 1H), 2,15 (d, J 9,2 Hz, 1H), 1,61 (d, J 9,2 Hz, 1H); ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) -2,75 (d, J 83,6 Hz, 1F).

Ejemplo 14

(Z)-(1S,4S)-6-Fluorometilenil-2-azabiciclo[2.2.2]heptan-3-ona (21). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,47 (d, J 85,6 Hz, 1H), 5,40 (s, 1H), 4,61 (s, 1H), 2,89 (s, 1H), 2,47 (d, J 14,8 Hz, 1H), 2,26 (d, J 16,0 Hz, 1H), 2,13 (d, J 9,2 Hz, 1H); ¹⁹F RMN (376 MHz, CDCl₃) δ -0,27 (d, J 84,0 Hz, 1F).

Ejemplo 15

Ácido (E)-(1S,3S)-3-amino-4-difluorometilenil-1-ciclopentanoico, sal clorhidrato (20) (es decir, compuesto 11, Figura 2). Al compuesto 19 (2,0 mg, 14 µmol) se añadió HCl 4 N (4 ml). La solución se calentó a 70 °C y se agitó durante 10 h. Despues se enfrió, se lavó con acetato de etilo (2 × 4 ml), y se evaporó a presión reducida para dar un sólido blanco (2,0 g, 72 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 6,93 (d, J 81,2 Hz, 1H), 4,33 (m, 1H), 3,06 (t, J 8,0 Hz, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,48 (t, J 6,8 Hz, 1H), 2,03 (t, 6,8 Hz, 1H); ¹⁹F RMN (376 MHz, D₂O) δ -48,59 (d, J 78,7 Hz, 1F).

Ejemplo 16

Ácido (Z)-(1S,3S)-3-amino-4-difluorometilenil-1-ciclopentanoico, sal clorhidrato (22) (es decir, compuesto 12, Figura 2). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 6,82 (d, J 82,4 Hz, 1H), 4,50 (s, 1H), 3,00 (p, J 8,0 Hz, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,48-2,62 (m, 2H), 1,99 (m, 1H); ¹⁹F RMN (376 MHz, D₂O) δ -50,47 (d, J 82,5 Hz, 1F).

Ejemplo 17

Los compuestos 10-22 (Figuras 2-3) los conocen y entienden los expertos en la materia y se comunican en esta invención, y están disponibles según los procedimientos y técnicas sintéticas descritas en las correspondientes referencias, como se proporcionan.

Compuestos 10-12: como se describen en los ejemplos 8-16, y las anteriormente mencionadas patentes '413 y '748 incorporadas.

Compuestos 13-17: Lu, Hejun; Silverman, Richard B., Fluorinated Conformationally Restricted γ-Aminobutyric Acid Aminotransferase Inhibitors, Journal of Medicinal Chemistry (2006), 49(25), 7404-7412.

Compuesto 18: Yuan, Hai; Silverman, Richard B., Structural Modifications of (1S,3S)-3-Amino-4-Difluoromethylenecyclopentanecarboxylic Acid, a Potent Irreversible Inhibitor of GABA Aminotransferase, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007), 17(6), 1651-1654.

Compuesto 19: Wang, Zhiyong; Silverman, Richard B., Syntheses and Evaluation of Fluorinated Conformationally Restricted Analogues of GABA as Potential Inhibitors of GABA Aminotransferase, Bioorganic & Medicinal Chemistry (2006), 14(7), 2242-2252.

Compuestos 20-22: Qiu, Jian; Silverman, Richard B., A New Class of Conformationally Rigid Analogs of 4-Amino-5-Halopentanoic Acids, Potent Inactivators of γ-Aminobutyric Acid Aminotransferase, Journal of Medicinal Chemistry (2000), 43(4), 706-720.

Ejemplo 18

Toxicidad aguda en ratas. Se realizó un estudio de dosis máxima tolerada (parte A) y resultado de intervalo de dosis (parte B) de CPP-115 en ratas Wistar Albino. En la parte A del estudio, 17 ratas macho y 18 hembras, colocadas en 8 grupos de tratamiento, recibieron una única inyección i.p. de CPP-115 a una dosis de 0,5, 5, 30, 50, 75, 100, 150 o 300 mg/kg. Se observaron resultados clínicos después de una única administración i.p. de CPP-115 a niveles de dosis de 75 mg/kg y superiores, con todas las ratas tratadas a la mayor dosis (300 mg/kg) sacrificadas in extremis debido a la baja temperatura corporal. La repetición de dosis parece ser insostenible a estos niveles mayores ya que las ratas mostraron apatía grave de la que no se recuperaron hasta después de 24 horas tras la dosis.

En la parte B del estudio, 25 ratas Wistar macho y 25 hembras, colocadas en 5 grupos de tratamiento, recibieron inyecciones i.p. de CPP-115 una vez al día hasta 14 días a niveles de dosis de 0, 10, 20, 30, y 50 mg/kg. Parecía haber un efecto acumulativo con dosis repetidas de CPP-115 a dosis de 30 mg/kg y superiores, produciendo pérdida de peso, aspecto descuidado, apatía, e inconsciencia. A 20 mg/kg/día, algunos animales empezaron a perder peso y reducir actividades de cuidado, pero no mostraron apatía u otros síntomas neurológicos. Las ratas tratadas con 20 mg/kg pueden haber desarrollado tolerancia a los efectos del fármaco porque después de aproximadamente 5 a 6 días de tratamiento empezaron a recuperar el peso corporal perdido y asearse a sí mismas adecuadamente. No se observaron resultados clínicos relacionados con la dosis en los grupos de 0 mg/kg o 10 mg/kg. No se observó pérdida de peso significativa para la mayoría de las ratas dosificadas a 10 mg/kg después de 14 días de tratamiento. Unos pocos animales tratados con 10 mg/kg, sin embargo, mostraron pérdida de peso esporádica en días de estudio aislados, lo que sugiere la posibilidad de sedación infrecuente a esta dosis. Los resultados de analítica clínica no parecían indicar un claro efecto patofisiológico, aunque los resultados eran consistentes con que el artículo de prueba produzca sedación y actividad disminuida, lo que lleva a consumo de alimento disminuido. Las disminuciones relacionadas con la dosis en colesterol, triglicéridos, amilasa y fosfatasa alcalina podrían ser indicadores de desnutrición. En conjunto, parece que las ratas toleraban dosificación diaria repetida de CPP-115 a niveles de hasta 20 mg/kg durante 14 días.

Ejemplo 19

Toxicidad de dosis repetidas en ratas. Se realizó un estudio de toxicología/toxicocinética por (alimentación forzada) oral de 4 semanas en ratas CrI:CD(SD) con CPP-115 a dosis de 0 (agua RO), 2, 6, y 20 mg/kg/día. Las ratas recibieron el artículo de prueba una vez al día durante al menos 4 semanas a un volumen de dosis de 10 ml/kg seguido por un periodo de recuperación de 4 semanas. CPP-115 fue bien tolerado a 2 y 6 mg/kg/día y no produjo observaciones clínicas o cambios en el peso corporal o consumo de alimentos. La exposición a CPP-115 aumentó con el nivel de dosis aumentado. Los aumentos en Cmax y AUC0-t en general fueron proporcionales a la dosis. No se observó acumulación de CPP-115 después de múltiples dosis.

- 5 Parece que CPP-115 puede no extraerse mucho por el hígado y puede distribuirse mucho a los tejidos después de la administración oral. Un resultado microscópico relacionado con el artículo de prueba y adverso de displasia retinal, caracterizada principalmente por patrones de crecimiento irregulares en la capa nuclear externa, se advirtió durante las fases de dosificación y recuperación en ratas administradas con 6 o 20 mg/kg/día de CPP-115. Por tanto, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) para CPP-115 fue 2 mg/kg/día.
- 10 15 **Ejemplo 20**

Toxicidad de dosis repetidas en perros. Se realizó un estudio de toxicología/toxicocinética por (alimentación forzada) oral de 4 semanas en perros beagle con CPP-115 a dosis de 0 (agua RO), 0,7, 2,3, y 7 mg/kg/día. Los perros recibieron el artículo de prueba una vez al día durante al menos 4 semanas a un volumen de dosis de 7 ml/kg seguido por un periodo de recuperación de 4 semanas. La exposición a CPP-115 aumentó con el aumento del nivel de dosis de 0,7 a 7 mg/kg/día. El aumento en Cmax y AUC0-24 media en general fueron proporcionales a la dosis. No se observó acumulación de CPP-115 después de múltiples dosis en perros.

- 20 25 30 35 La evaluación de la toxicidad se basó en mortalidad, observaciones clínicas, pesos corporales, ganancia de peso corporal, consumo de alimentos, exploraciones físicas, constantes vitales (frecuencia cardiaca, respiración, y temperatura corporal), exploraciones oftalmológicas, exploraciones de electrocardiograma, patología clínica y anatómica, y evaluación del ojo izquierdo. CPP-115 administrado a perros Beagle se toleró bien a todos los niveles de dosis. No se advirtieron hallazgos relacionados con el artículo de prueba a 0,7 o 2,3 (solo machos) mg/kg/día. Los resultados relacionados con el artículo de prueba no adversos en perros a los que se dio 7 mg/kg/día incluyeron hipoactividad, vacuolas mínima o ligeramente aumentadas en la sustancia blanca del cerebelo y tronco encefálico y en la materia gris de la corteza cerebral, y vacuolación de hepatocitos centrilobular de mínima a ligera (también en hembras a las que se dio 2,3 mg/kg/día), que no estaba acompañado por cambios adversos en pruebas de laboratorio que miden la función hepática. Por tanto, el nivel de efecto no observado (NOEL) fue 2,3 mg/kg/día para machos y 0,7 mg/kg/día para hembras, con un NOAEL de 7 mg/kg/día.

Ejemplo 21

Toxicidad retinal de CPP-115 en ratas. Se realizó un estudio de retinotoxicidad en ratas Wistar Albino tratadas con CPP-115 (20 mg/kg/día, i.p.), vigabatrina (200 mg/kg/día, i.p.) o vehículo (0 mg/kg/día i.p.) una vez al día durante 45 días consecutivos (5/sexo/grupo) o 90 días consecutivos (10/sexo/grupo). Al concluir la dosificación, las ratas entraron un periodo de lavado (5-7 días) después del cual se recogieron electrorretinogramas (ERG) para escotópico (bastones), mesópico (combinado estándar) y fotópico (conos), y respuestas de ERG de parpadeo a 10 Hz y 15 Hz para ambos ojos de cada rata. Las respuestas de ERG en ratas tratadas con CPP-115, a dosis de 20 a 40 veces mayores que las necesarias para tratar adicción en ratas, mostraron reducciones en respuestas de EGR, comparadas con ratas control, pero menos que las reducciones observadas en ratas tratadas con vigabatrina a la misma dosis necesaria para tratar la adicción en ratas.

- 40 45 50 Se observó una mayor reducción en todas las medidas de ERG en hembras en comparación con machos. Solo se describen las respuestas de parpadeo a 15 Hz porque muestran contribuciones menores de bastones debido a la mayor frecuencia del estímulo y, por tanto, serían más indicativas de tiempo de recuperación de fotorreceptores de conos.

- 55 Los resultados de ERG para el tratamiento con vigabatrina en este estudio son similares a informes anteriores de deficiencias de ERG en modelos animales e individuos. Los datos acumulados de este estudio apoyan el potencial para que CPP-115 tenga un perfil de seguridad retinal mejorado comparado con vigabatrina. Como fue estadísticamente analizado por Sinclair Laboratories, CPP-115 mostró observaciones esporádicas de diferencias estadísticamente significativas en valores de parámetros de ERG medios aislados en 7 de 52 comparaciones estadísticas. Estos resultados se consideran que son incidentales porque no se observó patrón en los resultados de diferencias de efecto de amplitud o momento implícito entre CPP-115 y placebo. Al contrario, el grupo tratado con vigabatrina mostró diferencias estadísticamente significativas entre vigabatrina y placebo en 29 de 52 comparaciones estadísticas. Además, parecía haber una diferencia por sexo en la reducción de la amplitud y retraso del tiempo implícito estando las hembras más afectadas que los machos. Por tanto, vigabatrina a una dosis de 200 mg/kg produjo cambios significativos en la función electrorretinal evidente a los 45 días mantenida hasta 90 días. Por otra parte, parecería que el nivel de dosis de CPP-115 (20 mg/kg) no produce cambios significativos consistentes en la función electrorretinal en bastones o actividad de conos a los 45 o 90 días.

También se llevaron a cabo exámenes histológicos cuantitativos de las retinas de las ratas de este estudio. Los receptores de conos se tiñeron con un anticuerpo de arrestina de conos y se contratiñeron con un colorante rojo para la visualización y conteo. También se tiñeron secciones de retina con H&E y se determinaron las cuentas de núcleos ONL y espesores ONL. En todos los casos, las medidas se realizaron en tres localizaciones inferiores y tres superiores en la retina aproximadamente igualmente separados de la localización inferior periférica lejana respecto a la localización superior periférica lejana en la retina.

5 No hubo cambio estadísticamente significativo respecto a las cuentas del receptor de conos entre los tres grupos. Sin embargo, hubo un cambio estadísticamente significativo respecto a las cuentas de núcleos ONL y espesor ONL entre vigabatrina y el grupo control. No hubo cambio significativo entre CPP-115 y el grupo control. En conjunto, los datos corroboran las observaciones de ERG de que las hembras estaban más afectadas que los machos y que la exposición a vigabatrina produce más complicaciones retinales histológicas que CPP-115.

Ejemplo 22

10 **Genotoxicidad.** Se ensayó CPP-115 en la prueba de anomalía cromosómica de mamíferos *in vitro* usando linfocitos de sangre periférica humanos (LSPH) tanto en ausencia como en presencia de un sistema de activación metabólica S9 de hígado de rata inducido por Aroclor. El porcentaje de células con anomalías estructurales o numéricas en los grupos tratados con el artículo de prueba no estaba significativamente aumentado comparado con el grupo control de solvente en cualquier nivel de dosis ensayado (535, 1070 y 2140 µg/ml). Por tanto, se concluyó que CPP-115 no era clastogénico en la prueba de anomalía cromosómica *in vitro* en linfocitos humanos.

15 Se evaluó el potencial de CPP-115 para inducir mutaciones inversas usando 4 cepas de ensayo de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 y TA 1537) y 1 cepa de ensayo de *Escherichia coli* (WP2uvrA) en presencia o ausencia de S9 de hígado de rata inducido por Aroclor. No se observó respuesta mutagénica positiva a través del intervalo de concentraciones de CPP-115 ensayadas en un ensayo inicial de toxicidad-mutación (1,5, 5,0, 15, 50, 150, 500, 1500 y 5000 µg por placa) o en un ensayo confirmatorio de mutagenicidad (50, 150, 500, 1500 y 5000 µg por placa). No se observó ni precipitado ni toxicidad apreciable en los ensayos inicial y de confirmación. Por tanto, se concluyó que CPP-115 no era mutagénico en el ensayo de mutación inversa bacteriana *in vitro*.

Ejemplo 23

20 **Interacción de CPP-115 con transportadores de GABA.** Se transfecaron plásmidos que codifican hGAT-1, hGBT-1, hGAT-2 y hGAT-3 en células tsA201. Al día siguiente se sembraron en placa células tsA201 que expresaban transitoriamente cada uno de los cuatro subtipos de transportadores de GABA seguido por (de 36 a 48 horas después) la adición de [³H]GABA (30 nM) y CPP-115 (1 mM). Se determinó la captación de [³H]GABA después de incubación a 37 °C durante 3 minutos. La IC_{50} fue > 1000 µM para cada subtipo de transportador de GABA, por tanto, CPP-115 no afectaba la captación de GABA en transportadores de GABA humanos expresados de forma recombinante.

25 40 Expresión *in vitro* de preparaciones de enzimas citocromo P450 de hepatocitos humanos cultivados fueron tratadas una vez al día durante 3 días consecutivos con dimetilsulfóxido (DMSO, al 0,1 % v/v, control vehículo), 1 de 3 concentraciones de CPP-115 (1, 10 o 100 µM) o 1 de 3 inductores de citocromo P450 (CYP) humano conocidos, es decir, omeprazol (100 µM), fenobarbital (750 µM), y rifampicina (10 µM). Las células se incubaron después con sustratos marcadores apropiados y se analizó la actividad CYP. El tratamiento de cultivos de hepatocitos con CPP-115 ni aumentó ni disminuyó las actividades de CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4/5 a ninguna de las concentraciones ensayadas en comparación con cultivos con vehículo control, mientras que los controles positivos produjeron aumentos anticipados en actividades CYP. Por tanto, en las condiciones de este estudio, CPP-115, a concentraciones de hasta 100 µM, no era un inductor de la actividad CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4/5 en hepatocitos humanos primarios.

30 45 50 55 60 Se incubaron microsomas hepáticos humanos de un conjunto de 16 individuos con 2 sustratos marcadores diferentes en presencia y ausencia de CPP-115 a concentraciones que variaban de 0,1 a 100 µM. Para evaluar la inhibición dependiente del tiempo y el metabolismo, CPP-115 se preincubó con microsomas de hígado humano en presencia y ausencia de un sistema generador de dinucleótido fosfato de b-nicotinamida y adenina (NADPH) durante 30 minutos antes de la incubación con el sustrato marcador. Se incluyeron inhibidores de acción directa y dependientes del metabolismo conocidos de enzimas CYP como controles positivos. En las condiciones experimentales examinadas, hubo poca o ninguna evidencia de inhibición directa de CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, o CYP3A4/5 (medido por 6β-hidroxilación de testosterona y 1'-hidroxilación de midazolam) por CPP-115. Además, hubo poca o ninguna evidencia de inhibición dependiente del tiempo o el metabolismo de cualquiera de las enzimas CYP evaluadas por CPP-115.

Ejemplo 24

65 **Estabilidad metabólica en hepatocitos humanos crioconservados.** Se evaluó la estabilidad metabólica de CPP-115 en hepatocitos humanos crioconservados usando un método de LC/MS/MS. Los hepatocitos humanos crioconservados se prepararon de un conjunto de 3 individuos (1.000.000 de células/ml) y se incubaron en triplicado con CPP-115 (5

μM) durante 0, 10, 60, 120 y 240 minutos. Se produjo poca pérdida de CPP-115 durante el curso de la incubación (variando del 6 % a los 10 minutos hasta el 16 % a los 240 minutos), consistente con un fármaco que sobrevive el metabolismo de primer pase y a través de varias semividas en el torrente sanguíneo.

5 **Ejemplo 25**

10 Efecto de CPP-115 en canales de potasio hERG clonados. Se evaluaron los efectos in vitro de CPP-115 en la corriente de canal hERG (gen relacionado con éter-a-go-go) (un sustituto para IKr, la corriente de potasio cardiaca de rectificación retrasada, que se activa rápidamente). Se ensayaron dos concentraciones de CPP-115 (10 y 300 μM) a temperatura casi fisiológica. CPP-115 inhibió la corriente de potasio de hERG en una media del 1,1 % a 10 μM ($n = 3$) y el 1,5 % a 300 μM ($n = 3$) frente al 0,8 % para controles con vehículo ($n = 3$). La inhibición de hERG a ambas concentraciones de ensayo no era estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuando se comparaba con los valores control de vehículo, lo que indica un riesgo mínimo para arritmias cardíacas inducidas por CPP-115. La IC_{50} para el efecto inhibidor de CPP-115 sobre la corriente de potasio de hERG no se calculó debido a la falta de inhibición significativa. En condiciones idénticas, el control positivo (terfenadina 60 nM) inhibía la corriente de potasio de hERG en una media del 85,3 % ($n = 2$). El efecto de terfenadina confirma la sensibilidad del sistema de ensayo a la inhibición de hERG.

15 **Ejemplo 26**

20 Resultados de ensayos clínicos usando CPP 115. En un estudio de fase I aleatorizado, con doble enmascaramiento, controlado por placebo, de grupos paralelos, de seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de dosis orales únicas ascendentes de CPP-115 se determinaron. Cada sujeto recibió una dosis única de CPP-115 o placebo correspondiente, en una composición con zumo de fruta (por ejemplo, Zumo de arándanos y granada Ocean Spray™), seguido por observaciones repetidas para cada uno de los objetivos del estudio.

25 Se determinó que la dosis inicial para este primer estudio en el hombre de CPP-115 era 5 mg/día para una persona de 60 kg basado en estudios preclínicos de toxicidad en perros y ratas que identificaron un “Nivel de efecto adverso no observado” (NOAEL) de 6 y 2,3 mg/kg/día en ratas y perros, respectivamente (Dosis equivalente humana [DEH] = 0,96 y 1,24 mg/kg/día, en ratas y perros, respectivamente). Usando la especie más sensible (rata), y asumiendo un peso de 60 kg, se calculó que una dosis inicial recomendada máxima era de 5 mg. Este cálculo asume la aplicación de un factor de seguridad de 10.

30 Como una cuestión de protocolo, se pueden estudiar seis niveles de dosis secuencialmente crecientes de CPP-115, empezando a 5 mg y siguiendo gradualmente a través de 13, 32, 80, 200 y 500 mg, y placebo correspondiente. Alternativamente, se puede desarrollar una relación entre dosis y respuesta empezando en la mayor dosis permitida por la regulación del gobierno y ajustando la dosis hacia abajo hasta que no se observe efecto. Cada cohorte de dosis consistía en 8 sujetos. Se incorporó un segundo grupo de dosis de 13 mg cuando se encontró que el grupo de tratamiento de 13 mg inicial (cohorte 2) tenía niveles inusualmente altos de potasio el día 3. Dentro de cada cohorte de dosis, los sujetos se aleatorizaron para recibir CPP-115 o placebo correspondiente en una proporción 3:1. Se siguió a los sujetos para seguridad durante un periodo de 30 días después de recibir su dosis única del tratamiento del estudio.

35 Este estudio investigó la farmacocinética (PK) de CPP-115. Se recogieron muestras de sangre y orina para análisis PK en múltiples tiempos, programados durante el estudio empezando en predosis el día 1 y hasta 48 horas después de la dosis. Se midieron las concentraciones de CPP-115 en plasma y orina.

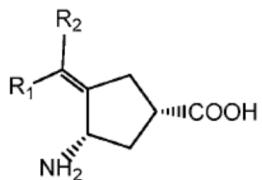
40 El aumento de la dosis puede seguir hasta completar la cohorte de dosis de 500 mg. La MDT se definió como la mayor dosis evaluada que no produjo ninguna toxicidad relacionada con el fármaco de estudio inaceptable. (La dosis superior estudiada de 500 mg es más de 10 veces mayor que las dosis eficaces predichas de los modelos animales de 15-30 mg/día). Usando el protocolo de dosis alternativas anteriormente mencionadas, se puede usar eficazmente hasta aproximadamente 80 mg/día del compuesto CPP-115.

45 Resumen de los resultados: sin sucesos adversos serios o graves; sin sucesos cardiovasculares o respiratorios; absorbido rápidamente (tiempo hasta concentración en sangre pico aproximadamente 30 minutos); semivida de eliminación de 4-6 horas; cmax aumentada de una manera proporcional a la dosis sobre el intervalo de las dosis estudiadas; hubo un aumento mayor que proporcional en las AUC

50 invención, tales procedimientos, técnicas y modificaciones limitadas solo por la disponibilidad comercial o sintética de cualquier correspondiente reactivo o material de partida.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5

para uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular,

en donde R₁ y R₂ se seleccionan de H y F, y al menos uno de R₁ y R₂ es F; o una sal del mismo.

10

2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde R₁ y R₂ son F.

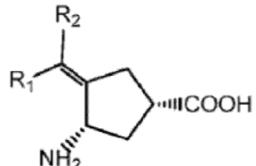
15

3. El compuesto para uso de la reivindicación 2, en donde dicha administración es oral; preferiblemente: en donde dicha cantidad de dicho compuesto es aproximadamente 0,001 mg/sujeto de 60 kg/día – aproximadamente 10.000 mg/sujeto de 60 kg/día; más preferiblemente: en donde dicha cantidad de dicho compuesto es aproximadamente 32 mg/sujeto de 60 kg/día – aproximadamente 200 mg/sujeto de 60 kg/día; más preferiblemente: dicha cantidad es aproximadamente 80 mg/sujeto de 60 kg/día.

20

4. El compuesto para uso de la reivindicación 2, en donde dicho compuesto se proporciona en una composición farmacéutica.

5. Un compuesto de fórmula



25

para uso en reducir la actividad de una ornitina aminotransferasa expresada por un carcinoma hepatocelular humano,

30

en donde R₁ y R₂ se seleccionan de H y F, y al menos uno de R₁ y R₂ es F; o una sal del mismo; y

dicho uso comprende poner en contacto un medio celular que comprende un carcinoma hepatocelular que expresa una ornitina aminotransferasa con una cantidad de dicho compuesto eficaz para reducir la actividad ornitina aminotransferasa, reduciendo mediante ello la producción de glutamato en dicho medio celular.

35

6. El compuesto para uso de la reivindicación 5, en donde R₁ y R₂ son F.

7. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde dicho compuesto se proporciona en una composición farmacéutica.

40

8. El compuesto para uso de la reivindicación 6, en donde dicho contacto es con un sujeto humano en necesidad del mismo; preferiblemente en donde dicho compuesto se proporciona en una composición farmacéutica.

9. El compuesto para uso de la reivindicación 8, en donde dicho contacto comprende la administración oral.

45

10. El compuesto para uso de la reivindicación 9, en donde dicha cantidad de dicho compuesto es aproximadamente 0,001 mg/sujeto de 60 kg/día – aproximadamente 10.000 mg/sujeto de 60 kg/día; preferiblemente: en donde dicha cantidad de dicho compuesto es aproximadamente 32 mg/sujeto de 60 kg/día – aproximadamente 200 mg/sujeto de 60 kg/día; más preferiblemente: en donde dicha cantidad es aproximadamente 80 mg/sujeto de 60 kg/día.

50

Figura 1

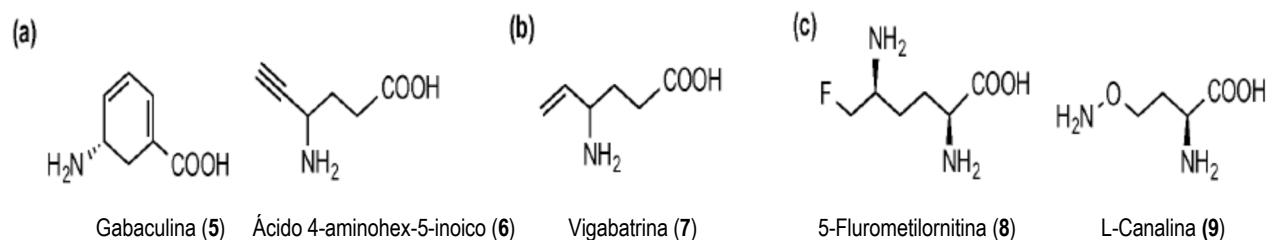


Figura 2

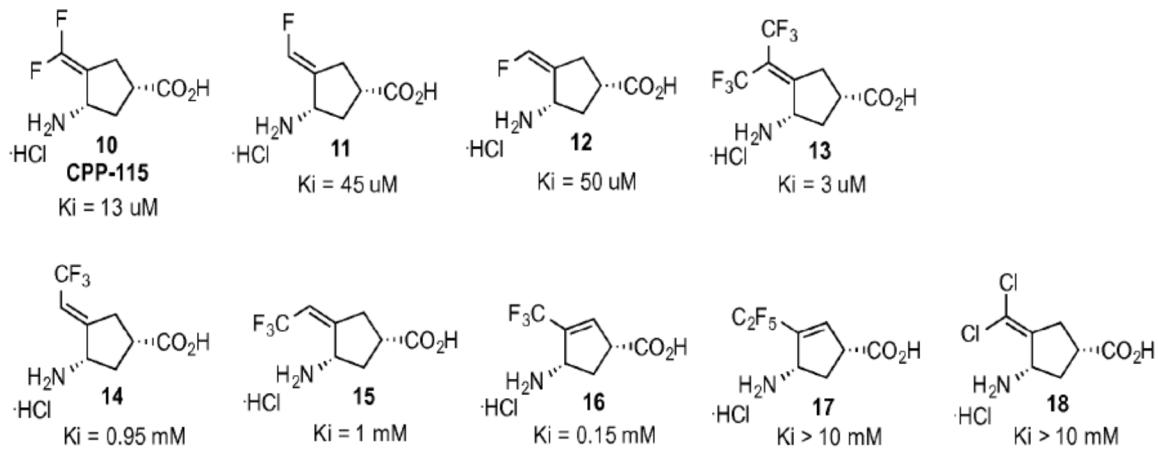


Figura 3

