

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 144**

51 Int. Cl.:

**C07D 277/06** (2006.01)

**A61K 31/425** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/030053**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14763483 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 2968346**

54 Título: **Métodos y composiciones para la modulación del ciclo de gamma-glutamilo**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361801709 P**

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

**19.08.2024**

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY, LLC  
(100.0%)  
1500 East Tropicana Avenue, Suite 125  
Las Vegas, NV 89119, US**

72 Inventor/es:

**RUBIN, DAVID y  
RUBIN, EYAL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 977 144 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

Métodos y composiciones para la modulación del ciclo de gamma-glutamilo

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere, en general, a compuestos de fórmula general I y a sus sales o ésteres farmacéuticamente aceptables. La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que los contienen, a métodos para producir los compuestos anteriores y a su uso como inhibidores del ciclo de gamma-glutamilo (GGCI, *gamma-glutamyl cycle inhibitors*), que son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades, particularmente neoplasias malignas, complicaciones relacionadas con neoplasias malignas y otras afecciones patógenas en las que está implicado el ciclo de gamma-glutamilo (GGC, *gamma-glutamyl cycle*). En particular, la divulgación proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de neoplasias malignas a través de la modulación del ciclo de gamma-glutamilo y de la biosíntesis *de novo* de glutatión.

15 **Antecedentes**

Lo siguiente incluye información que puede ser útil para comprender diversos aspectos y realizaciones de la presente divulgación. No se admite que cualquier información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior o relevante, para las invenciones actualmente descritas o reivindicadas, o que cualquier publicación o documento al que se haga referencia específica o implícitamente sea del estado de la técnica. En el documento WO 2011029920 A1 se desvelan, entre otros, derivados de tiazolidina que inhiben la glutaminil ciclasa y que son útiles en el tratamiento del cáncer.

25 El ciclo de gamma-glutamilo (GGC) (Fig. 2) es una ruta biosintética que está presente en casi todas las células vivas. Permite el transporte de aminoácidos, transferrina, hierro y de otros residuos desde el exterior de una célula viva, a través de la membrana celular, al citoplasma. Algunos de los aminoácidos son esenciales para la biosíntesis *de novo* de glutatión. El GGC lo es para la biosíntesis de glutatión. El GGC no requiere insulina como cofactor.

30 La  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GGCS) y la glutatión sintetasa (GS), catalizan la biosíntesis de glutatión (GSH), que son dos enzimas del ciclo de gamma-glutamilo. La concentración de cisteína celular y los niveles de GGCS son limitantes de la velocidad. La GSH inhibe por retroalimentación la GGCS, lo que conduce a un estado estacionario en el GSH celular.

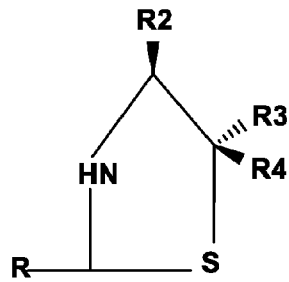
35 La gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) cataliza dos reacciones: la hidrólisis de un enlace  $\gamma$ -glutamilo y transpeptidación (TP). La GGT se induce a niveles elevados en muchas lesiones preneoplásicas (focos hepáticos alterados, FHA) en las primeras fases de la hepatocarcinogénesis (HC) en roedores. La ubicuidad de niveles elevados de GGT en muchos carcinomas hepáticos y extrahepáticos de roedores y seres humanos ha llevado a la hipótesis de que la GGT proporciona una ventaja de crecimiento a las células focales durante la carcinogénesis. Dado que la GGT participa en la desintoxicación de xenobióticos, se ha sugerido que la ventaja en el crecimiento se debe a la resistencia a la toxicidad aguda de los carcinógenos.

40 **Sumario de la invención**

45 Aunque existen muchos agentes terapéuticos establecidos dirigidos a la terapia del cáncer, los inventores reconocieron que los compuestos estereoisómeros de la presente divulgación son útiles como agentes terapéuticos contra el cáncer. La presente invención se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Las divulgaciones adicionales se facilitan únicamente como referencia.

50 La presente divulgación proporciona métodos sintéticos, análogos de 5-oxoprolina, y formulaciones farmacéuticas y kits que comprenden los análogos. Los compuestos y las formulaciones farmacéuticas son útiles para terapias contra el cáncer dirigidas a la 5-oxoprolinasa, una enzima del ciclo de gamma-glutamilo. El bloqueo de la enzima 5-oxoprolinasa bloquea la división celular de las células hiperproliferativas, tales como células cancerosas, al interferir con el transporte de aminoácidos esenciales al interior de la célula y con la síntesis de glutatión y de otros productos de la biosíntesis del ciclo de gamma-glutamilo. Los métodos y las composiciones son útiles para controlar la progresión tumoral, la resistencia a los fármacos y su direccionamiento. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos para sintetizar y utilizar moduladores/inhibidores del ciclo de gamma-glutamilo y de la biosíntesis *de novo* de glutatión, que son útiles en el tratamiento de neoplasias malignas. Específicamente, las composiciones y los métodos de uso de las mismas se proporcionan para interrumpir la conversión de 5-oxoprolina en ácido glutámico mediante la 5-oxoprolinasa.

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto estereoisómero representado por la fórmula (I):



o un éster y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en donde:

5 R se selecciona independientemente de arilo, heteroarilo, para-metoxifenilo, metilcarbonilo, 2,6-dimetil-1,5-heptadienilo, 2,6-dimetil-5-heptenilo, orto-hidroxifenilo, fenilo y 3-aldehído-propilo opcionalmente sustituidos;

10 R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, COOH; ésteres de glucosa y ésteres de ácido glucurónico;

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de H, metilo o alquilo inferior; y

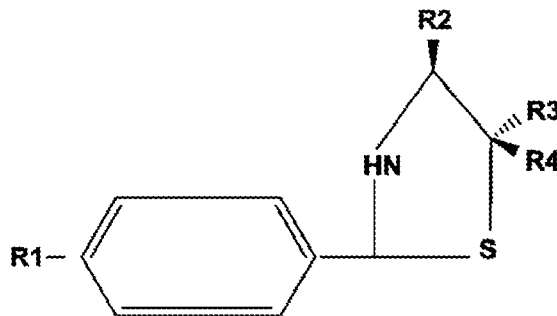
15 S se selecciona independientemente del grupo que consiste en azufre, selenio, telurio u oxígeno opcionalmente sustituidos.

Los compuestos de fórmula I pueden usarse en los métodos de la presente divulgación como se describe en el presente documento. R puede obtenerse mediante la reacción de un aldehído adecuado en los métodos de síntesis descritos en el presente documento. El aldehído puede ser, por ejemplo, cualquier aril-CHO o heteroaril-CHO, aldehído pirúvico, citral, citronelal, salicilaldehído, benzaldehído, dialdehído glutárico o p-metoxilbenzaldehído sustituidos.

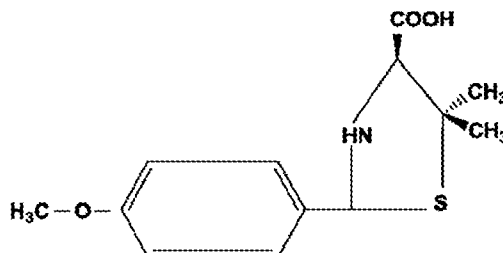
20 En algunos aspectos de la divulgación, R y S son como se describe anteriormente, y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en COOH; ésteres de glucosa y ésteres de ácido glucurónico, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de metilo o alquilo inferior. En algunos aspectos de la divulgación, R<sub>2</sub> es COOH y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son H. En algunos aspectos de la divulgación, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son H, R no es orto-hidroxifenilo. En algunos aspectos de la divulgación, R<sub>2</sub> puede ser -COOR<sub>5</sub>, donde R<sub>5</sub> es un éster de alquilo inferior. En este aspecto de la divulgación, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son metilo, y R es orto-hidroxifenilo, R<sub>5</sub> no es metilo.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto y a sales, cristales y polimorfos del mismo, que tiene la fórmula (II):

30



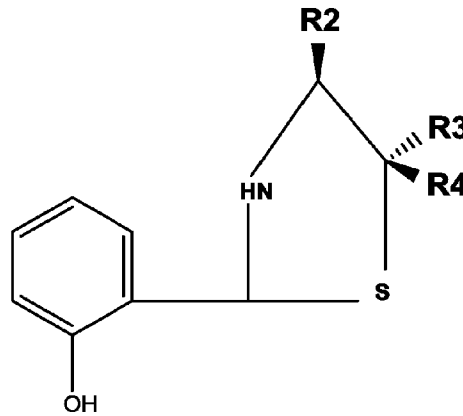
35 donde la R<sub>1</sub> es -OCH<sub>3</sub> y R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son como se definen anteriormente para la fórmula (I). Más específicamente, en la presente invención, el compuesto es uno que tiene la fórmula (III), también denominado en el presente documento PMB-GGCI o MBDTA:



Fórmula III

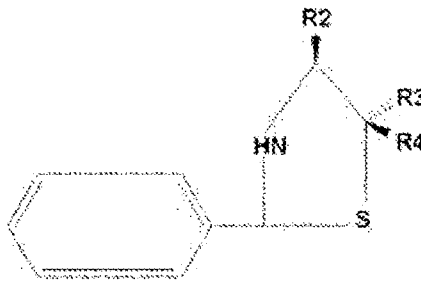
o es una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto y a sales, cristales y polimorfos del mismo, que tiene la fórmula (IV), también denominado en el presente documento SA-GGCI cuando R2 es COOH y R3 y R4 son metilo:



Fórmula IV

- 10 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un compuesto y a sales, cristales y polimorfos del mismo, que tiene la fórmula (V), también denominado en el presente documento BA-GGCI cuando R2 es COOH y R3 y R4 son metilo:



Fórmula V

- 15 En los compuestos de la presente divulgación, el carbono al que está unido el grupo carboxilo está en la conformación (L). En el presente documento, la referencia a los compuestos (L) y (D) de la presente divulgación se refiere a la conformación estereoquímica en el carbono adyacente al grupo R2 en los compuestos de Fórmula I-V o en el carbono adyacente al grupo COOH en la Fórmula III. Cuando el anillo de *p*-metoxibencilo no está sustituido, como en la  
 20 presente invención, el compuesto es ácido (1*L*)-2-imino-3-*p*-metoxibencil-4 sulfanil-5,5-dimetil-1-carboxílico, que se denomina alternativamente ácido (4*L*)-3-imino-2-*p*-metoxibencil-1 sulfanil-5,5 dimetil 4-carboxílico o ácido (4*L*)-2-*p*-metoxibencil-5,5-dimetil-4-tiazolidin carboxílico (MBDTA). En un aspecto, los compuestos de la presente divulgación pueden obtenerse conjugando 3,3 dimetil-(*L*)-cisteína, es decir, (*L*)-penicilamina, otros análogos de (*L*)-cisteína o  
 25 cistamina con un aldehído adecuado para generar los compuestos estereoisómeros de la presente divulgación.

- En algunos aspectos de la divulgación, el átomo de S en el anillo heterocíclico puede reemplazarse con selenio, telurio u oxígeno. Sin embargo, esto no se aplica a la fórmula (III) de acuerdo con la invención. En un aspecto, el anillo de tiazolidina tiene un sustituyente dimetilo para su actividad óptima. En otro aspecto, la posición 5 del anillo de tiazolidina  
 30 está sustituida con un metilo y un hidrógeno.

- La *D*-penicilamina (a menudo denominada penicilamina) es un fármaco que se utiliza para eliminar el cobre en los pacientes, por ejemplo, en pacientes con enfermedad de Crohn, un trastorno genético del metabolismo del cobre. Se han descrito determinados conjugados de aldehído de *D*-penicilamina para su uso como inhibidores quelantes del  
 35 cobre de la tirosinasa. Véase la patente de EE. UU. 5.169.858.

- Sin embargo, a diferencia de la *D*-penicilamina, el estereoisómero de *L*-penicilamina es tóxico y no se ha aprobado como fármaco. Por lo tanto, los inventores descubrieron sorprendentemente que los inhibidores del ciclo de (*L*)-gamma-glutamilo (GGCI) de la presente divulgación muestran toxicidad baja inesperada. En determinados aspectos  
 40 de la divulgación, los inventores descubrieron sorprendentemente que cuando se utilizaban isómeros L de penicilamina

como material de partida, el GGCI resultante, sintetizado usando el esquema sintético como el que se describe en el presente documento, se obtenía una síntesis de alto rendimiento de compuestos que tenían gran eficacia y baja toxicidad, mientras que si se utilizaban isómeros D de penicilamina como material de partida se obtenían compuestos que no tenían eficacia. Más específicamente, sorprendentemente, los inventores descubrieron que los compuestos con conformación (*L*) de la presente divulgación mostraban niveles sorprendentemente altos de actividad contra el cáncer en modelos animales y en el tratamiento de uso compasivo de sujetos humanos, mientras que los compuestos con conformación (*D*) tenían actividad mínima o nula. Por ejemplo, los inventores observaron que (*L*)-MBDTA tenía una fuerte actividad antitumoral mientras que el estereoisómero (*D*) no tenía actividad. Así mismo, cuando los inventores compararon las actividades relativas, los compuestos con conformación (*L*) de la presente divulgación parecían ser al menos 2 veces más activos que el racemato correspondiente, debido a la estereoespecificidad mejorada en la catálisis enzimática de 5-oxoprolina por 5 oxoprolinasa.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquier GGCI desvelado en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición para tratar selectivamente células tumorales, que comprende una cantidad eficaz de un análogo de 5-oxoprolina, mediante lo cual el análogo se transporta al interior de la célula y se une a, pero no es metabolizado por, 5-oxoprolinasa. Los compuestos de la presente divulgación son eficaces para inhibir la síntesis de ácido glutámico en el ciclo de gamma-glutamilo. En un aspecto, la composición inhibe la producción de sustrato para la glutatión-S-transferasa. En un aspecto, la composición inhibe la glutatión-S-transferasa que comprende ácido 2-imino-3-*p*-metoxibencil-4 sulfanil-5 dimetil 1-carboxílico. En un aspecto, la composición comprende una sal de GGCI y polimorfos de la misma. En un aspecto, se proporciona una sal de cloruro de GGCI aislada que tiene un intervalo de pureza seleccionado del grupo que consiste en un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de pureza. En un aspecto, se proporciona un GGCI anhidrato, dihidrato, trihidrato o tetrahidrato sustancialmente puro. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un cristal de GGCI sustancialmente puro que tiene capas alternas de moléculas de GGCI y moléculas de mesilato (sal de mesilato), y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de cualquiera de las fórmulas I-V para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer, hiperplasia y neoplasia. En un aspecto, de este modo se inhibe y/o reduce la MDR. En un aspecto, de este modo se inhibe y/o se reduce la progresión del tumor. En un aspecto, los compuestos ilustrativos se unen a residuos de azúcar y/o tienen actividad de lectina de alta afinidad.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un GGCI de fórmulas I-V para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica, mediante lo cual se inhibe el ciclo de gamma-glutamilo. En un aspecto, el GGCI es un análogo de 5-oxoprolina. En un aspecto, el análogo de 5-oxoprolina es el ácido 2-imino-3-*p*-metoxibencil-4 sulfanil-5,5 dimetil 1-carboxílico. En un aspecto, la inhibición del GGC resulta de la inhibición de la biosíntesis por parte del GGC, por ejemplo, la inhibición de la producción de un producto, un intermediario o un metabolito de la ruta GGC.

En un aspecto de la divulgación, el nivel de glutatión se reduce en las células cancerosas. En un aspecto, los compuestos de la presente divulgación inhiben la glutatión-S-transferasa, por ejemplo, inhibiendo la producción de su sustrato. El glutatión protege a las células del estrés oxidativo, incluyendo agentes alquilantes reactivos desintoxicantes y agentes oxidantes, y ayuda a bloquear los efectos dañinos de los agentes alquilantes y/o agentes oxidantes terapéuticos en las células cancerosas. En determinados aspectos, el GGCI puede administrarse sinérgicamente con un agente alquilante y/o agentes oxidantes que pueden aumentar el riesgo/daño a las células cancerosas. En determinados aspectos, los GGCI de la presente divulgación pueden administrarse junto con un inhibidor de la glutatión-S-transferasa para inhibir sinérgicamente el GGC. Por ejemplo, cualquiera de los compuestos de la presente divulgación puede administrarse ventajosamente de forma simultánea y/o secuencial con extracto tumérico y/o ácido tacrínico. En determinados aspectos, el GGCI puede utilizarse para prevenir o disminuir la resistencia a una o más terapias contra el cáncer, y/o para reducir la degradación metabólica de terapias contra el cáncer alquilantes y/u oxidantes, permitiendo disminuir la dosis y reducir los efectos secundarios.

En un aspecto, la dosis eficaz de GGCI es de 2 a 5 g/kg, por ejemplo, 4 g/kg. En otro aspecto, la dosis eficaz de GGCI se administra en una o más dosis de 3,5 g/kg por cada dosis. En determinados aspectos, la una o más dosis eficaces de GGCI se administran por vía subcutánea. En un aspecto, la una o más dosis eficaces de GGCI se administran por vía intravenosa. En un aspecto, la una o más dosis eficaces de GGCI se administran por vía intramuscular. En un aspecto, la una o más dosis eficaces de GGCI se administran por vía oral. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido. En un aspecto, el tratamiento comprende el tratamiento de tumores sólidos. En un aspecto, los tumores comprenden sarcomas, carcinomas o linfomas. En un aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de: pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario, vejiga, cabeza y cuello, tiroides, cerebro, piel y riñón. En un aspecto, la dosis se administra mediante una vía de suministro seleccionada del grupo que consiste en las vías intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, tópica, subcutánea, intranasal, oral o epidural.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para sintetizar el compuesto de fórmula I y sus sales,

en donde el compuesto se obtiene mediante: el esquema de síntesis de la Figura 1. En un aspecto, se sintetizó ácido (L)-2-imino-3-*p*-metoxibencil-4 sulfanil-5 dimetil 1-carboxílico. En un aspecto, cantidades equimolares de metoxi tolueno (*p*-metoxibenzaldehído), di-metil cisteína y dióxido de manganeso, se disolvieron en dos litros de etanol al 70 %. En un aspecto, la mezcla se preparó en un evaporador rotatorio y la temperatura se elevó a 70 °C. En un aspecto, después de aproximadamente 1 hora, todos los ingredientes se disolvieron. En un aspecto, después se redujo el volumen en un litro. En un aspecto, la solución se dejó enfriar en el matraz durante la noche hasta alcanzar la temperatura ambiente. En un aspecto, los cristales blancos precipitados de GGCI se filtraron y se secaron en una estufa de vacío después de un día. En un aspecto, la divulgación proporciona intermedios para dicho esquema de síntesis de la Figura 1.

En otros aspectos, para obtener el compuesto deseado, la cisteína, la cistamina y el aldehído apropiados, sustituidos, pueden hacerse reaccionar en los esquemas sintéticos de la Figura 1. El aldehído puede ser, por ejemplo, cualquier aril-CHO o heteroaril-CHO, aldehído pirúvico, citral, citronelal, salicilaldehído, benzaldehído, dialdehído glutárico o *p*-metoxilbenzaldehído sustituidos. En un aspecto, el isómero (L) de cisteína o cisteína sustituida (o un análogo de teluro u oxígeno del mismo) se usa como reactivo de partida para obtener un enantiómero del compuesto de fórmula (I) que tiene una estereoquímica específica en el carbono al que se une el grupo R<sub>2</sub>, o el grupo de ácido carboxílico. Como reactivos ilustrativos pueden incluirse (L)-penicilamina, (L)-cisteína y cistamina.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan compuestos representados por la fórmula general (I), sus racematos, sus sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones farmacéuticas que los contienen, o mezclas de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para la preparación de compuestos orgánicos de fórmula general (I), sus racematos, sus sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es proporcionar intermedios, un proceso para su preparación y su uso en métodos para preparar compuestos de fórmula general (I).

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a los compuestos estereoméricos de fórmula general I, a sus ésteres, racematos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde R se selecciona independientemente de arilo, heteroarilo, para-metoxifenilo, metil carbonilo, 2,6-dimetil-1,5-heptadienilo, 2,6-dimetil-5-heptenilo, 2-hidroxi fenilo, fenilo y 3-aldehído-propilo opcionalmente sustituidos; R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en COOH; y glucosa esterificada o ácido glucurónico; R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de metilo o alquilo inferior; y S se selecciona independientemente del grupo que consiste en azufre, selenio, telurio u oxígeno opcionalmente sustituidos. En algunos casos, cuando se usa salicilaldehído (SA) o benzaldehído (BA) para obtener los compuestos de Fórmula I-V de la presente divulgación, también puede obtenerse un efecto analgésico sinérgico cuando se tratan sujetos administrando esos compuestos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, los compuestos de fórmulas I-V también pueden sintetizarse usando compuestos de partida ilustrativos, tales como, por ejemplo, (L)-penicilamina, (L)-cisteína y cistamina.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento que comprende, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende GGCI.

En un aspecto, el sujeto tiene un cáncer de tumor sólido. En otro aspecto, el tumor sólido comprende sarcomas, carcinomas o linfomas. En otro aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de: pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario, vejiga, cabeza y cuello, tiroides, cerebro, hígado, vesícula biliar, piel, colon y riñón. En un aspecto, el tumor sólido es un tumor con mala reoxigenación.

En un aspecto, cada dosis de GGCI está comprendida entre aproximadamente 1 ng/kg y menor hasta aproximadamente 10 g /kg, y dicha dosis se administra por una vía de suministro seleccionada del grupo que consiste en la vía intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intramuscular, intravenosa, parenteral, intranasal, intracraneal, tópica, subcutánea, oral y epidural.

Más específicamente, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método para tratar selectivamente células tumorales en un sujeto, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (III) o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, mediante lo cual el compuesto se metaboliza y es eficaz para inhibir la síntesis de ácido glutámico en el ciclo de gamma-glutamilo. En una realización, la composición inhibe la glutatión-S-transferasa.

La presente invención también proporciona un compuesto representado por la fórmula (III) o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer, hiperplasia, neoplasia. En una realización, se inhibe o reduce la progresión del tumor, o se inhibe o reduce la resistencia a múltiples fármacos (MDR, por las siglas del inglés *multi-drug resistance*).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (III) o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica mediante lo cual se inhibe la biosíntesis por el ciclo de gamma-glutamilo. En una realización, el nivel de glutatión se reduce en las células cancerosas. En realizaciones de esta realización, (a) se inhibe la etapa de reacción catalizada por la 5-oxo-prolinasa en el ciclo de gamma-glutamilo (GGC), (b) el compuesto inhibe la glutatión-S-transferasa, (c) la dosis eficaz del compuesto varía de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 6 g/kg, (d) la dosis eficaz del compuesto se administra en una o más dosis de aproximadamente 3,5 g/kg a aproximadamente 4,0 g/kg para cada dosis, (e) la una o más dosis eficaces del compuesto definido en la reivindicación 5 se administra(n) por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, (f) la una o más dosis eficaces del compuesto definido en la reivindicación 5, se administra(n) por vía oral, o (g) cada dosis del compuesto es de entre aproximadamente 1 ng/kg y menos de aproximadamente 10 mg/kg, y dicha dosis se administra mediante una vía de suministro seleccionada del grupo que consiste en la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, tópica, subcutánea, oral y epidural. Opcionalmente además, el cáncer es un tumor sólido, p. ej., el tumor sólido comprende sarcomas, carcinomas o linfomas (por ejemplo, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de: pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario, vejiga, cabeza y cuello, tiroides, cerebro, piel y riñón).

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra esquemas sintéticos representativos para preparar análogos de GGCI/5-oxoprolina.

La Figura 2 es un diagrama que muestra la ruta bioquímica de GGC.

Las Figuras 3A y 3B son imágenes comparativas de tamaños de tumores entre el grupo de control y el grupo de ratones lampiños tratados con GGCI a los que se les ha injertado un melanoma maligno humano.

Las Figuras 4A y 4B son imágenes comparativas de tamaños de tumores entre el grupo de control y el grupo de ratones lampiños tratados con GGCI a los que se les ha injertado un cáncer de pulmón humano.

### Descripción detallada

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere en general a inhibidores del ciclo de gamma-glutamilo. La divulgación se basa en la mayor actividad de la enzima gamma-glutamil transpeptidasa que se encuentra en las células cancerosas y en la tasa de división sustancialmente más rápida de las células cancerosas en comparación con las células de origen no canceroso. La inhibición del GGC, por ejemplo, bloqueando a, y/o interfiriendo con, una o más enzimas del GGC, puede conducir a la supresión del crecimiento de las células cancerosas y a la reducción del número de células cancerosas. La inhibición del GGC puede realizarse presentando un "falso metabolito" inhibidor competitivo de una enzima del ciclo de gamma-glutamilo, que afecta preferentemente a células que se dividen rápidamente, tales como células cancerosas. Haciendo esto, el GGCI de la presente divulgación puede tener efectos más nocivos sobre las células cancerosas que sobre las no cancerosas.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a la síntesis de los inhibidores de la presente divulgación que compiten con la 5-oxoprolina para unirse a la 5-oxoprolinasa, reduciendo y/o inhibiendo así la biosíntesis por otras enzimas en el ciclo de gamma-glutamilo a través del empobrecimiento del sustrato. Esto bloquea el transporte de aminoácidos mediado por GGC hacia el interior de la célula e interfiere con la división celular. Además, los GGCI de la presente divulgación interfieren además con la síntesis de glutatión por GGC. Dado que las células cancerosas necesitan sustancialmente más aminoácidos para soportar un tiempo de duplicación mucho más rápido que las células no cancerosas, los GGCI de la presente divulgación dañarán preferentemente las células cancerosas.

### Definiciones

El término "alquilo" incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal p. ej., metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, *terc*-butilo, isobutilo, etc.), grupos cicloalquilo (alíclicos) (ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo), grupos cicloalquilo alquil-sustituídos y grupos alquilo cicloalquil-sustituídos. El término alquilo incluye además grupos alquilo, que comprenden oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo, átomos que reemplazan uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo. La expresión "alquilo aromático" incluye grupos alquilo sustituidos con uno o más grupos arilo. La expresión "alquilo inferior" como se usa en el presente documento se refiere a [3 o menos carbonos].

El término "arilo" incluye grupos con aromaticidad, incluyendo grupos aromáticos de un solo anillo de 5 y 6 miembros que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos, así como sistemas multicíclicos con al menos un anillo aromático. Los ejemplos de grupos arilo incluyen benceno, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina y similares. Además, el término "arilo" incluye grupos arilo multicíclicos, p. ej., tricíclicos, bicíclicos, p. ej., naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofeno, metilendioxifenilo, quinolina, isoquinolina, naftiridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano,

deazapurina o indolizina. Aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también pueden denominarse "heterociclos de arilo", "heterociclos" "heteroarilos" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede sustituirse en una o más posiciones del anillo con los sustituyentes como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, alcoxicarboniloxi, ariloxicarboniloxi, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (que incluye alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (que incluye alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfinilo, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un residuo aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también pueden fusionarse, o formar puentes, con anillos alicíclicos o heterocíclicos que no son aromáticos, para formar un sistema multicíclico (p. ej., tetralina, metilendioxfenilo).

El término "alquileo" se refiere a grupos alifáticos saturados divalentes e incluye grupos de cadena tanto lineal como ramificada.

El término "alqueniileo" se refiere a grupos alifáticos divalentes que tienen un doble enlace e incluye grupos de cadena tanto lineal como ramificada.

Como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimentación. "Animal" incluye invertebrados y vertebrados de sangre fría y caliente, tales como peces, crustáceos, reptiles y, en particular, mamíferos. "Mamífero" incluye, sin limitación, ratones; ratas; conejos; cobayas; perros; gatos; ovejas; cabras; vacas; caballos; primates, tales como monos, chimpancés, simios y seres humanos prenatales, pediátricos y adultos.

Como se utiliza en el presente documento, "prevenir" o "proteger" significa prevenir total o parcialmente, mejorar o controlar.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, o a la administración de un agente del que se sospecha que tiene potencial terapéutico. El término incluye tratamiento preventivo (p. ej., profiláctico) y paliativo.

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento, significa una cantidad de compuesto activo, o agente farmacéutico, que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o ser humano, que se está buscando, que incluye alivio o atenuación de los síntomas de la enfermedad que se está tratando y/o que tenga una cantidad suficiente para ser útil y proporcionar el criterio de valoración terapéutico deseado. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede impedir el crecimiento de las células cancerosas existentes y/o su destrucción, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, p. ej., evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad y/o determinando la tasa de respuesta.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en el presente documento, significa que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los restantes ingredientes que comprende una formulación, y/o con el mamífero que se esté tratando con la misma.

El término "cáncer" se refiere, o describe, la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado y/o actividades hiperproliferativas. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides malignas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("CPNM"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterápicos incluyen, pero sin limitación: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales que son venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizantes e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterápicos incluyen compuestos usados en la "terapia dirigida" y en la quimioterapia convencional. Algunos ejemplos de agentes

- quimioterápicos incluyen: erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, n.º CAS 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR<sup>®</sup>, Lilly), PD-0325901 (n.º CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino(II), n.º CAS 15663-27-1), carboplatino (n.º CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), pemetrexed (ALIMTA<sup>®</sup>, Eli Lilly), trastuzumab (HERCEPTIN<sup>®</sup>, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-carboxamida, n.º CAS 85622-93-1, TEMODAR<sup>®</sup>, TEMODAL<sup>®</sup>, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX<sup>®</sup>, ISTUBAL<sup>®</sup>, VALODEX<sup>®</sup>) y doxorubicina (ADRIAMYCIN<sup>®</sup>), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.
- Más ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN<sup>®</sup>, Sanofi), bortezomib (VELCADE<sup>®</sup>, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB<sup>®</sup>, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA<sup>®</sup>, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC<sup>®</sup>, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de la PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de la PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de la PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX<sup>®</sup>, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE<sup>®</sup>, Wyeth), lapatinib (TYKERB<sup>®</sup>, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR<sup>™</sup>, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR<sup>®</sup>, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR<sup>®</sup>, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA<sup>™</sup>, Johnson & Johnson), ABRAXANO<sup>™</sup> (Sin cremóforo), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA<sup>®</sup>, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL<sup>®</sup>, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA<sup>®</sup>, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>®</sup>, NEOSAR<sup>®</sup>); alquilulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (concretamente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clomafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (p. ej., caliqueamicina, caliqueamicina gamma1, caliqueamicina omega1 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolin-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, nemorrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, flouxuridina; andrógenos, tales como calusterona, carpionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxuurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK<sup>®</sup> (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE<sup>®</sup>); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA<sup>®</sup>, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.
- También se incluyen en la definición de "agente quimioterápico": (i) agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo, la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM, siglas del inglés), incluyendo, p. ej., tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX<sup>®</sup>; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON<sup>®</sup> (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, p. ej., 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE<sup>®</sup> (acetato de megestrol), AROMASIN<sup>®</sup> (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR<sup>®</sup> (vorozol), FEMARA<sup>®</sup> (letrozol;

Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina); (iv) inhibidores de proteínas cinasas tales como inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores lipídicos de cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, p. ej., PKC-alfa, Raf y H-Ras, tal como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión del VEGF (p. ej., ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión del HER2; (viii) vacunas tales como vacunas para terapia génica, p. ej., ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1, tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos, tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

En la definición de "agente quimioterápico" también se incluyen anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia) y el conjugado de anticuerpo y fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

Como anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos, junto con los inhibidores de gamma-glutamilo de la divulgación se incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pectuzumab, pectuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetán, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab y visilizumab.

Un "metabolito" es un producto producido en el organismo a través del metabolismo de un compuesto, o de una sal del mismo, específico. Los metabolitos de un compuesto pueden identificarse usando técnicas habituales conocidas en la materia y sus actividades pueden determinarse, utilizando ensayos como los descritos en el presente documento. Dichos productos pueden producirse, p. ej., a partir de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la divulgación incluye metabolitos de compuestos de la divulgación, incluyendo los compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente divulgación con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse a su compañera de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse a su compañera de imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen la misma constitución química, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos, o grupos, en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, p. ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereoisómeros pueden separarse en procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

"Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen de forma general el S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la divulgación pueden contener centros asimétricos o quirales, y por lo tanto existen en diferentes formas estereoisómeras. Se pretende que los compuestos de la presente divulgación tengan la conformación (L) en el carbono adyacente al grupo R2 en los compuestos de Fórmula I y II, y en el carbono adyacente al grupo COOH en la Fórmula III.

Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S, se usan para

indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Para los aminoácidos y sus derivados, la nomenclatura D y L se ha utilizado tradicionalmente para designar la conformación en el carbono quiral adyacente al grupo carboxilo. Los prefijos d y l o (+) y (-) pueden emplearse para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, salvo porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede producirse cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la divulgación. Como sales ilustrativas se incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier residuo orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si un compuesto de la divulgación es una base, puede prepararse una sal deseada, farmacéuticamente aceptable, mediante cualquier método adecuado disponible en la materia, p. ej., tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxilo ácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico o similares.

Si un compuesto de la divulgación es un ácido (p. ej., como en la fórmula (III)), la sal deseada, farmacéuticamente aceptable, puede prepararse mediante cualquier método adecuado, p. ej., tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo o similares. Como ejemplos ilustrativos de sales adecuadas se incluyen, pero sin limitación, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

Un "solvato" se refiere a una asociación, o complejo, de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la divulgación. Como ejemplos de disolventes que forman solvatos se incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

## ADMINISTRACIÓN DE COMPUESTOS DE FÓRMULA I

Los compuestos de Fórmula I de la divulgación pueden administrarse mediante cualquier vía que sea apropiada para la afección que se va a tratar. Las vías adecuadas incluyen la vía intraperitoneal (IP), oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intratecal y epidural), transdérmica, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intrapulmonar e intranasal. Para el tratamiento inmunosupresor local, los compuestos pueden administrarse mediante administración intralesional, incluyendo la perfusión o, de otro modo, el contacto del injerto con el inhibidor antes del trasplante. Se apreciará que la vía preferida puede variar, p. ej., con la afección del receptor. Cuando el compuesto se administra por vía oral, éste puede formularse como una píldora, cápsula, comprimido, etc., con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el compuesto se administra por vía parenteral, éste puede formularse con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma farmacéutica inyectable unitaria, como se detalla a continuación.

Una dosis para tratar a pacientes humanos puede variar de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg del compuesto de Fórmula I. La dosis puede ser de aproximadamente 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg de un compuesto de Fórmula I, o cualquier dosis comprendida entre dos de esas dosis. En algunos casos, por ejemplo, cuando la L cisteína o la cistamina u otros compuestos adecuados para su uso como complementos alimenticios se utilizan para obtener compuestos de Fórmula I de la presente divulgación, las dosis también pueden ser de aproximadamente 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg.

mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1500 mg, 2000 mg, 2500 mg, 3000 mg, 3500 mg, 4000 mg, 4500 mg, 5000 mg, 5500 mg, 6000 mg, 6500 mg, 7000 mg, 7500 mg, 8000 mg, 8500 mg, 9000 mg, 9500 mg o de aproximadamente 10.000 mg, o cualquier dosis comprendida entre dos de esas dosis, por ejemplo, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 10.000 mg. Una dosis habitual puede ser de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 600 mg del compuesto. Se puede administrar una dosis una vez al día (UVD), dos veces al día (DVD) o con más frecuencia, dependiendo de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, incluida la absorción, distribución, el metabolismo y la excreción del compuesto en particular. Además, los factores de toxicidad pueden influir en la pauta de dosificación y administración. Cuando una dosis habitual se administra por vía oral, la píldora, cápsula o comprimido, puede ingerirse diariamente o, con menor frecuencia, durante un período de tiempo específico. La pauta puede repetirse durante una diversos ciclos de terapia.

## COMPUESTOS DE FÓRMULA I PARA SU USO EN MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Los compuestos de fórmula I de la presente divulgación son útiles para el tratamiento de enfermedades, afecciones y/o trastornos hiperproliferativos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer. Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere al tratamiento, o a la prevención de, enfermedades o afecciones que pueden tratarse o prevenirse inhibiendo el GGC. En un aspecto, el compuesto de fórmula I, o un estereoisómero, enantiómero, isómero geométrico, el tautómero, o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, es para uso en un método que comprende administrar a un sujeto, que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de esa sustancia. En un aspecto, un paciente humano se va a tratar con un compuesto de Fórmula I y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho compuesto de Fórmula I está presente en una cantidad para inhibir de manera detectable la actividad del GGC.

Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación, cánceres de mama, ovario, cuello uterino, próstata, testículo, aparato genitourinario, esófago, laringe, glioblastoma, neuroblastoma, estómago, piel, queratoacantoma, pulmón, carcinoma epidermoide, carcinoma macrocítico, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma microcítico, adenocarcinoma de pulmón, hueso, colon, adenoma, páncreas, adenocarcinoma, tiroides, carcinoma folicular, carcinoma indiferenciado, carcinoma papilar, seminoma, melanoma, sarcoma, carcinoma de vejiga, carcinoma hepático y de vías biliares, carcinoma de riñón, trastornos mieloides, trastornos linfoides, tricoleucemia, cáncer de la cavidad bucal y faringe (oral), labio, lengua, boca, faringe, intestino delgado, colon-recto, intestino grueso, recto, cerebro y sistema nervioso central, linfoma de Hodgkin y leucemia.

Los compuestos de Fórmula I pueden ser útiles para el diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* de células de mamíferos, organismos, o afecciones patológicas asociadas, tales como enfermedades hiperproliferativas y/o cáncer.

Los compuestos de Fórmula I pueden ser útiles para tratar afecciones del cerebro y del sistema nervioso central que requieren transporte a través de la barrera hematoencefálica. Determinados compuestos de Fórmula I tienen propiedades penetrantes favorables para su suministro al cerebro. Los trastornos del cerebro que pueden tratarse eficazmente con compuestos de Fórmula I incluyen tumores cerebrales metastásicos y primarios, tales como glioblastoma y melanoma.

Los compuestos de Fórmula I pueden ser útiles para tratar cánceres oculares mediante su suministro localizado en el ojo. Determinados compuestos de Fórmula I tienen propiedades favorables para su suministro y absorción, en el ojo. Determinados compuestos de Fórmula I pueden mejorar la eficacia y prolongar la duración de la respuesta para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés) húmeda junto con ranibizumab (LUCENTIS®, Genentech, Inc.) y bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, Inc.).

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un compuesto de la presente divulgación para su uso en el tratamiento de las enfermedades o afecciones descritas en el presente documento en un sujeto, p. ej., un ser humano, que padece dicha enfermedad o afección. También se proporciona el compuesto de la presente divulgación para su uso en el tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento en un animal de sangre caliente, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que padece dicho trastorno.

## FORMULACIÓN/COMPOSICIONES Y USOS FARMACÉUTICOS

Para utilizar un compuesto de Fórmula I para el tratamiento terapéutico (incluido el tratamiento profiláctico) de mamíferos, incluidos los seres humanos, normalmente éste se formula de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar como una composición farmacéutica. De acuerdo con este aspecto de la divulgación, se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente divulgación en asociación con un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

Una formulación habitual se prepara mezclando un compuesto de Fórmula I y un transportador, diluyente o excipiente. Los transportadores, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen materiales tales como hidratos de carbono, ceras, polímeros hidrosolubles y/o hinchables en agua, materiales

hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El transportador, diluyente o excipiente concreto usado dependerá de los medios y del fin para el cual el compuesto de la presente divulgación se esté aplicando. Los disolventes se seleccionan generalmente basándose en disolventes reconocidos como seguros por los expertos en la materia (GRAS, *generally recognized as safe*) para su administración a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Como disolventes acuosos adecuados se incluyen agua, etanol, propilenglicol, polialquilenglicoles (p. ej., PEG 400, PEG 300), etc. y sus mezclas. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, deslizantes, adyuvantes de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes aromatizantes y otros aditivos conocidos, que proporcionan una presentación atractiva del fármaco (es decir, de un compuesto de la presente divulgación o de composición farmacéutica del mismo) o ayudan en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

Las formulaciones pueden prepararse usando procedimientos convencionales de disolución y mezclado. Por ejemplo, la sustancia farmacológica a granel (es decir, el compuesto de la presente divulgación o la forma estabilizada del compuesto de Fórmula I (p. ej., formando un complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente formador de complejos conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. Normalmente, el compuesto de la presente divulgación se formula en formas de dosificación farmacéutica para proporcionar una dosificación de fácil control del fármaco y para permitir que el paciente cumpla con la pauta posológica prescrita.

La composición (o formulación) farmacéutica para su aplicación, puede envasarse en diversas formas dependiendo del método usado para administrar el fármaco. Por lo general, un artículo de distribución incluye un recipiente en el que se ha depositado la formulación farmacéutica en una forma adecuada. Los expertos en la materia conocen bien recipientes adecuados e incluyen materiales tales como frascos (de plástico y cristal), bolsitas, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulación para impedir el acceso imprudente al contenido del envase. Además, el recipiente tiene depositado en su interior una etiqueta que describe el contenido del recipiente. La etiqueta puede también incluir advertencias adecuadas.

Las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente divulgación pueden prepararse para diversas vías y tipos de administración. Por ejemplo, un compuesto de Fórmula I que tenga un grado de pureza deseado, puede mezclarse opcionalmente con diluyentes, transportadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed.), en forma de una formulación liofilizada, polvo molido, o una solución acuosa. La formulación se puede llevar a cabo mediante la mezcla a temperatura ambiente al pH apropiado y con el grado de pureza deseado, con transportadores fisiológicamente aceptables, es decir, transportadores que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero puede variar de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. La formulación en un tampón acetato a pH 5 es un aspecto adecuado.

Para su uso en el presente documento, el compuesto de la presente divulgación está preferentemente esterilizado. En particular, las formulaciones que se van a utilizar para su administración *in vivo* deben esterilizarse. Dicha esterilización se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración esterilizadas.

Habitualmente, el compuesto puede conservarse como una composición sólida, como una formulación liofilizada o como una solución acuosa (p. ej., en solución salina).

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación que comprenden un compuesto de Fórmula I se formularán, dosificarán y administrarán de una manera, es decir, en cantidades, concentraciones, pautas, ciclo, vehículos y vía de administración, acorde con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar donde se va a suministrar el agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. Además de los compuestos y formas de sal proporcionados en el presente documento, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas, incluyendo comprimidos, cápsulas, soluciones y suspensiones para formas y formulaciones de suministro parenteral y oral, que comprenden un transportador farmacéuticamente aceptable y cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los compuestos de GGCI proporcionados en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas de GGCI pueden incluir sales e hidratos.

En terapia humana y animal para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer y de otros trastornos, enfermedades y afecciones relacionados e indicados en el presente documento, los compuestos y sus formas cristalinas descritos en el presente documento, sus sales farmacéuticamente aceptables y solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquier entidad, pueden administrarse en solitario, pero, en general, se administrarán mezclados con un transportador farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica convencional. Preferentemente, deben administrarse por vía oral en forma de comprimidos que contengan excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como almidón o lactosa, o

en cápsulas u óvulos, en solitario o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contengan agentes aromatizantes o colorantes. También se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, se utilizan mejor en forma de una solución acuosa esterilizada que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para hacer  
5 que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar que se pueden formular de manera convencional.

Como regla general, la cantidad inicial, farmacéuticamente eficaz, del compuesto de Fórmula I, administrada por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/kg, 0,01-1,0, 1,0 a 10,0 o 10,0 a 100,0  
10 mg/kg. La cantidad del compuesto de Fórmula I a administrar por vía parenteral por dosis también puede ser de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial habitual del compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día.

Los diluyentes, transportadores, excipientes y estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los principios farmacéuticos activos también pueden incluirse en microcápsulas preparadas, p. ej., mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, p. ej., microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).  
15  
20  
25  
30

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida de los compuestos de Fórmula I. Como ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de Fórmula I, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Como ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o alcohol polivinílico), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como los del LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico.  
35

Las formulaciones incluyen las que son adecuadas para las vías de administración detalladas en el presente documento. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia de la farmacia. Las técnicas y formulaciones en general se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Dichos métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el transportador que constituye uno o más principios auxiliares. En general, las formulaciones se preparan mezclando de forma uniforme y estrecha el principio activo con transportadores líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto.  
40  
45

Las formulaciones de un compuesto de Fórmula I, adecuadas para administración oral, pueden presentarse como unidades distintas tales como píldoras, cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada del compuesto de la Fórmula I.  
50

Los comprimidos prensados pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida, tal como polvo o granulados, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y opcionalmente están formulados para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo.  
55

Los comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, p. ej., cápsulas de gelatina, jarabes o elixires pueden prepararse para su uso oral. Las formulaciones de los compuestos de Fórmula I, destinadas a uso oral, pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes, incluyendo agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, para proporcionar una preparación agradable al paladar. Son aceptables los comprimidos que contienen el principio activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables  
60  
65

- que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, p. ej., diluyentes inertes, tal como carbonato de calcio o de sodio, lactosa, fosfato de calcio o de sodio; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar
- 5 recubiertos o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas, incluyendo microencapsulación, para retrasar la disgregación y la adsorción en el tubo gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.
- 10 Para el tratamiento del ojo o de otros tejidos externos, p. ej., la boca y la piel, las formulaciones pueden aplicarse como una pomada o crema tópica que contenga el/los principio(s) activo(s) en una cantidad de, p. ej., 0,075 a 20 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los principios activos pueden emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, los principios activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua.
- 15 Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400), y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir, a ser posible, un compuesto que potencie la absorción o la penetración del principio activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos
- 20 de tales potenciadores de la penetración cutánea incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.
- La fase oleaginoso de las emulsiones de la presente divulgación puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender simplemente un emulsionante, ésta comprende a ser posible una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite, o tanto con una grasa
- 25 como con un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. En conjunto, el uno o más emulsionantes, con o sin uno o más estabilizantes forman lo que se denomina cera emulsionante y la cera, junto con el aceite y la grasa forman la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase oleaginoso dispersada de las formulaciones de crema. Como emulsionantes y estabilizadores de emulsión adecuados para su uso en la
- 30 formulación de la divulgación se incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.
- Las suspensiones acuosas de Fórmula I contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como
- 35 carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga, y agentes de dispersión o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (p. ej., lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (p. ej., estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (p. ej., heptadecaetilenoacetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de
- 40 un ácido graso y anhídrido de hexitol (p. ej., monooleato de sorbitán polioxietileno). Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes tal como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tal como sacarosa o sacarina.
- La composición farmacéutica de los compuestos de Fórmula I puede estar en forma de una preparación inyectable
- 45 estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butanodiol preparada como polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se
- 50 encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, como disolvente o medio de suspensión pueden emplearse de manera convencional aceites no volátiles estériles. Para este fin puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluidos monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables pueden usarse asimismo ácidos grasos, tal como ácido oleico.
- 55 La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material transportador para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del hospedador tratado y del modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación de liberación temporal prevista para la administración oral a seres humanos, puede contener aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material transportador, que puede variar de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 95 % de las composiciones totales
- 60 (peso:peso). La composición farmacéutica puede prepararse para proporcionar cantidades fácilmente medibles para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa prevista para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de solución, para que se pueda producir la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.
- 65 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación

sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

5 Las formulaciones adecuadas para administración tópica también incluyen gotas oculares, en donde el principio activo se disuelve o suspende en un transportador adecuado, en especial un disolvente acuoso para el principio activo. Preferentemente, el principio activo está presente en dichas formulaciones a una concentración del 0,5 al 20 % p/p, aproximadamente del 0,5 al 10 % p/p, o aproximadamente al 1,5 % p/p.

10 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un transportador líquido adecuado.

15 Las formulaciones adecuadas para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, p.ej., manteca de cacao o un salicilato.

20 Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, p. ej., en el intervalo de 0,1 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500 micrómetros en incrementos de micrómetros tales como 0,5, 1,30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.) que se administran por inhalación rápida a través de las fosas nasales o mediante inhalación a través de la boca, de forma que alcancen los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol o en polvo seco pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos convencionales y pueden suministrarse con otros agentes terapéuticos, tales como los compuestos utilizados hasta ahora en el tratamiento o la profilaxis de los trastornos que se describen a continuación.

25 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contengan, además del principio activo, los transportadores conocidos en la técnica como apropiados.

30 Las formulaciones pueden envasarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, p. ej., ampollas y viales sellados, y pueden conservarse en un estado criodesecado (liofilizado) que solo requiere la adición del transportador líquido estéril, p. ej., agua, para inyección inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, como se ha citado anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

40 La divulgación describe además composiciones veterinarias que comprenden al menos un principio activo, como se ha definido anteriormente, junto con un transportador veterinario para ello. Los transportadores veterinarios son materiales útiles para administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que, de otro modo, son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias pueden administrarse por vía parenteral, oral o mediante cualquier otra vía deseada.

#### 45 **Combiterapia**

50 Los compuestos de Fórmula I se pueden emplear solos o combinados con otros agentes terapéuticos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento, tal como un trastorno hiperproliferativo (p. ej., cáncer). En determinados aspectos de la divulgación, un compuesto de Fórmula I se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o para uso en una pauta de dosificación como combiterapia, con un segundo compuesto que tiene propiedades antihiperproliferativas o que es útil para tratar un trastorno hiperproliferativo (p. ej., cáncer). El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o pauta de dosificación tiene, preferentemente, actividades complementarias a las del compuesto de Fórmula I de manera que no se perjudiquen mutuamente. Dichos compuestos están adecuadamente presentes junto con cantidades que son eficaces para el propósito pretendido. En un aspecto, una composición de la presente divulgación comprende un compuesto de Fórmula I, junto con un agente quimioterápico tal como se describe en el presente documento.

60 La combiterapia pretende administrarse como una pauta simultánea o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, utilizando formulaciones distintas o una única formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde, preferentemente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen sus actividades biológicas de forma simultánea.

65 Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las utilizadas actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente recientemente identificado y de otros agentes o tratamientos quimioterápicos.

La combiterapia puede proporcionar "sinergia" y mostrarse "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se usan juntos es superior a la suma de los efectos que son el resultado del uso de los compuestos por separado. Puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se formulan conjuntamente y se administran o suministran de manera simultánea en una formulación combinada de dosis unitaria; (2) se suministran de manera alterna o en paralelo como formulaciones distintas; o (3) mediante alguna otra pauta terapéutica. Cuando se suministran en terapia alterna, puede obtenerse un efecto sinérgico, cuando los compuestos se administran o se suministran secuencialmente, p. ej., mediante diferentes inyecciones en jeringas distintas, pastillas o cápsulas distintas o infusiones distintas. En general, durante la terapia alterna, una dosis eficaz de cada principio activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la combiterapia, se administran conjuntamente dosis eficaces de dos o más principios activos.

En un aspecto particular de la divulgación relacionada con la terapia contra el cáncer, un compuesto de Fórmula I o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o sal o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable, puede combinarse con otros agentes quimioterápicos, hormonales o de anticuerpos como los descritos en el presente documento, así como combinarse con terapia quirúrgica y radioterapia. Las combiterapias de acuerdo con la presente divulgación comprenden, por tanto, la administración de al menos un compuesto de Fórmula I, o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o sal o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable, y el uso de al menos otro método de tratamiento del cáncer. Las cantidades del compuesto (o compuestos) de Fórmula (I) y del otro agente (o agentes) farmacéuticamente activo(s), y los tiempos de administración relativos, se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

#### **Metabolitos de los compuestos de Fórmula I**

En la presente divulgación también se describen los productos metabólicos *in vivo* de Fórmula I descritos en el presente documento. Dichos productos pueden resultar, p. ej., de la condensación, oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la divulgación incluye metabolitos de compuestos de Fórmula I, incluyendo los compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente divulgación con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

Los productos de metabolitos normalmente se identifican preparando un isótopo radiomarcado (p. ej.,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ) de un compuesto de la divulgación, administrándolo por vía parenteral a una dosis detectable (p. ej., superior a aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal, tal como una rata, ratón, cobaya, mono o ser humano, dejando un tiempo suficiente para que produzca el metabolismo (por lo general de aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan con facilidad, ya que están marcados (otros se aíslan usando anticuerpos capaces de unirse a epítopos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras del metabolito se determinan de forma convencional, p. ej., mediante análisis MS, LC/MS o NMR. En general, el análisis de los metabolitos se realiza de la misma forma que en los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de metabolitos, siempre que no se encuentren de otra forma *in vivo*, puede ser útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de la divulgación.

#### **Artículos de Fabricación/kits**

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades y los trastornos descritos anteriormente. El kit comprende un recipiente que comprende un compuesto de Fórmula I. El kit puede comprender además una etiqueta o un prospecto en el recipiente o asociado a éste. El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos. Los recipientes adecuados incluyen, p. ej., frascos, viales, jeringas, envases alveolados, etc. El recipiente puede formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener un compuesto de Fórmula I o una formulación del mismo que sea eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso esterilizado (p. ej., el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un compuesto de Fórmula I. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, la etiqueta o el prospecto puede indicar que el paciente a tratar padece un trastorno tal como un trastorno hiperproliferativo. En un aspecto, la etiqueta o el prospecto indica que la composición que comprende un compuesto de Fórmula I puede usarse para tratar un trastorno resultante de un crecimiento celular anómalo. La etiqueta o el prospecto también pueden indicar que la composición puede usarse para tratar otros trastornos. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

El kit puede comprender además indicaciones para la administración del compuesto de Fórmula I y, en caso de estar presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto de Fórmula I y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente que lo necesite.

En otro aspecto, los kits son adecuados para el suministro de formas orales sólidas de un compuesto de Fórmula I, tales como comprimidos o cápsulas. Dicho kit incluye preferentemente diversas dosificaciones unitarias. Dichos kits pueden incluir una ficha con las dosificaciones orientadas en el orden de su uso previsto. Un ejemplo de dicho kit es un "envase alveolado". Los envases alveolados son muy conocidos en la industria del envasado y se utilizan mucho en el envasado de formas farmacéuticas unitarias. Si se desea, puede proporcionarse un recordatorio, p. ej., en forma de números, letras u otros marcadores o con introducir un calendario, que indique los días de la pauta de tratamiento en los que pueden administrarse las dosis.

De acuerdo con un aspecto, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un compuesto de Fórmula I contenido en el mismo; y opcionalmente (b) un segundo recipiente con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en donde la segunda formulación farmacéutica comprende un segundo compuesto con actividad antihiperproliferativa. Como alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFII, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

En otros aspectos determinados en donde el kit comprende una composición de Fórmula I y un segundo agente terapéutico, el kit puede comprender un recipiente que contenga las composiciones por separado, tal como un frasco dividido o un envase de aluminio dividido, sin embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas en un único envase no dividido. Normalmente, el kit comprende indicaciones para administrar los componentes por separado. La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en formas farmacéuticas diferentes (p. ej., oral y parenteral), cuando se administran a diferentes intervalos de dosificación, o cuando el médico tratante desea ajustar los componentes individuales de la combinación.

En el presente documento se desvela un artículo de fabricación que comprende material de envasado que contiene una o más formas farmacéuticas que contienen un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, en donde el material de envasado tiene una etiqueta que indica que la forma farmacéutica puede usarse para un sujeto que tiene o se sospecha que tiene o está predispuesto a cualquiera de las enfermedades, trastornos y/o afecciones descritos o mencionados en el presente documento. Dichas formas farmacéuticas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, soluciones y suspensiones para formas y formulaciones de suministro parenteral y oral.

Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un kit que comprende (a) al menos un compuesto de GGCI, o una sal o cristal del mismo, y un transportador, excipiente y/o aditivo farmacéuticamente aceptable en una forma farmacéutica unitaria, y (b) medios para contener la forma unitaria. Dado que la presente divulgación tiene un aspecto que está relacionado con el tratamiento de las enfermedades/afecciones descritas en el presente documento con una combinación de principios activos, la divulgación se refiere además a la combinación de composiciones farmacéuticas por separado en forma de kit. Un kit puede contener una composición farmacéutica que comprenda el compuesto de GGCI, o una sal o cristal del mismo, como se proporciona en el presente documento, ya sea solo o junto con un segundo compuesto como se describe en el presente documento.

En otro aspecto específico de la divulgación, se proporciona un dosificador diseñado para dispensar las dosis diarias de una en una en el orden de su uso previsto. Preferentemente, el dosificador está equipado con un recordatorio, para facilitar aún más el cumplimiento de la pauta posológica. Un ejemplo de dicho recordatorio es un contador mecánico que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de dicho recordatorio es un recordatorio de microchip a pilas acoplado a una lectura de cristal líquido o una señal sonora de recordatorio que, por ejemplo, lea la fecha en que se tomó la última dosis diaria y/o le recuerde a uno cuándo debe tomarse la siguiente dosis.

## Agentes GGCI

Siguiendo los procedimientos y los esquemas de síntesis descritos en la Descripción Detallada de la invención y en los Ejemplos y utilizando los métodos y procedimientos de síntesis conocidos por los expertos en la materia, pueden prepararse las sales y composiciones de la presente divulgación.

Los presentes métodos también proporcionan determinados compuestos que tienen utilidad, por ejemplo, como intermedios para la síntesis de GGCI. Los intermedios pueden aislarse y purificarse y/o cristalizarse independientemente, incluso durante, y como parte de, los métodos de síntesis proporcionados en el presente documento. Los intermedios aislados y purificados y/o cristalizados también pueden conservarse para su uso posterior.

Las etapas y rutas de síntesis son eficaces para la preparación de una variedad de sales de GGCI.

5 Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos tanto alifáticos como aromáticos e incluyen, por ejemplo, ácidos monocarboxílicos alifáticos, ácidos dicarboxílicos alifáticos, ácidos tricarboxílicos alifáticos, ácidos monocarboxílicos aromáticos, ácidos dicarboxílicos aromáticos, ácido tricarboxílicos aromáticos y otros ácidos orgánicos conocidos por los expertos en la materia.

Los ácidos carboxílicos alifáticos pueden ser saturados o insaturados. Los ácidos carboxílicos alifáticos adecuados incluyen aquellos que tienen de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono.

10 Los ácidos monocarboxílicos alifáticos incluyen ácidos monocarboxílicos alifáticos saturados y ácidos monocarboxílicos alifáticos insaturados. Ejemplos de ácidos monocarboxílicos saturados incluyen ácido acético, ácido proprónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico y ácido caprílico. Ejemplos de ácidos monocarboxílicos alifáticos insaturados incluyen ácido acrílico, ácido propiólico, ácido metacrílico, ácido crotonico y ácido isocrotonico.

15 Los ácidos dicarboxílicos alifáticos incluyen ácidos dicarboxílicos alifáticos saturados y ácidos dicarboxílicos alifáticos insaturados. Ejemplos de ácidos dicarboxílicos alifáticos saturados incluyen ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico o ácido sebáico. Ejemplos de ácidos dicarboxílicos alifáticos insaturados incluyen ácido maleico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido itacónico y similares.

20 En determinados aspectos, se describe un GGCI cristalino y sus sales. Estos incluyen maleato cristalino de GGCI, fumarato de GGCI y succinato de GGCI. Los diferentes cristales de GGCI incluyen aquellos que comprenden las estructuras geométricas, estructuras de celda unitaria y coordenadas estructurales.

25 También se describen sales de GGCI de alta pureza, métodos para su preparación y formas farmacéuticas que incluyen sales de GGCI.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más excipientes, transportadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, adecuados para administración oral o parenteral.

35 El producto formado por los procesos descritos es sustancialmente puro, es decir, carece sustancialmente de cualquier otro compuesto. Preferentemente, contiene menos del 10 % de impurezas y, más preferentemente, menos de aproximadamente el 5 % de impurezas, e incluso más preferentemente, menos de aproximadamente el 1 % de impurezas. De manera preferente, el producto así formado también es sustancialmente puro, es decir, contiene menos del 10 % de impureza, más preferentemente menos del 5 % de impureza, y aún más preferentemente menos del 1 % de impureza. La presente divulgación también incluye una forma cristalina anhidra sustancialmente pura de disuccinato de GGCI. La expresión "sustancialmente pura" significa que una muestra de la forma cristalina anhidra relevante de disuccinato de GGCI contiene más del 90 % de una sola forma polimórfica, preferentemente más del 95 % de una sola forma polimórfica, y aún más preferentemente más del 99 % de una sola forma polimórfica.

40 Los métodos de síntesis descritos en el presente documento también se ilustran con referencia a las figuras, incluida la Figura 1 adjunta. La Figura 1 muestra un resumen de un esquema de reacción ilustrativo para la preparación de GGCI, que puede incluir una sal de GGCI.

#### 45 **Dosis**

Una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos del presente documento y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 g/kg. Otros intervalos de dosis terapéuticamente eficaces incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 950 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 85 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 700 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 9500 mg/kg, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 900 mg/kg, de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 850 mg/kg, de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 800 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 7500 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 7000 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 4000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 3000 mg/kg, de

aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 2500 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1500 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 750 mg/kg, de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 150 mg/kg a aproximadamente 350 mg/kg,

En determinados aspectos, los intervalos de dosis incluyen, por ejemplo, 1/10 de LD<sub>50</sub> (dosis letal media) basándose en datos de toxicidad, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 600 mg/kg, de aproximadamente 60 a aproximadamente 500 mg/kg, de aproximadamente 70 a aproximadamente 400 mg/kg, de aproximadamente 80 a aproximadamente 300 mg/kg, de aproximadamente 90 a aproximadamente 150 mg/kg, de aproximadamente 90 a aproximadamente 120 mg/kg, de aproximadamente 95 a aproximadamente 105 mg/kg y de aproximadamente 100 mg/kg.

Un nivel de dosis diaria de los compuestos del presente documento, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, puede ser de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 6 g por día, o hasta aproximadamente 60 g por día (en dosis únicas o divididas). Otros intervalos de dosis terapéuticamente eficaces incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 5,9 g, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 4,7 g, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 3,5 g, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 3 g, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 2,8 g, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 2,5 g, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 2,3 g, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2 g, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1,5 g, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1400 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1300 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1200 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1100 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 800, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 59 g, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 47 g, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 35 g, de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 30 g, de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 28 g, de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 25 g, de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 23 g, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 20 g, de aproximadamente 1000 mg a aproximadamente 15 g, de aproximadamente 2000 mg a aproximadamente 14000 mg, de aproximadamente 2000 mg a aproximadamente 13000 mg, de aproximadamente 2000 mg a aproximadamente 12000 mg, de aproximadamente 2000 mg a aproximadamente 11000 mg, de aproximadamente 2000 mg a aproximadamente 10000 mg, de aproximadamente 3000 mg a aproximadamente 9000 mg, de aproximadamente 3000 mg a aproximadamente 8000 mg, de aproximadamente 3000 mg a aproximadamente 7000 mg o de aproximadamente 3000 mg a aproximadamente 6000 mg por día.

Los compuestos descritos en el presente documento, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, también serán eficaces en dosis del orden de 1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500 e incluso 1/1000 de las descritas en el presente documento.

En algunos aspectos de la divulgación, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad eficaz para provocar una concentración plasmática de los compuestos proporcionados en el presente documento, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 20 mg/l, de aproximadamente 0,01 mg/l a aproximadamente 15 mg/l, de aproximadamente 0,1 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 9 mg/l, de aproximadamente 1 mg/l a aproximadamente 8 mg/l, de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 7 mg/l o de aproximadamente 3 mg/l a aproximadamente 6 mg/l.

Las dosis descritas en el presente documento, pueden ser para administración en una sola dosis o en dosis múltiples. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse una, dos, tres, cuatro o más veces al día, o una, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces por semana.

El médico determinará la dosis real que será más adecuada para cada paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente individual. Las dosis anteriores son ilustrativas del caso promedio; por supuesto, puede haber casos individuales en los que se justifiquen intervalos de dosis más altos o más bajos, y dichos intervalos están dentro del alcance de esta divulgación.

Por lo general, en los seres humanos, la administración i.p. de los compuestos de la divulgación es la vía preferida. Una pauta de dosificación oral preferida en el tratamiento del cáncer para un hombre normal es de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 6000 mg por día de compuesto cuando sea necesario. Las dosis preventivas son más bajas, por lo general de aproximadamente 1/10 a aproximadamente 1/20 de las cantidades anteriores, incluyendo de aproximadamente 20-40 mg a aproximadamente 40-600 mg por día.

Para uso veterinario, un compuesto proporcionado en el presente documento, o una sal veterinariamente aceptable del mismo, o un solvato veterinariamente aceptable de cualquier entidad, debe administrarse como una formulación adecuadamente aceptable.

Por tanto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable de cualquier entidad, junto con un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

Además proporciona una formulación veterinaria que comprende un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal veterinariamente aceptable del mismo, o un solvato veterinariamente aceptable de cualquier entidad, junto con un diluyente o transportador veterinariamente aceptable.

La divulgación también proporciona un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable de cualquier entidad, o una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los anteriores, para su uso como un medicamento para seres humanos.

Además, proporciona un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal veterinariamente aceptable del mismo, o un solvato veterinariamente aceptable de cualquier entidad, o una formulación veterinaria que contiene cualquiera de los anteriores, para uso como un medicamento para animales.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato farmacéuticamente aceptable de cualquier entidad, para uso como un medicamento en un método para el tratamiento curativo o profiláctico de una afección médica para la que está indicado un GGCI.

También proporciona un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento, o una sal veterinariamente aceptable del mismo, o un solvato veterinariamente aceptable de cualquier entidad, para uso como un medicamento para animales en un método para el tratamiento curativo o profiláctico de una afección médica para la cual está indicado un GGCI.

Así mismo, los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento son adecuados para su uso en métodos para tratar y/o prevenir, en su totalidad o en parte, varias enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades hiperproliferativas tal como el cáncer.

La divulgación también incluye composiciones farmacéuticas, incluyendo comprimidos y cápsulas y otras formas y formulaciones de suministro oral, que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto GGCI como se proporciona en el presente documento.

La divulgación incluye métodos para el uso de cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento en la fabricación de un medicamento. Dicho medicamento incluye, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, soluciones y suspensiones para formas y formulaciones de suministro parenteral y oral. Dichos medicamentos incluyen los que son para el tratamiento de un sujeto como se desvela en el presente documento.

Los compuestos de la divulgación, particularmente sales e hidratos de GGCI, por ejemplo, en la forma cristalina desvelada, también pueden prepararse con otro agente contra el cáncer.

Se contempla que las dosis de dichos compuestos, sales y/o solvatos de GGCI proporcionados en el presente documento se administren en una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para inhibir un cáncer, retrasar la progresión de un tumor y/o reducir la resistencia a múltiples fármacos en un sujeto.

La divulgación incluye una formulación que comprende un compuesto GGCI proporcionado en el presente documento en cantidades eficaces para reducir el transporte de glutatión en el cuerpo de un sujeto. Dichas formulaciones incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, soluciones y suspensiones para formas y formulaciones de suministro parenteral y oral.

#### **ASPECTOS GENERALES DEL CICLO DE GAMMA-GLUTAMILO**

El ciclo bioquímico de GGC existe en la mayoría de las células vivas. Permite la transferencia de aminoácidos, transferrina, hierro y otros residuos desde el exterior de una célula viva al citoplasma a través de la membrana celular. Algunos de estos aminoácidos son esenciales para la biosíntesis *de novo* de glutatión. Este es uno de los pocos mecanismos que permiten el transporte de aminoácidos en las células vivas, pero es el único mecanismo indispensable para la biosíntesis de glutatión y que no utiliza la insulina como cofactor para el mecanismo de transporte.

Dado que la tasa de multiplicación de las células cancerosas es sustancialmente mayor que la de las células de origen no canceroso, al interferir con este ciclo se puede suprimir el crecimiento y el mantenimiento de las células cancerosas.

Esto puede lograrse presentando un inhibidor competitivo como un "metabolito falso" o un análogo de un sustrato de una enzima del ciclo gamma-glutamilo. Haciendo esto, se puede introducir más daño en las células cancerosas que en las no cancerosas. Así mismo, se observó una mayor actividad de la enzima gamma-glutamil transpeptidasa en las células cancerosas. Para suprimir el ciclo gamma-glutamilo, se desarrollaron inhibidores GGCI, como los desvelados en el presente documento, que pueden competir con la 5-oxoprolina para unirse a la 5-oxoprolinasa y bloquear así el ciclo gamma-glutamilo. El bloqueo del GGC disminuye o interfiere con la entrada de aminoácidos a la célula, interfiriendo así con la división celular y la síntesis de glutatión. Dado que las células cancerosas requieren sustancialmente más aminoácidos debido a un tiempo de duplicación mucho más rápido, esto da como resultado un daño preferencial y/u óptimo a las células cancerosas.

La gamma-glutamyltransferasa (GGT) es una enzima clave implicada en el metabolismo del glutatión, cuya expresión a menudo aumenta significativamente en las neoplasias malignas humanas. En los últimos años, varios estudios se centraron en el posible papel de la GGT en la progresión tumoral, invasión y resistencia a los fármacos. Se ha señalado la implicación de una actividad prooxidante de la GGT, además de sus contribuciones tempranas reconocidas a las defensas antioxidantes celulares. Los prooxidantes derivados de GGT pueden modular importantes procesos y funciones de la célula sensibles al redox, con especial referencia a su equilibrio proliferativo/apoptótico, lo que tiene implicaciones obvias e importantes en la progresión tumoral y la resistencia a los fármacos. Además, la especificidad de la reacción enzimática llevada a cabo por la GGT sugiere que la GGT expresada en el tejido tumoral podría metabolizar (activar) selectivamente los profármacos adecuados. Por consiguiente, los compuestos de la divulgación pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como cáncer. Los compuestos pueden inhibir el crecimiento de tumores en mamíferos y pueden ser útiles para tratar pacientes humanos con cáncer.

Por lo tanto, la GGT desempeña un papel como marcador de diagnóstico/pronóstico, así como diana para tratamientos contra el cáncer.

La gamma-glutamyltransferasa (GGT) es una enzima implicada en el metabolismo del glutatión (gamma-glutamyl-cisteinil-glicina; GSH), y se expresa en una gran cantidad de tipos de células. La GGT cataliza la transferencia del residuo de glutamilo, ligado a través del ácido glutámico gamma-carboxílico a la cisteína, a moléculas aceptoras, incluidos péptidos, aminoácidos y agua.

En la superficie luminal de las células secretoras y absorbentes, incluidas las de los conductos biliares, canalículos biliares y túbulos proximales del riñón, y en células endoteliales de los capilares del sistema nervioso, existen altas actividades de GGT. Se ha detectado una expresión desregulada de GGT en varios tipos de tumores, y la GGT puede asociarse a mecanismos de resistencia a fármacos dependientes de GSH.

Al estar ubicada en la cara exterior de la membrana celular, la GGT cataliza la degradación del GSH extracelular, favoreciendo así la recuperación de los aminoácidos constituyentes para la posterior resíntesis intracelular del GSH. Como el GSH es el principal antioxidante soluble en agua dentro de la célula, la GGT es un componente importante del sistema de protección celular contra el estrés oxidativo. Por otra parte, otros compuestos fisiopatológicamente relevantes también son sustratos de la GGT, en particular todos los conjugados del GSH, incluyendo el leucotrieno C4, los aductos de xenobióticos de S-nitrosoglutaratión (GSNO) y GSH formados por la acción de las glutatión-S-transferasas.

Varios estudios demostraron que la GGT está regulada positivamente en diferentes tipos de células después de una breve exposición al estrés oxidativo. Se ha demostrado una conexión entre la expresión de la GGT y la activación de las rutas Ras-MAPK en células de cáncer de colon después de la irradiación gamma, así como la exposición al estrés oxidativo. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se han visto implicadas en el proceso de carcinogénesis y, al mismo tiempo, la regulación redox de muchos genes en respuesta a ROS/electrófilos parece modular la expresión de la GGT; esto podría explicar en conjunto el aumento de la expresión de GGT descrito en los tumores.

La distribución y concentración de GGT en tumores humanos presenta varias diferencias con respecto a lo que se observa en tejidos normales. Se han observado niveles elevados de GGT en el cáncer de ovario, colon, hígado, glioma astrocítico, sarcoma de tejidos blandos, melanoma, leucemias y pulmón. En estudios sobre células de melanoma *in vitro* e *in vivo*, se descubrió que una actividad elevada de GGT acompañaba a un mayor crecimiento invasivo, y se describió una correlación positiva entre la expresión de GGT y signos de pronóstico desfavorables en el cáncer de mama humano.

#### Funciones de la GGT en la célula cancerosa

Varios estudios han abordado las relaciones de la actividad de la GGT con el fenotipo maligno, en particular, la cuestión de si una mayor expresión de GGT desempeña por sí misma algún papel activo en la transformación neoplásica. La participación de la GGT en el reabastecimiento celular de GSH y el aumento de la resistencia a los fármacos prooxidantes observado en varias líneas celulares que expresan GGT, indicó la inclusión de GGT entre los componentes de los sistemas defensivos celulares. Por otra parte, diversos hallazgos recientes indican que, en condiciones particulares, el metabolismo del GSH por la GGT puede ejercer efectos prooxidantes, con efectos moduladores sobre varios procesos sensibles al redox.

El GSH se sintetiza en el interior de las células y se transporta en el medio extracelular a través de transportadores de la membrana plasmática, a lo largo de un gradiente de concentración (milimolar frente a micromolar). El metabolismo extracelular del GSH por la GGT, en sintonía con las dipeptidasas de la superficie celular, promueve la liberación y recuperación por parte de las células de los aminoácidos constituyentes, entre los que se encuentran el ácido glutámico y la cisteína esencial. En efecto, estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* demostraron que las células que sobreexpresan GGT pueden utilizar GSH extracelular como fuente de cisteína de manera más eficaz, lo que resulta ser una ventaja de crecimiento selectivo tanto en concentraciones fisiológicas como limitantes de cisteína. De hecho, se observó que una pequeña inhibición (2 h) de GGT podía reducir la cisteína intracelular en líneas celulares de carcinoma cervicouterino positivas a GGT. Por tanto, la acción favorecedora de la GGT en el crecimiento tumoral es doble, en el sentido de que actúa como una fuente de aminoácidos esenciales tanto para la síntesis de proteínas como para el mantenimiento de los niveles intracelulares de GSH (Figura 2).

Los niveles adecuados de GSH son la base de la resistencia celular contra varios compuestos electrófilos/alquilantes, y se ha informado que las células que sobreexpresan GGT son más resistentes al peróxido de hidrógeno y a quimioterapias tales como doxorrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. En las células de melanoma, el empobrecimiento de GSH y la inhibición de GGT aumentaron significativamente la citotoxicidad de las condiciones de estrés oxidativo.

La actividad de la GGT, al convertir el GSH poco reactivo en cisteinilglicina altamente reactiva, es capaz de desencadenar la formación de complejos cisplatino/tiol en el espacio extracelular, lo que da lugar a una menor acumulación celular de cisplatino, a la reducción de la platinación del ADN y a la reducción de la citotoxicidad.

Se ha informado que la GGT puede ejercer efectos prooxidantes a nivel de la superficie de la membrana y en el microambiente extracelular. Este fenómeno se explica por la alta reactividad de la cisteinilglicina, el producto de la GGT de la escisión del GSH. El pKa más bajo del tiol de cisteinilglicina le permite disociarse más rápidamente a pH fisiológico y reducir los cationes de metales de transición extracelulares (en particular  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) de manera más eficaz que la del propio GSH. De hecho, la reducción de hierro por GSH, podría estar limitada por las propiedades quelantes del grupo alfa-carboxilo del resto de glutamato, afectando a las interacciones estéricas y redox del grupo tiol de la cisteína. La eliminación de ácido glutámico catalizada por la GGT provoca una disminución del pKa del grupo tiol de la cisteína y la deja libre para interactuar con el hierro.

Además, la actividad de la GGT puede promover la liberación de hierro libre de la transferrina, promoviendo así la absorción de hierro por las células cancerosas. Este efecto puede desempeñar un papel adicional en el suministro de hierro a las células malignas, y el papel del hierro en la carcinogénesis está bien establecido.

También se ha demostrado recientemente que la actividad prooxidante de la GGT promueve el daño oxidativo del ADN dependiente del hierro en células de melanoma transfectadas con GGT, contribuyendo así posiblemente al daño del ADN y al aumento del riesgo de mutación en las células cancerosas.

Un papel importante en dicha regulación lo desempeñan los tioles de cisteína, que pueden sufrir diferentes modificaciones redox, reflejando posiblemente todas ellas un estado funcional distinto de una proteína. Se han descrito diversos fenómenos de este tipo en proteínas que participan en funciones celulares cruciales, tales como la proliferación celular, la apoptosis, la adhesión celular y la expresión genética, cuyas alteraciones son de primordial importancia en la progresión del cáncer y otras enfermedades. La actividad de la GGT puede promover la oxidación de grupos tiol en proteínas de la superficie celular, un proceso en el que interviene el peróxido de hidrógeno y la formación de disulfuros mixtos ('proteína S'-tiolación'). Los efectos moduladores de las reacciones prooxidantes mediadas por GGT podrían contribuir al fenotipo de resistencia de las células cancerosas que expresan GGT, regulando ambas rutas de transducción de señales implicadas en el equilibrio proliferación/apoptosis, así como induciendo adaptaciones protectoras en el conjunto de antioxidantes intracelulares.

Como se ha indicado anteriormente, las adaptaciones antioxidantes asociadas a la expresión de GGT son la base de una mayor tolerancia celular contra el estrés oxidativo, que en sí mismo es un factor de resistencia a los efectos de los fármacos prooxidantes. Sin embargo, la asociación de más agentes en terapia puede superar dicha resistencia; en un artículo reciente, por ejemplo, la combinación de trióxido de arsénico con concentraciones subtóxicas de ácido ascórbico produjo una sensibilización a la muerte celular apoptótica de células de melanoma transfectadas con GGT/resistentes al trióxido de arsénico.

La expresión y actividad de la GGT en la fisiopatología de procesos celulares implican al óxido nítrico (NO) y a compuestos relacionados, al GSNO en primer lugar. Los tratamientos de células cancerosas humanas con NO y miméticos de NO pueden restaurar eficazmente la sensibilidad de las poblaciones de células resistentes a los efectos citotóxicos de los quimioterápicos. Por tanto, el NO actúa como agente quimiosensibilizante. La GGT metaboliza selectivamente GSNO, favoreciendo así la liberación de su carga de NO.

#### Métodos de administración de GGCI

La presente divulgación se basa en un sorprendente, e inesperado, descubrimiento de que los agentes GGCI tienen

la capacidad de modular el transporte de aminoácidos actuando selectivamente como análogos de 5-oxoprolina y modular el ciclo de gamma-glutamilo.

Además, los aspectos de la presente divulgación se basan en el sorprendente descubrimiento de que los GGCI tienen la capacidad de tratar, prevenir y/o reducir el glutatión en las células cancerosas.

La presente divulgación proporciona GGCI para su uso en métodos de tratamiento mediante la administración a un sujeto de una o más dosis eficaces de GGCI durante un período de tiempo para lograr el efecto terapéutico deseado. El sujeto es, preferentemente, un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es más preferentemente un ser humano.

Se conocen varios sistemas de suministro, y pueden usarse para administrar GGCI de acuerdo con la divulgación, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, la vía tópica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y las vías orales. Para el tratamiento de determinados cánceres, el suministro tópico, subcutáneo, intradérmico y sistémico puede ser particularmente eficaz.

El GGCI puede administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas que comprenden GGCI en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. También puede emplearse la administración pulmonar, p. ej., usando un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente aerosolizante. Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas que comprenden GGCI localmente en la zona que necesite tratamiento; esto puede realizarse, por ejemplo, y no de forma excluyente, mediante aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas o fibras de Silastic™.

Otros modos más de administración de GGCI implican el suministro en un sistema de liberación controlada. En determinados aspectos, puede utilizarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88:507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). Adicionalmente, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres, Boca Ratón, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, N.Y. (1984); Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983; véase también Levy *et al.*, Science 228:190 (1985); During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71:105 (1989)) o puede colocarse un sistema de liberación controlada en proximidad con la diana terapéutica, es decir, el cerebro, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). En la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)), se mencionan otros sistemas de liberación controlada.

### Formas y dosis de GGCI

Como se utiliza en el presente documento, para el tratamiento del cáncer, son particularmente eficaces la formulación liofilizada y la formulación líquida adecuada para inyección. Las formas farmacéuticas adecuadas de GGCI para su uso en aspectos de la presente divulgación abarcan transportadores fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables que son intrínsecamente no tóxicos y no terapéuticos. Como ejemplos de dichos transportadores se incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, seroproteínas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tamponantes, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, P6N (Neumedicines, Pasadena, Ca.) y PEG. Los transportadores para formas tópicas o basadas en gel de los polipéptidos de GGCI incluyen polisacáridos, tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, PEG y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan adecuadamente formas de depósito convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, esparadrapos, formas de inhalación, pulverizaciones nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida.

Como ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Como ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) como describen Langer *et al.*, citados anteriormente y Langer, citado anteriormente, o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, citados anteriormente), copolímeros no

degradables de etileno-acetato de vinilo (Langer *et al.*, citados anteriormente), degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como los del Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los polipéptidos de GGCI encapsulados permanecen en el organismo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse, como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C., dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias teóricas para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

En el caso de administraciones durante varios días o más, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Para su conservación, las formulaciones terapéuticas de GGCI se preparan mezclando el GGCI, que tenga un grado de pureza deseado, con transportadores, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980)), en forma de torta liofilizada o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween®, Pluronics™ o polietilenglicol (PEG).

El término "tampón", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un excipiente farmacéuticamente aceptable, que estabiliza el pH de una preparación farmacéutica. En la técnica se conocen bien tampones adecuados y pueden encontrarse en la bibliografía. Los tampones farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampones de histidina, tampones de citrato, tampones de succinato, tampones de acetato, tampones de fosfato, tampones de arginina, o mezclas de los mismos. Los tampones anteriormente mencionados se utilizan generalmente en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM y de aproximadamente 10-20 mM. El pH de la solución tamponada puede ser de al menos 4,0, al menos 4,5, al menos 5,0, al menos 5,5 o al menos 6,0. El pH de la solución tamponada puede ser inferior a 7,5, inferior a 7,0 o inferior a 6,5. El pH de la solución tamponada puede ser de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 con un ácido o una base conocidos en la técnica, p. ej., ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido cítrico, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. Como se utiliza en el presente documento al describir el pH, "aproximadamente" significa más o menos 0,2 unidades de pH.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tensioactivo" puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable que se utiliza para proteger las formulaciones de proteínas contra las tensiones mecánicas, como agitación y cizallamiento. Como ejemplos de tensioactivos farmacéuticamente aceptables se incluyen ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (Tween), alquil éteres de polioxietileno (Brij), éteres de alquilfenilpolioxietileno (Triton-X), copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer, Pluronic) y dodecilsulfato de sodio (SDS). Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán tales como polisorbato 20, (comercializado con la marca comercial Tween 20®) y polisorbato 80 (comercializado con la marca comercial Tween 80®). Los copolímeros de polietileno-polipropileno adecuados son los comercializados con los nombres Pluronic.® F68 o poloxámero 188®. Los alquil éteres de polioxietileno adecuados son los comercializados con la marca comercial Brij.®. Los ésteres de alquilfenilpolioxietileno adecuados se comercializan con el nombre comercial Triton-X. Cuando se utiliza polisorbato 20 (Tween 20®) y polisorbato 80 (Tween 80®), generalmente se utilizan en un intervalo de concentración de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,2 % y de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,1 % p/v (peso/volumen).

Como se utiliza en el presente documento, el término "estabilizador" puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, que protege al principio farmacéutico activo y/o a la formulación de la degradación química y/o física durante su fabricación, conservación y aplicación. Las rutas de degradación química y física de los productos farmacéuticos proteicos se revisan en Cleland *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 70(4):307-77 (1993); Wang, Int. J. Pharm., 75S(2): 129-88 (1999); Wang, Int. J. Pharm., 203(1-2): 1-60 (2000); y en Chi *et al.*, Pharm. Res., 20(9): 1325-36 (2003). Los estabilizadores incluyen, pero sin limitación, azúcares, aminoácidos, polioles, ciclodextrinas, p. ej., hidroxipropil-beta-ciclodextrina, sulfobutiletil-beta-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, polietilenglicoles, p. ej., EG 3000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, albúmina, seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina bovina (BSA), sales, p. ej., cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, quelantes, p. ej., EDTA como se define más adelante en el presente

documento. Como se mencionó anteriormente en el presente documento, los estabilizadores pueden estar presentes en la formulación en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mM, en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mM o en una cantidad de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM. En algunos aspectos, el GGCI ilustrativo puede disolverse en una formulación farmacéutica apropiada, donde es estable.

El GGCI también puede incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, en microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y en microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente.

Para su administración *in vivo* el CCGI que se va a utilizar debe esterilizarse. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración esterilizadas, antes o después de, la liofilización y reconstitución. El GGCI normalmente se conservará en forma liofilizada o en solución. Las composiciones terapéuticas de GGCI generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso esterilizado, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa, que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Cuando se aplica por vía tópica, el GGCI se combina adecuadamente con otros ingredientes, tales como transportadores y/o adyuvantes. No hay limitaciones sobre la naturaleza de dichos otros ingredientes, salvo que deben ser fisiológicamente aceptables y eficaces para su administración prevista, y que no pueden degradar la actividad de los principios activos de la composición. Como ejemplos de vehículos adecuados se incluyen pomadas, cremas, geles o suspensiones, con o sin, colágeno purificado. Las composiciones también pueden impregnarse en parches transdérmicos, esparadrapos y vendas, preferentemente en forma líquida o semilíquida.

Para obtener una formulación en gel, el GGCI formulado en una composición líquida puede mezclarse con una cantidad eficaz de un polisacárido o polímero sintético soluble en agua, tal como PEG, para formar un gel de la viscosidad adecuada para aplicarse por vía tópica. El polisacárido que puede usarse incluye, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como derivados de celulosa eterificados, incluyendo alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas y alquilhidroxialquilcelulosas, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxipropilcelulosa; almidón y almidón fraccionado; agar; ácido algínico y alginatos; goma arábiga; pululano; agarosa; carragenano; dextranos; dextrinas; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanos; glucógeno; glucanos; y biopolímeros sintéticos; así como gomas tales como goma xantana; goma guar; goma garrofín; goma arábiga; goma de tragacanto; y goma karaya; y derivados y mezclas de los mismos. El agente gelificante preferido en el presente documento es uno que sea inerte a los sistemas biológicos, no tóxico, fácil de preparar, no demasiado agudo ni viscoso, y no desestabilizará la molécula de GGCI que contiene.

Preferentemente, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificado, más preferentemente, uno que esté bien definido, purificado y en la lista de la USP (Farmacopea de Estados Unidos), p. ej., metilcelulosa y los derivados de hidroxialquilcelulosa, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. La más preferida en el presente documento es la metilcelulosa.

El polietilenglicol útil para gelificar es normalmente una mezcla de PEG de bajo y alto peso molecular para obtener la viscosidad adecuada. Por ejemplo, una mezcla de un PEG de peso molecular 400-600 con uno de peso molecular 1500 sería eficaz para esta finalidad, cuando se mezcla en la proporción adecuada para obtener una pasta.

La expresión "soluble en agua", aplicada a los polisacáridos y a los PEG, pretende incluir soluciones y dispersiones coloidales. En general, la solubilidad de los derivados de celulosa está determinada por el grado de sustitución de los grupos éter, y los derivados estabilizantes útiles en el presente documento deben tener una cantidad suficiente de dichos grupos éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa para hacer que los derivados sean solubles en agua. Generalmente es suficiente un grado de sustitución de éter de al menos 0,35 grupos éter por unidad de anhidroglucosa. Adicionalmente, los derivados de celulosa pueden estar en forma de sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de Li, Na, K o Cs.

Si se emplea metilcelulosa en el gel, preferentemente éste comprende aproximadamente 2-5 %, más preferentemente aproximadamente un 3 %, del gel y el GGCI está presente en una cantidad de aproximadamente 300-1000 mg por ml de gel.

Una cantidad eficaz de GGCI a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, de la vía de administración y del estado del paciente. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta ajuste la dosis y modifique la vía de administración, según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Normalmente, el facultativo administrará el GGCI hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. En determinados aspectos, la dosificación adecuada puede determinarse basándose en una cantidad de GGCI administrada por superficie de la región afectada.

"Cerca del momento de la administración del tratamiento" se refiere a la administración de GGCI en cualquier período

de tiempo razonable, ya sea antes y/o después de la administración del tratamiento, tal como aproximadamente un mes, aproximadamente tres semanas, aproximadamente dos semanas, aproximadamente una semana, varios días, aproximadamente 120 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 20 horas, varias horas, aproximadamente una hora o minutos. Cerca del momento de la administración del tratamiento también puede referirse a la administración simultánea, o casi simultánea, del tratamiento y del GGCI, es decir, en cuestión de minutos a un día.

"Quimioterapia" se refiere a cualquier terapia que incluya agentes naturales o sintéticos ahora conocidos o que se desarrollarán en las técnicas médicas. Como ejemplos de quimioterapia se incluyen los numerosos fármacos contra el cáncer que están disponibles actualmente. Sin embargo, la quimioterapia también incluye cualquier fármaco, natural o sintético, que esté destinado a tratar un cuadro clínico. En determinados aspectos de la divulgación, la quimioterapia puede incluir la administración de varios fármacos de vanguardia destinados a tratar el cuadro clínico. Como ejemplos se incluyen la combiterapia con docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo, para pacientes con carcinoma epidermoide de la cabeza localmente avanzado (Tsukuda, M. *et al.*, *Int J Clin Oncol.* junio de 2004; 9 (3): 161-6), y fludarabina y bendamustina en el linfoma indolente refractario y recidivante (Konigsmann M, *et al.*, *Leuk Lymphoma.* 2004; 45 (9): 1821-1827).

Como se utiliza en el presente documento, como ejemplos de fuentes de radiación ionizante terapéutica o accidental pueden incluirse, por ejemplo, fuentes de rayos alfa, beta, gamma, x y neutrones.

"Radioterapia" se refiere a cualquier terapia en la que se utilice cualquier forma de radiación para tratar el cuadro clínico. Los instrumentos que producen la radiación para la radioterapia son los que están actualmente disponibles o los que estarán disponibles en el futuro.

"Quimioprotección o radioprotección" se refiere a la protección frente a la toxicidad hematopoyética asociada a un tratamiento destinado a tratar el cuadro clínico, o a una disminución aparente de la misma.

"Tumores sólidos" generalmente se refiere a la presencia de cáncer en tejidos corporales distintos de la sangre, la médula ósea o el sistema linfático.

### Ejemplos

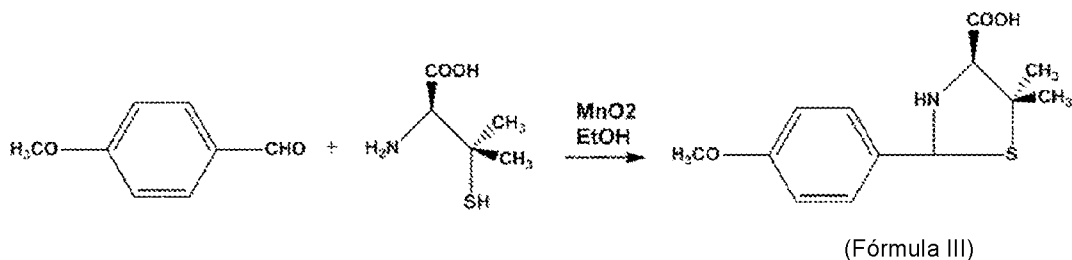
La invención se describe ahora en referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y la invención no se limita a ellos.

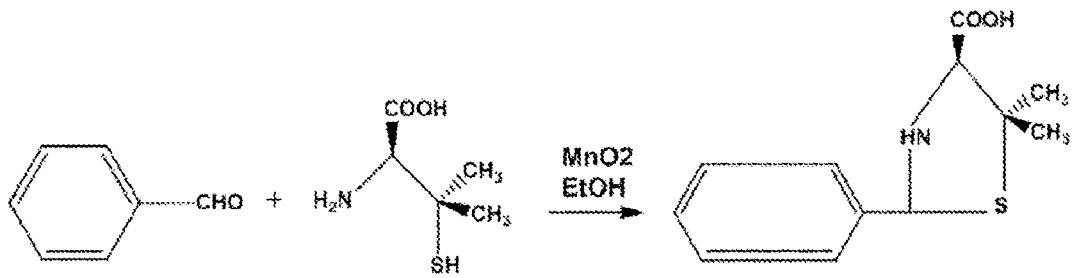
Antes de los experimentos descritos en el presente documento, no había ningún protocolo publicado que permitiera composiciones y métodos que comprendieran una preparación específica del análogo de 5-oxoprolina GGCI para tratar el cáncer y otras enfermedades proliferativas. Los aspectos y las realizaciones de la presente divulgación surgen del descubrimiento inesperado de que ciertas formulaciones de GGCI tienen una utilidad y una eficacia sorprendentes e inesperadas, utilidad y eficacia cuando se administran a un sujeto.

A modo de ejemplo, se desarrolló un método para preparar una formulación de GGCI radioprotectora terapéuticamente eficaz. Los compuestos de la divulgación se prepararon, como se indica a continuación, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Sin embargo, la invención no se limita a estos métodos; los compuestos también pueden prepararse como se describe para compuestos estructuralmente relacionados en la bibliografía.

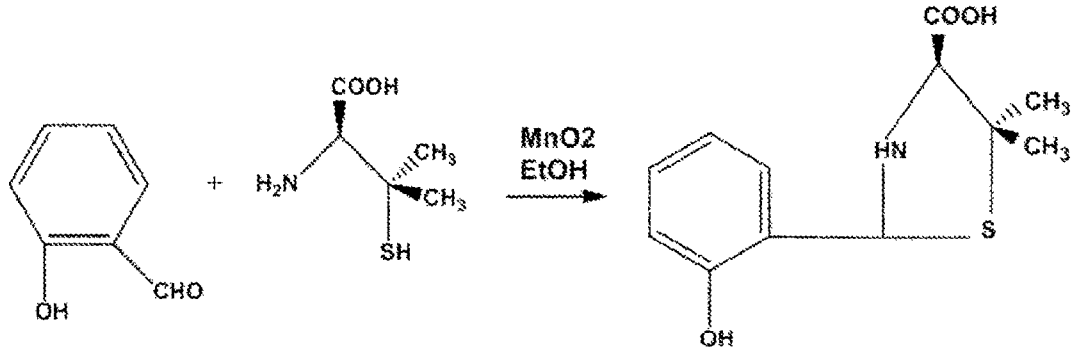
### EJEMPLO 1: SÍNTESIS DE INHIBIDORES DEL CICLO DE GAMMA GLUTAMILO (GGCI)

Los compuestos GGCI se sintetizaron de acuerdo con los siguientes esquemas de síntesis.





(Fórmula VI) -  
Únicamente como referencia



(Fórmula VII) -  
Únicamente como referencia

5

Los compuestos de fórmula I-VII pueden obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento y mostrados en la Figura 1. El compuesto de fórmula III, por ejemplo, ácido 2-imino-3-p-metoxibencil-4 sulfanil-5 dimetil 1-carboxílico, se preparó de la siguiente manera: Cantidades equimolares de (*p*-metoxibenzaldehído), dimetilcisteína y dióxido de manganeso se disolvieron en 2 litros de etanol al 70 %. La mezcla se preparó en un evaporador giratorio y la temperatura se elevó a 70 grados centígrados. Después de aproximadamente 1 hora, todos los ingredientes de la mezcla se disolvieron. Después, se redujo el volumen en un litro. Después, la solución se dejó enfriar en el matraz durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los cristales blancos precipitados de GCL se filtraron y después se secaron en una estufa de vacío. Se estimó un rendimiento de aproximadamente un 80 %.

**EJEMPLO 2: DEMOSTRACIÓN DE LA EFICACIA DEL GGCI EN EL TRATAMIENTO DE RATONES LAMPIÑOS INOCULADOS CON MELANOMA HUMANO (SÓLO REFERENCIA)**

20 Para examinar la tasa de supervivencia de ratones lampiños atímicos, inoculados con tumores por vía intravenosa, un grupo de los ratones inoculados se trató con BA-GGCI, y un segundo grupo de los ratones inoculados se trató con placebo, y se compararon los efectos del tratamiento con BA-GGCI y placebo.

25 Se examinaron dos subgrupos de ratones lampiños: un grupo de control y un grupo experimental. Los grupos incluían un total de veinte ratones lampiños atímicos (diez de control y diez experimentales), cada uno de ellos se irradió con 400 rads de radiación y se inoculó con células 624 de melanoma humano a 3,0 x 10.000.000 de células por ratón. El tratamiento del grupo experimental con BA-GGCI racémico comenzó a las 24 horas después de la inoculación. El tratamiento se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 100 mg/kg en 2 cm<sup>3</sup> de solución salina cada día, seis días a la semana. El grupo de control recibió placebo (2 cm<sup>3</sup> de solución salina i.p.), cada día, seis días a la semana.

35 Durante 120 días se realizó un seguimiento de los sujetos. Los resultados indican que, en el grupo de control, diez de cada diez sujetos murieron (sin supervivencia), mientras que, diez de cada diez sujetos del grupo tratado estaban vivos. Dos de los sujetos desarrollaron pequeños tumores después de suspender el tratamiento.

También se probaron SA-GGCI racémico y PMB-GGCI racémico, cada uno con resultados similares a los obtenidos con BA-GGCI racémico.

**EJEMPLO 3: DEMOSTRACIÓN DE LA EFICACIA DEL USO DEL GGCI EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN HUMANO UTILIZANDO EL MODELO DE RATÓN LAMPIÑO (ÚNICAMENTE COMO REFERENCIA)**

40 La eficacia de un GGCI ilustrativo en el tratamiento del cáncer de pulmón humano, el uso del modelo de ratón lampiño quedó demostrado en un estudio. Para examinar la supervivencia de ratones lampiños atímicos inoculados por vía

intravenosa con tumores, un grupo de ratones inoculados se trató con BA-GGCI racémico, y un segundo grupo de ratones inoculados se trató con placebo, y se compararon los efectos del tratamiento con BA-GGCI y con placebo.

5 Se examinaron dos subgrupos de ratones macho lampiños: Un grupo de control y un grupo experimental. Los grupos incluían veinte ratones lampiños atómicos (diez de control y diez experimentales), cada uno de ellos se irradió con 400 rads de radiación y se inoculó con CA CRL5891 de pulmón a  $3 \times 10.000.000$  de células por ratón. El tratamiento intervencionista fue idéntico al del primer estudio, como se ha indicado anteriormente.

10 Durante 120 días se realizó un seguimiento de los sujetos. En el grupo de control, ocho de cada diez sujetos murieron. Dos de los ratones supervivientes desarrollaron un tumor grande. En el grupo tratado, todos los ratones permanecieron vivos (ninguno con tumor detectable).

También se probaron SA-GGCI racémico y PMB-GGCI racémico, cada uno con resultados similares a los obtenidos con BA-GGCI racémico.

#### 15 **EJEMPLO 4: DEMOSTRACIÓN DE LA EFICACIA BASÁNDOSE EN DATOS HUMANOS (SÓLO REFERENCIA)**

20 Dos pacientes con cáncer de próstata avanzado se trataron en el marco de un programa de uso compasivo con un GGCI ilustrativo

Se administró BA-GGCI racémico a dos sujetos humanos que recibían terapia hormonal durante 12 y 14 meses respectivamente. Cuando los sujetos humanos no reaccionaron a la terapia hormonal y/o a cualquier otra terapia convencional, comenzó la administración del tratamiento con GGCI.

25 Al inicio del tratamiento con GGCI, ambos pacientes estaban postrados en cama con valores de PSA (*Prostate Specific Antigen*, Antígeno Prostático Específico) de 340 y 180 ng/ml respectivamente. Ambos sujetos presentaban metástasis óseas múltiples y dolores agonizantes. El protocolo de tratamiento con GGCI comprendió 600 mg de cápsula de GGCI 3 veces al día (formulada para seres humanos basándose en menos del 5 % de la LD<sub>50</sub> (dosis letal media) de toxicidad en ratones). Se observaron los siguientes resultados:

30 El primer paciente humano (sujeto n.º 1) presentó lo siguiente, en respuesta al tratamiento con el GGCI ilustrativo: El nivel de dolor del sujeto remitió a los 10 días de recibir el tratamiento. El sujeto se recuperó lo suficiente como para volver a sus actividades habituales en un mes. El valor de PSA del sujeto descendió de 340 a 18 unidades. El nivel de PSA siguió bajando hasta 5 unidades. La TC (tomografía computarizada) ósea mostró una remisión sustancial. El sujeto se sintió normal durante 28 meses antes de fallecer.

35 El siguiente paciente humano (sujeto n.º 2) presentó lo siguiente: Los dolores remitieron al cabo de 7 días. El sujeto volvió a sus actividades normales en 2-3 semanas. El PSA del sujeto bajó a 16 unidades. El sujeto seguía vivo, y sintiéndose bien, 36 meses después del inicio del tratamiento. Actualmente, el sujeto sigue recibiendo diariamente el tratamiento con GGCI.

40 El tratamiento con SA-GGCI racémico dio resultados similares a los obtenidos con el tratamiento con BA-GGCI, aunque los pacientes a los que se administró SA-GGCI se sintieron subjetivamente mejor que los pacientes a los que se administró BA-GGCI.

#### 45 **EJEMPLO 5: DEMOSTRACIÓN DE LA EFICACIA SORPRENDENTE E INESPERADA UTILIZANDO UN GGCI ILUSTRATIVO PREPARADO MEDIANTE SÍNTESIS DE LA FIGURA 1 UTILIZANDO L-PENICILAMINA**

50 Se compararon las actividades relativas de los compuestos enantioméricos de GGCI ilustrativos de la presente divulgación. Se prepararon conjugados de benzaldehído, salicilaldehído y para-metoxibenzaldehído, utilizando L- o D-penicilamina enantiomérica como segundo reactante. La eficacia de BA-GGCI racémico, SA-GGCI racémico y PMB-GGCI racémico (todos únicamente como referencia) en el tratamiento del cáncer de próstata humano se probó utilizando el modelo de ratón lampiño como en el Ejemplo 2, excepto que a los ratones lampiños se les inoculó por vía intravenosa una línea celular de tumor de próstata humano. Un grupo de los ratones inoculados se trató con BA-GGCI racémico y un grupo de control de los ratones inoculados se trató con placebo, y se compararon los efectos del tratamiento con GGCI y placebo. La respuesta al tratamiento se controló mediante cambios en el [PSA]. Los resultados fueron similares a los obtenidos con otros modelos de tumores humanos inoculados en ratones lampiños, donde el grupo de ratones tratados con el GGCI racémico tuvo una tasa de supervivencia significativamente mayor que la del grupo de control. También se probaron SA-GGCI o PMB-GGCI racémicos y dieron resultados similares.

60 Los enantiómeros L y D de BA-GGCI (ambos únicamente como referencia) se prepararon de acuerdo con el esquema sintético de la Figura 1 utilizando L-penicilamina. La preparación del GGCI utilizando el mismo esquema sintético con D-penicilamina como material de partida produjo un GGCI que no tuvo ningún efecto medible en el sujeto.

65 Cuando se probó la actividad de (L) - BA-GGCI en comparación con el racemato correspondiente, el compuesto (L) era al menos dos veces más activo que la mezcla racémica correspondiente. Se obtuvieron resultados similares para L-SA-GGCI (únicamente como referencia) y L-PMB-GGCI (invención) en comparación con su racemato

correspondiente.

#### EJEMPLO 6: ESTUDIO SE TOXICIDAD, DEMOSTRACIÓN DE SEGURIDAD Y EFICACIA

5 Se midieron los datos de LD<sub>50</sub> y se realizó un estudio de toxicidad del inhibidor del ciclo de gamma-glutamilo en ratones Balb C. Se administró un conjugado de L-penicilamina y metilglioxal (MGPA) (únicamente como referencia) a aproximadamente 4500 mg/kg ip, 5000 mg/kg oral. Se administró un conjugado de L-penicilamina y para-metoxifenilo (PMPA) (invención) a 5250 mg/kg ip, 5500 mg/kg oral; y se administró un conjugado de L-penicilamina y citronela (CNPA) (únicamente como referencia) a 3250 mg/kg ip, 4500 mg/kg oral.

10

#### EJEMPLO 7: DATOS DE TOXICIDAD EN RATONES (ÚNICAMENTE COMO REFERENCIA)

Resumen de la determinación de la LD<sub>50</sub> con un conjugado de L-penicilamina y salicilaldehído (L-SAPA), un conjugado de L-penicilamina y benzaldehído (L-BAPA), un conjugado de L-penicilamina y aldehído pirúvico (L-PAPA) y un conjugado de L-penicilamina y dialdehído glutárico (L-GAPA) en ratones B6C3F<sub>1</sub>.

15

| Compuesto GGCI | Pauta   | Vía  | LD <sub>50</sub> calculada en mg/kg/inj. | 1/10 de LD <sub>50</sub> |
|----------------|---------|------|--|--------------------------|
| L-SAPA         | Día 1   | ip   | >5000                                    | 500                      |
|                | Día 1   | oral | >5000                                    | 500                      |
|                | Día 1-5 | ip   | 3750                                     | 375                      |
|                | Día 1-5 | oral | >5000                                    | 500                      |
| L-BAPA         | Día 1   | ip   | 884                                      | 88,4                     |
|                | Día 1   | oral | 3553                                     | 355                      |
|                | Día 1-5 | ip   | 884                                      | 88,4                     |
|                | Día 1-5 | oral | 2158                                     | 216                      |
| L-PAPA         | Día 1   | ip   | >5000                                    | 500                      |
|                | Día 1   | oral | >5000                                    | 500                      |
|                | Día 1-5 | ip   | 2771                                     | 277                      |
|                | Día 1-5 | oral | >5000                                    | 500                      |
| L-GAPA         | Día 1   | ip   | 3749                                     | 375                      |
|                | Día 1   | oral | >5000                                    | 500                      |
|                | Día 1-5 | ip   | 1690                                     | 169                      |
|                | Día 1-5 | oral | >5000                                    | 500                      |

#### EJEMPLO 8: ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD Y LA DEMOSTRACIÓN DE LA SEGURIDAD EN MODELO ANIMAL (ÚNICAMENTE COMO REFERENCIA)

20

Muestra: Ácido L-tiazolidin-di-metil-carboxílico: "L-BAPA" en polvo se mezcló en el alimento (gránulos).

Los sujetos se examinaron con respecto a: toxicidad subaguda (4 semanas) por vía oral (a través de los alimentos) de L-BAPA en ratones.

25

Procedimiento experimental

Animales y cría:

30

Cuarenta hembras y cuarenta machos de ratón CD1, de 8-10 semanas de vida, se alojaron 5 por jaula (jaulas superiores con filtro Milipore), la mitad de ellos se utilizaron como controles, recibiendo una dieta normal para ratones (preparada en la planta de alimentos de centro de cría). La otra mitad era el grupo experimental y recibió la misma composición alimenticia en la que se mezclaron 0,6 g de ácido L-tiazolidin-di-metil-carboxílico por kg de alimento y se granuló en una granuladora más pequeña. Este alimento contenía una humedad del 12 %, en comparación con una humedad del 6 % de la dieta de control. Los animales se alimentaron a libre demanda (*ad libitum*). Todos los animales se pesaron semanalmente y se registró el consumo de alimento. Diariamente se comprobaron los posibles efectos clínicos o farmacéuticos. Después de 4 semanas, los ratones se llevaron a jaulas metabólicas durante 24 horas, se recogió su orina y antes de sacrificarlos se extrajeron muestras de sangre. La sangre se analizó y se prepararon frotis de médula ósea para recuento diferencial.

40

La razón para poner 40 ratones en un grupo era garantizar suficiente sangre y orina para el análisis, así que toda la bioquímica clínica de sangre y análisis de orina son de un grupo de 2 ratones cada uno. Todos los demás resultados son resultados individuales, realizados aleatoriamente en uno de cada 2 grupos de ratones.

45

Se examinaron histológicamente los siguientes órganos: glándula suprarrenal, cerebro, ojos, gónadas, corazón, intestino (colon, ciego, duodeno, íleon, recto), riñones, hígado, pulmones, ganglios linfáticos (mesentiales e inguinales), glándula mamaria, mediastino, esófago, páncreas, hipófisis, glándula salival, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, tiroides, vejiga urinaria y útero. Los órganos se fijaron en solución de Bouin y se

tiñeron con tinción verde claro de hematoxilina-eosina-ácido fosfomolibdico. Se registraron los pesos de las glándulas suprarrenales, las gónadas, los riñones, el hígado y la hipófisis y se calculó la relación peso del órgano/peso corporal.

Se realizaron los siguientes estudios de laboratorio:

5 Hematología: recuento de hemoglobina, hematocrito, eritrocitos, leucocitos.

Bioquímica clínica: fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico en sangre, suero glutámico, transaminasa pirúvica, glucemia.

10 Análisis de orina: aparición de sangre oculta, proteína Ph, bilirrubina, cetonas, glucosa, nitritos, urobilinógeno.

## 10 RESULTADOS

Durante el período de observación y dosificación de 4 semanas, los ratones se examinaron diariamente para detectar posibles síntomas clínicos, pero no se pudo observar ningún efecto clínico o de otro tipo.

15 Los resultados de todas las pruebas realizadas se resumen a continuación:

1. Peso corporal: Los animales finalizaron el experimento ganando peso y sin diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo de control.

20 2. Consumo de alimento: De las tablas se desprende que el grupo experimental consumió más alimentos experimentales que contenían L-BAPA que los alimentos normales del grupo de control, pero esto se debe a que la humedad del alimento experimental es mucho mayor.

25 3. Peso y proporción de órganos: Peso del órgano/corporal: No se observan diferencias significativas entre el grupo experimental y el de control. Todos los valores están dentro de los valores normales y no se observan diferencias significativas entre el grupo experimental y el de control.

30 4. Bioquímica clínica de sangre y análisis de orina: Todos los valores están dentro del intervalo normal y no se observan diferencias significativas entre los grupos de control y experimental.

(Las trazas de proteínas que se observaron en todos los ratones se deben muy probablemente a una ligera contaminación de la orina por los alimentos).

35 5. Análisis de glóbulos sanguíneos y recuento diferencial: Todos los valores están dentro del intervalo normal y no se observan diferencias significativas entre los grupos de control y experimental.

40 6. Mielograma: Todos los valores están dentro del intervalo normal y no se observan diferencias significativas entre los grupos de control y experimental.

## Histopatología

45 Se realizaron exámenes histológicos a 10 machos y 10 hembras de cada grupo. Se examinaron treinta y un órganos de cada animal. Las regiones cerebelosas y cerebrales del cerebro parecían normales, sin signos de reacción perivascular. Los ojos eran normales. En los testículos, la espermatogénesis se presentó con normalidad. En los ovarios, se observaron folículos de todos los estadios. El músculo cardíaco y los intestinos eran normales y la glándula mamaria "juvenil" y normal. También se observaron patrones normales en los ganglios linfáticos (inguinales, mesentéricos), mediastino, esófago, páncreas, próstata, útero, hipófisis, glándulas salivales, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, timo y vejiga urinaria. En los riñones, los glomérulos y la cápsula de Bowman están muy bien presentados. Los túbulos proximal, distal, contorneado y colector están intactos y no contienen materia. Las zonas peribronquiales y alveolares de los pulmones son nítidos. En el hígado, los espacios portales son nítidos, elementos epiteliales y sinusoidales de aspecto normal.

55 En dos ratones del grupo control y en un ratón del grupo experimental, se observan algunas vacuolas lipoides en el hipocampo (¿artefacto?). No se observaron otros cambios patológicos ni de otro tipo.

## CONCLUSIONES

60 Como demostración de seguridad, el ácido L-tiazolidin-di-metil-carboxílico ("L-BAPA") mezclado en el alimento (0,6 g por kg de alimento) y consumido a libre demanda durante 4 semanas no produce ningún cambio clínico o patológico en los ratones.

65 Las invenciones descritas de manera ilustrativa y reivindicadas en el presente documento pueden ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente desvelados en el presente documento, o descritos en el presente documento, como esenciales. Por tanto, por ejemplo, las expresiones "que comprende/n", "que incluye/n", "que contiene/n", "por ejemplo", etc., se interpretarán en sentido

amplio y sin limitaciones. La expresión "que incluye" significa "incluyendo pero sin limitación". La expresión, "por ejemplo", no se limita a, o por, los elementos que vienen después de la expresión. Todas las referencias a cosas "conocidas en la técnica" incluyen todas esas cosas y sus equivalentes y sustitutos, ya sean conocidos ahora o descubiertos en el futuro.

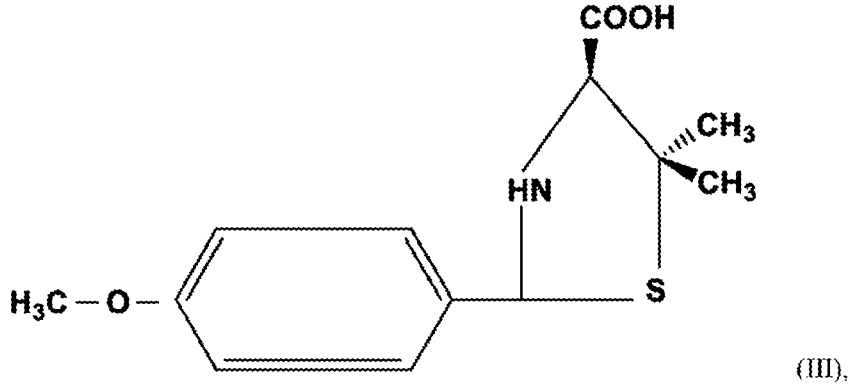
5 La expresión "que comprende" puede sustituirse por cualquiera de las expresiones transitorias "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

10 Los métodos y procesos descritos de manera ilustrativa pueden ponerse en práctica adecuadamente en diferentes órdenes de etapas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para tratar selectivamente células tumorales en un sujeto, comprendiendo la composición aplicar una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (III):

5



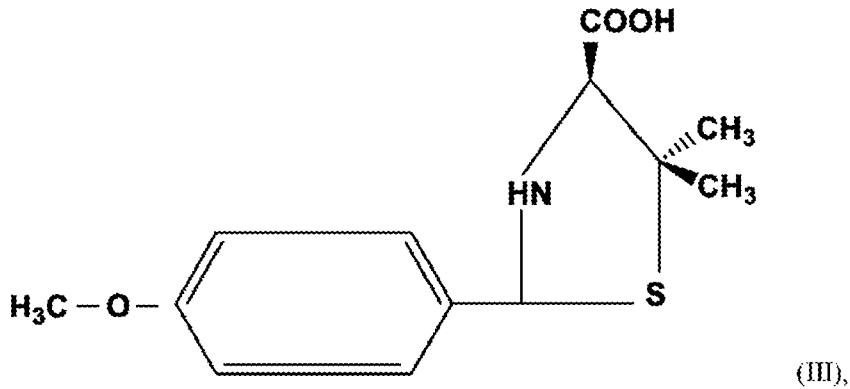
o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, mediante lo cual el compuesto se metaboliza y es eficaz para inhibir la síntesis de ácido glutámico en el ciclo de gamma-glutamilo.

10

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición inhibe la glutatión-S-transferasa.

3. Un compuesto representado por la fórmula (III):

15



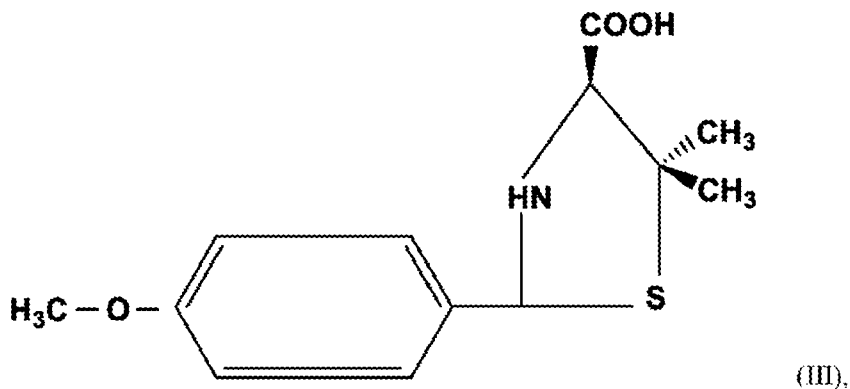
o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en cáncer, hiperplasia, neoplasia.

20

4. Un compuesto para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 3, mediante lo cual se inhibe o reduce la progresión del tumor, o se inhibe o reduce la resistencia a múltiples fármacos (MDR).

5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (III):

25



o una sal, un cristal o polimorfo del mismo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica mediante lo cual se inhibe la biosíntesis por el ciclo de gamma-glutamilo.

- 5 6. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, mediante lo cual se reduce el nivel de glutatión en las células cancerosas.
7. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, mediante lo cual se inhibe la etapa de reacción catalizada por la 5-oxo-prolinasa en el ciclo de gamma-glutamilo (GGC).
- 10 8. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el compuesto definido en la reivindicación 5 inhibe la glutatión-S-transferasa.
- 15 9. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la dosis eficaz del compuesto definido en la reivindicación 5 varía de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 6 g/kg.
- 20 10. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la dosis eficaz del compuesto definido en la reivindicación 5 se administra en una o más dosis de aproximadamente 3,5 g/kg a aproximadamente 4,0 g/kg para cada dosis.
- 25 11. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde:
- a) la una o más dosis eficaces del compuesto definido en la reivindicación 5 se administra(n) por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, o
  - b) la una o más dosis eficaces del compuesto definido en la reivindicación 5 se administra(n) por vía oral.
- 30 12. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde cada dosis del compuesto definido en la reivindicación 5, es de entre aproximadamente 1 ng/kg y menos de aproximadamente 10 mg/kg, y dicha dosis se administra mediante una vía de suministro seleccionada del grupo que consiste en la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, tópica, subcutánea, oral y epidural.
- 35 13. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el cáncer es un tumor sólido.
- 40 14. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tumor sólido comprende sarcomas, carcinomas o linfomas.
15. La composición farmacéutica para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de: pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario, vejiga, cabeza y cuello, tiroides, cerebro, piel y riñón.

Esquemas de síntesis de GGCI ilustrativos

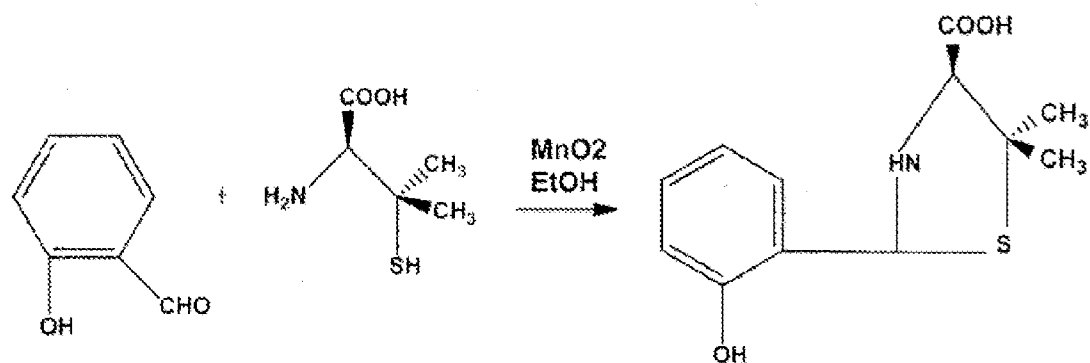
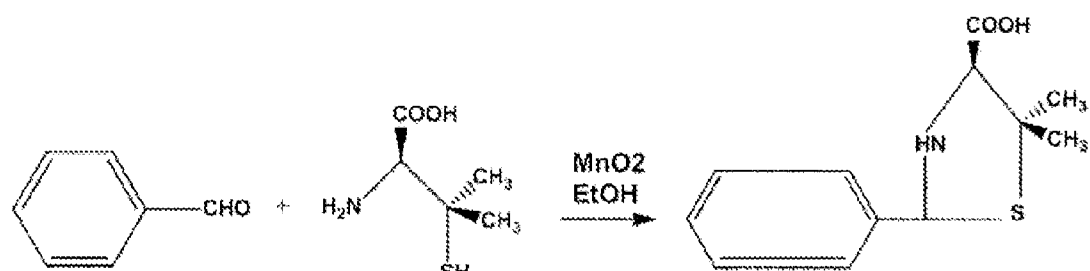
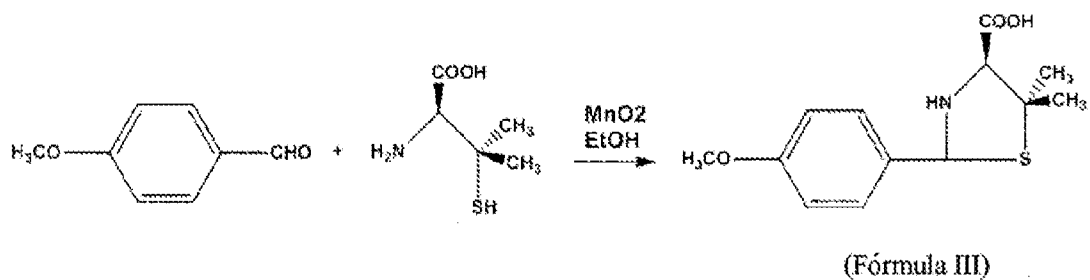


FIG. 1

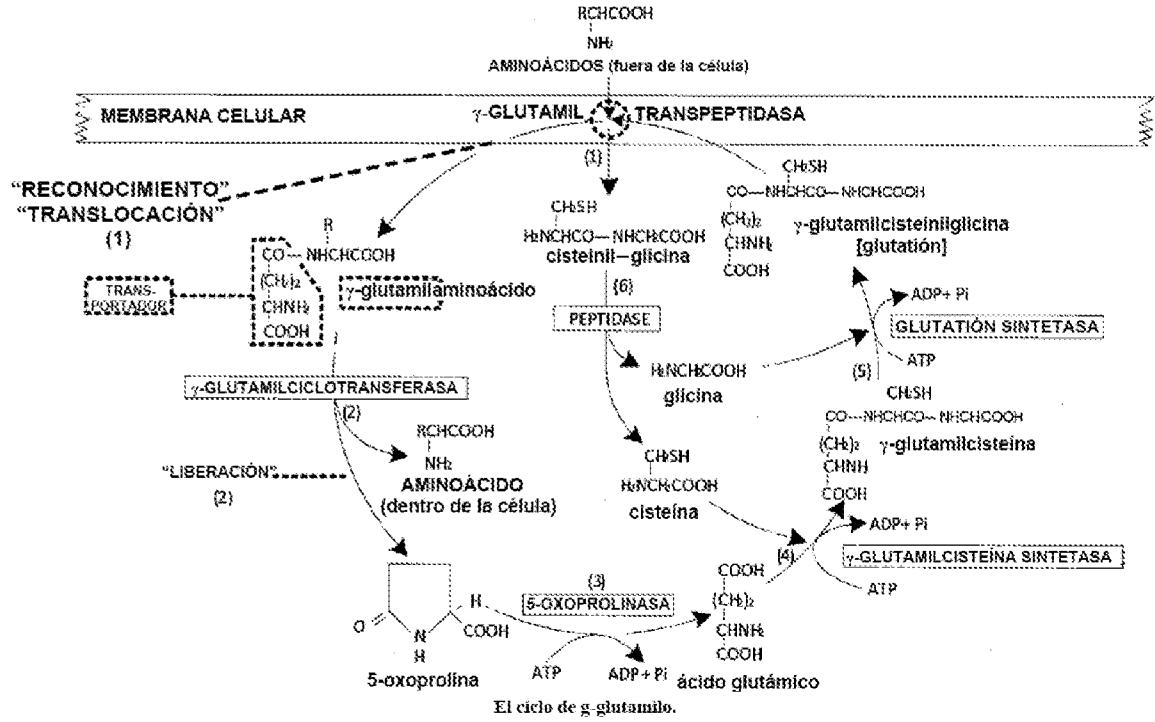


FIG. 2

Comparación entre ratones de control y tratados con GGCI:  
melanoma neoplásico humano

Grupo de control después de 120 días:  
10 ratones de 10 murieron.

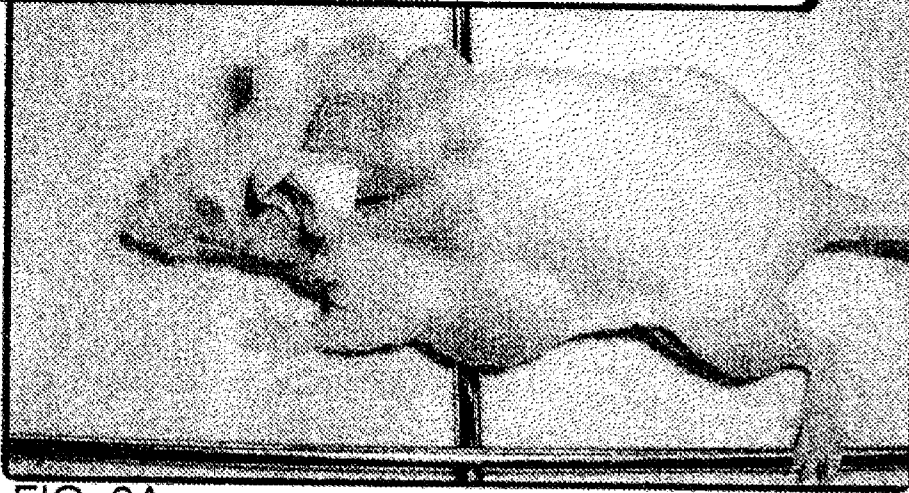


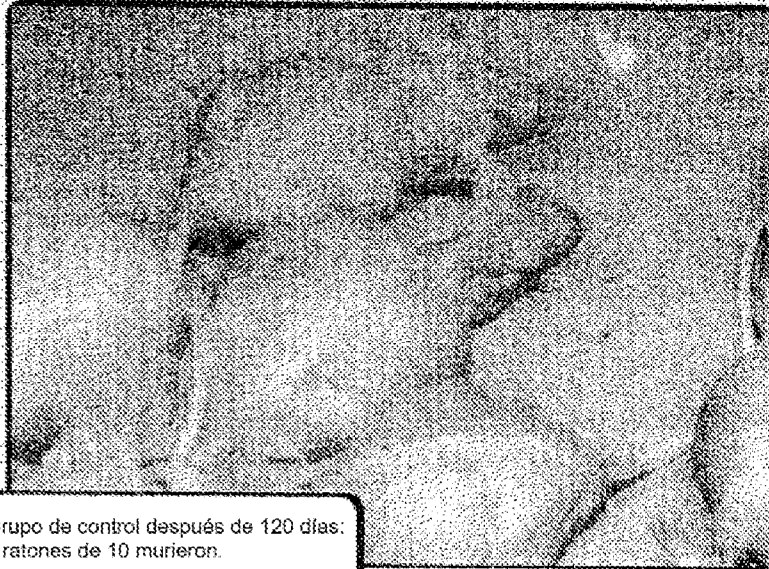
FIG. 3A



Grupo tratado después de 120 días:  
Todos los ratones sobrevivieron,  
después del tratamiento aparecieron  
2 con tumores pequeños.

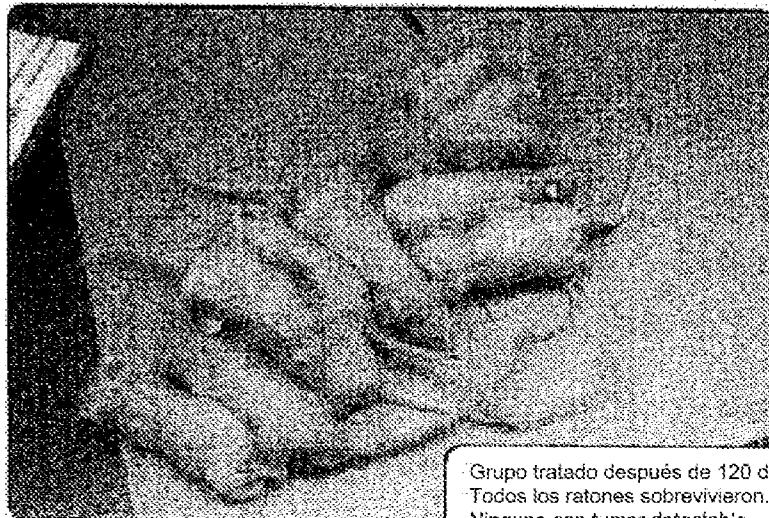
FIG. 3B

Comparación entre ratones de control y tratados con GGCI:  
cáncer de pulmón humano



Grupo de control después de 120 días:  
8 ratones de 10 murieron.

FIG. 4A



Grupo tratado después de 120 días:  
Todos los ratones sobrevivieron.  
Ninguno con tumor detectable

FIG. 4B