



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 687**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01)

**A61K 31/185** (2006.01)

**A61K 31/20** (2006.01)

**A61K 31/60** (2006.01)

**A61K 31/56** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07121971 .1**

96 Fecha de presentación : **04.11.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1920773**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54

Título: **Talidomida y dexametasona para el tratamiento de tumores.**

30

Prioridad: **05.11.1996 US 28708 P**  
**03.11.1997 US 963058**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.05.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.05.2011**

73

Titular/es:  
**The Children's Medical Center Corporation**  
**300 Longwood Avenue**  
**Boston, Massachusetts 02115, US**

72

Inventor/es: **D'Amato Robert J.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 687 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

La presente invención se refiere a talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor sólido o transportado por la sangre.

**Antecedentes de la Invención**

5 Como se utiliza en esta memoria, el término "angiogénesis" significa la generación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido u órgano. En condiciones fisiológicas normales, los humanos o animales sufren solamente angiogénesis en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, se observa angiogénesis normalmente en la curación de las heridas, el desarrollo fetal y embrionario y en la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta. El control de la angiogénesis es un sistema rigurosamente regulado de estimuladores e inhibidores angiogénicos.

10 Se ha descubierto que el control de la angiogénesis se altera en ciertos estados de enfermedad y, en muchos casos, el deterioro patológico asociado con la enfermedad está relacionado con angiogénesis incontrolada.

15 Se cree que tanto la angiogénesis controlada como la incontrolada transcurren de manera similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por células endoteliales y leucocitos. Las células endoteliales, que revisten interiormente el lumen de los vasos sanguíneos, sobresalen luego a través de la membrana basal. Los estimuladores angiogénicos inducen la migración de las células endoteliales a través de la membrana basal erosionada. Las células emigrantes forman un "brote" que parte del vaso sanguíneo originario, donde las células endoteliales sufren mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se fusionan unos con otros para formar bucles capilares creando el nuevo vaso sanguíneo. En el estado de enfermedad, la prevención de la angiogénesis podría prevenir el daño causado por la invasión del nuevo sistema microvascular.

20 Una angiogénesis persistente y no regulada se presenta en una multiplicidad de estados de enfermedad, metástasis de tumores y crecimiento anormal por células endoteliales, y soporta el deterioro patológico observado en estas condiciones. Los diversos estados patológicos creados debido a angiogénesis no regulada se han agrupado como enfermedades dependientes de angiogénesis o asociadas con angiogénesis. Las terapias dirigidas al control de los procesos angiogénicos podrían conducir a la anulación o mitigación de estas enfermedades.

25 Un ejemplo de una enfermedad mediada por angiogénesis es la enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo tales como la retina o la córnea. La misma es la causa más común de ceguera y está involucrada en aproximadamente veinte enfermedades oftálmicas. En la degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados están causados por un crecimiento interno de capilares coroides a través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación de tejido fibrovascular por debajo del epitelio pigmentario retiniano. El deterioro angiogénico está asociado también con retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, rechazo de injertos de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental. Otras enfermedades asociadas con neovascularización de la córnea incluyen, pero sin carácter limitante, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia de vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis de los miembros superiores, queratitis seca del pterigio, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por *Herpes simplex*, infecciones por *Herpes zóster*, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal, artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, traumatismos, sarcoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, queratotomía radial, penfigoide y rechazo de injertos de córnea.

30 Enfermedades asociadas con neovascularización retiniana/coroidal incluyen, pero sin carácter limitante, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva carotídea, uveítis/vitritis crónica, infecciones por micobacterias, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de la prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones causantes de retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular supuesta, enfermedad de Best, miopía, pozos ópticos, enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen, pero sin carácter limitante, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso con inclusión de todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa.

35 Otra enfermedad en la cual se cree que está implicada la angiogénesis es la artritis reumatoide. Los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies químicas de oxígeno reactivas que conducen a crecimiento del pannus y destrucción del cartilago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente al estado inflamado crónicamente de la artritis reumatoide, y favorecer el mantenimiento del mismo.

40 Los factores asociados con la angiogénesis pueden desempeñar también cierto papel en la osteoartritis. La activación de los condrocitos por factores relacionados con la angiogénesis contribuye a la destrucción de la articulación. En una etapa posterior, los factores angiogénicos podrían promover formación de hueso nuevo. La

intervención terapéutica que previene la destrucción del hueso podría detener el progreso de la enfermedad y proporcionar alivio para las personas que sufren artritis.

La inflamación crónica puede implicar también angiogénesis patológica. Estados de enfermedad tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn exhiben cambios histológicos con el crecimiento interno de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos inflamados. La bartonelosis, una infección bacteriana encontrada en América del Sur, puede dar como resultado un estado crónico que se caracteriza por proliferación de células vasculares endoteliales. Otro papel patológico asociado con la angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Se ha demostrado que las placas formadas dentro del lumen de los vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora de la angiogénesis.

Una de las enfermedades angiogénicas más frecuentes de la infancia es el hemangioma. En la mayoría de los casos, los tumores son benignos y regresan sin intervención. En casos más graves, los tumores progresan hasta grandes formas cavernosas e infiltrantes y crean complicaciones clínicas. Formas sistémicas de hemangiomas, las hemangiomatosis, tienen una tasa de mortalidad elevada. Existen hemangiomas resistentes a la terapia que no pueden ser tratados con los medios terapéuticos utilizados actualmente.

La angiogénesis es responsable también del deterioro encontrado en enfermedades hereditarias tales como la enfermedad de Osler-Weber-Rendu, o telangiectasia hemorrágica hereditaria. Esta es una enfermedad heredada caracterizada por pequeños angiomas, tumores de los vasos sanguíneos o linfáticos múltiples. Los angiomas se encuentran en la piel y las membranas mucosas, acompañados a menudo por epistaxis (hemorragias nasales) o hemorragia gastrointestinal y a veces con fístula arteriovenosa pulmonar o hepática.

La angiogénesis es prominente en la formación de tumores sólidos y metástasis. Se han encontrado factores angiogénicos asociados con varios tumores sólidos tales como rhabdomyosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y osteosarcoma. Un tumor no puede expandirse sin un suministro de sangre para proporcionar nutrientes y eliminar desechos celulares. Tumores en los cuales la angiogénesis es importante incluyen tumores sólidos, y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. La prevención de la angiogénesis podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante al animal debido a la presencia del tumor.

Debe indicarse que la angiogénesis ha sido asociada con tumores transportados por la sangre tales como las leucemias, cualquiera de diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las cuales tiene lugar proliferación incontrolada de glóbulos blancos, acompañada usualmente por anemia, coagulación deteriorada de la sangre, y engrosamiento de los ganglios linfáticos, el hígado, y el bazo. Se cree que la angiogénesis juega un papel en las anomalías de la médula ósea que dan lugar a tumores semejantes a las leucemias.

La angiogénesis es importante en dos etapas de la metástasis tumoral. La primera etapa en la cual es importante la estimulación de la angiogénesis es en la vascularización del tumor que permite que las células tumorales entren en el torrente sanguíneo y circulen por el cuerpo. Después que las células tumorales han abandonado el sitio primario, y se han depositado en el sitio secundario, sitio de la metástasis, tiene que producirse angiogénesis antes que el nuevo tumor pueda crecer y expandirse. Por tanto, la prevención de la angiogénesis podría conducir a la prevención de la metástasis de los tumores y refrenar posiblemente el crecimiento neoplásico en el sitio primario.

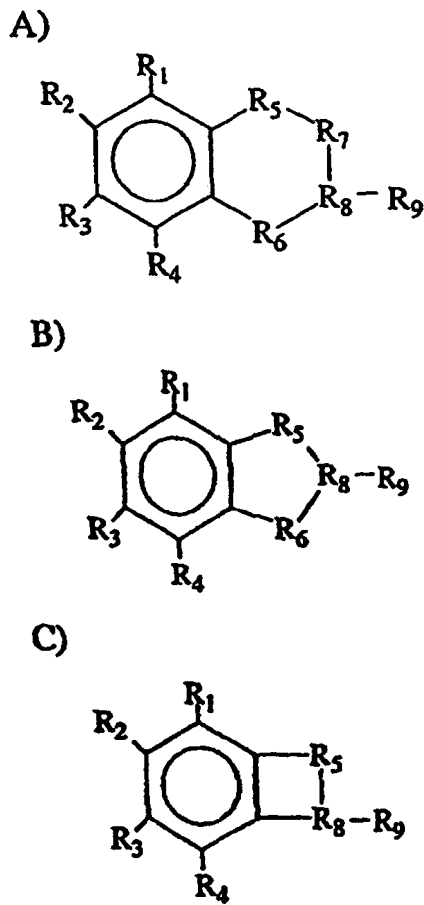
El conocimiento del papel de la angiogénesis en el mantenimiento y la metástasis de los tumores ha conducido a un indicador de pronóstico para el cáncer de mama. La cantidad de neovascularización encontrada en el tumor primario se determinó por conteo de la densidad de microvasos en el área de la neovascularización más intensa en el carcinoma invasivo de mama. Se encontró que un alto nivel de densidad de microvasos estaba correlacionado con la recurrencia del tumor. El control de la angiogénesis por medios terapéuticos podría conducir posiblemente a la cesación de la recurrencia de los tumores.

La angiogénesis está involucrada también en procesos fisiológicos normales tales como la reproducción y la curación de las heridas. La angiogénesis es un paso importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fertilización. La prevención de la angiogénesis podría utilizarse para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación o para prevenir la implantación por la blástula.

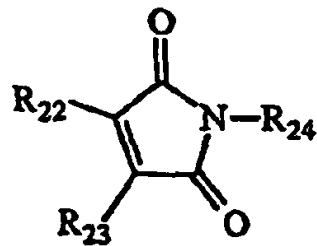
En la curación de las heridas, la reparación o fibroplasia excesiva puede ser un efecto secundario perjudicial de los procedimientos quirúrgicos y puede estar causada o exacerbada por la angiogénesis. Las adhesiones son una complicación frecuente en la cirugía y conducen a problemas tales como obstrucción del intestino delgado.

Se han utilizado varias clases de compuestos para prevenir la angiogénesis. Taylor et al. han utilizado protamina para inhibir la angiogénesis, véase Taylor et al. *Nature* 297:307 (1982). La toxicidad de la protamina limita su uso práctico como agente terapéutico. Folkman et al. han expuesto el uso de heparina y esteroides para controlar la angiogénesis. Véase Folkman et al., *Science* 221:719 (1983) y las Patentes U.S. Núms. 5.001.116 y 4.994.443. Se ha encontrado que esteroides, tales como tetrahidrocortisol, que carecen de actividad de glucocorticoides y corticoides minerales, son inhibidores angiogénicos.

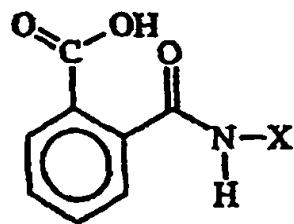
- 5 Otros factores encontrados endógenamente en animales, tales como una glicoproteína de 4 kDa del humor vítreo de los bovinos y un factor derivado de cartílago, han sido utilizados para inhibir la angiogénesis. Factores celulares tales como el interferón inhiben la angiogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que el interferón  $\alpha$  o el interferón  $\beta$  humano inhibe la angiogénesis inducida por tumores en la dermis del ratón estimulada por células neoplásicas humanas. El interferón  $\beta$  es también un inhibidor potente de la angiogénesis inducida por las células alogénicas del bazo. Véase Sidky et al., *Cancer Research* 47:5155-5161 (1987). Se ha consignado que el interferón  $\alpha$  humano recombinante (alfa/A) ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de la hemangiomas pulmonar, una enfermedad inducida por angiogénesis. Véase White et al., *New England J. Med.* 320:1197-1200 (1989).
- 10 Otros agentes que se han utilizado para inhibir la angiogénesis incluyen éteres de ácido ascórbico y compuestos afines. Véase Japanese Kokai Tokkyo Koho No. 58-131978. El polisacárido sulfatado DS 4152 exhibe también inhibición angiogénica. Véase Japanese Kokai Tokkyo Koho No. 63-119500. Un producto fúngico, la fumagillina, es un agente angiostático potente *in vitro*. El compuesto es tóxico *in vivo*, pero un derivado sintético, AGM 12470, se ha utilizado *in vivo* para tratar la artritis causada por el colágeno tipo II. La fumagillina y derivados de fumagillina sustituidos en O, se describen en las publicaciones EPO Núms. 0325199A2 y 0357061A1.
- 15 La Solicitud PCT No. WO 92/14455 concedida a Kaplan et al. está dirigida a un método para controlar la concentración anormal de TNF- $\alpha$  por administración de talidomida o derivados de talidomida a un paciente con concentraciones tóxicas de TNF- $\alpha$ .
- 20 Los compuestos anteriores son productos terapéuticos tópicos o inyectables. Por esta razón, existen inconvenientes en cuanto a su uso como inhibidor angiogénico general y carecen de la potencia adecuada. Por ejemplo, en la prevención de la curación excesiva de las heridas, la cirugía en los órganos corporales internos implica incisiones en diversas estructuras contenidas dentro de las cavidades del cuerpo. Estas heridas no están accesibles a aplicaciones locales de inhibidores angiogénicos. Los sistemas de suministro locales implican también vendajes frecuentes que son impracticables para las heridas internas, y aumentan el riesgo de infección o deterioro del tejido de granulación delicado para heridas superficiales.
- 25 Así pues, se precisan un método y una composición que sean capaces de inhibir la angiogénesis y que se administren fácilmente. Un método simple y eficaz de tratamiento sería por la ruta oral. Si pudiera administrarse un inhibidor angiogénico por la ruta oral, las numerosas clases de enfermedades expuestas anteriormente, y otras patologías dependientes de la angiogénesis, podrían tratarse fácilmente. La dosificación óptima podría distribuirse en una forma que el paciente pudiera auto-administrarse.
- 30 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento para tumores sólidos.
- Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y composición para el tratamiento de tumores transportados por la sangre tal como leucemia.
- Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y composición para el tratamiento de hemangioma.
- 35 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y composición para el tratamiento de sarcoma de Kaposi.
- Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método y composición que comprende talidomida y fármacos antiinflamatorios esteroidales para el tratamiento del cáncer.
- 40 Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención quedarán claros tras una revisión de la siguiente descripción detallada de las realizaciones descritas y de las reivindicaciones adjuntas.
- En un primer aspecto de la invención, se proporciona talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor sólido o transportado por la sangre, donde la talidomida y la dexametasona se administran a un humano o a un animal conjuntamente.
- 45 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor sólido o transportado por la sangre, donde la talidomida y la dexametasona se administran a un humano o a un animal secuencialmente.
- Las realizaciones de la invención en cualquiera de sus diversos aspectos son como se describe a continuación o como se define en las reivindicaciones subordinadas.
- 50 Las Figuras 1 a 3 son una lista de compuestos representativos en el género representado por las fórmulas generales siguientes:



5 La Figura 4 es una lista de compuestos representativos en el género representado por la fórmula general siguiente:



La Figura 5 es una lista de compuestos representativos en el género representado por la fórmula general siguiente:



10

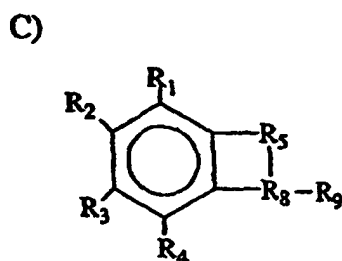
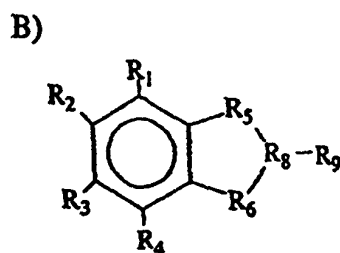
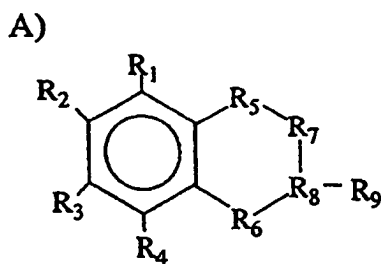
La Figura 6 muestra el efecto de talidomida y EM12 sobre la angiogénesis en un modelo de angiogénesis en la córnea de un conejo.

15 La Figura 7 muestra el efecto de la talidomida sobre el área de vascularización de la córnea en un modelo de angiogénesis en la córnea de un conejo.

La Figura 8 muestra el efecto de talidomida, sulindac, o una combinación de los dos sobre la inhibición del crecimiento del tumor del carcinoma V2 en conejos hembra Blancos de Nueva Zelanda.

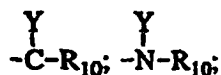
5 Se describen composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades que están mediadas por angiogénesis. El uso de talidomida o los metabolitos de talidomida se describen en esta memoria para inhibir la angiogénesis indeseable. También se describen compuestos que causan dismelia en el feto en desarrollo y tienen actividad antiangiogénica. También se describe un método para tratar la angiogénesis indeseable en un humano o animal, que comprende las etapas de administrar al humano o animal con la angiogénesis indeseable una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto teratógeno que es antiangiogénico.

10 Los compuestos que pueden utilizarse incluyen compuestos incluidos en las fórmulas generales siguientes. Ejemplos de compuestos que tienen propiedades antiangiogénicas que tienen una de las tres fórmulas (A), (B), o (C) siguientes:



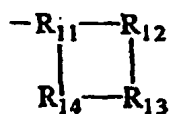
15 En las fórmulas anteriores A), B), y C), R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden seleccionarse de: -H; -OH; =O, alcanos, alquenos y alquinos de cadena lineal y ramificada; alcanos, alquenos y alquinos cíclicos; combinaciones de alcanos, alquenos y alquinos cíclicos y acíclicos; restos alcohol, aldehído, cetona, ácidos carboxílicos, ésteres, o éteres en combinación con restos acíclicos, cíclicos, o restos de combinación acíclico/cíclicos; aza; amino; -XO<sub>n</sub> u O-XO<sub>n</sub>, donde X = N y n = 2; X = S y n = 2 ó 3; o X = P y n = 1-3; y halógenos; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan cada uno independientemente de:

20

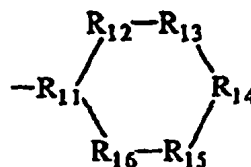


o -O-, donde Y es opcional y es igual que se ha definido arriba para R<sub>1</sub>; y R<sub>10</sub> es igual que se ha definido arriba para R<sub>1</sub>, o cuando Y está ausente, R<sub>10</sub> es =O; y R<sub>9</sub> es un resto que tiene la fórmula D), E), F), G) o H):

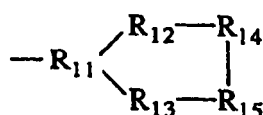
D)



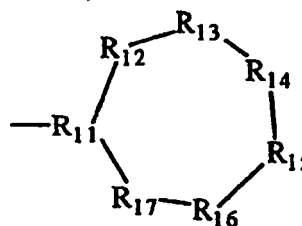
F)



E)

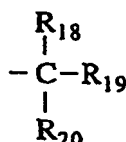


G)



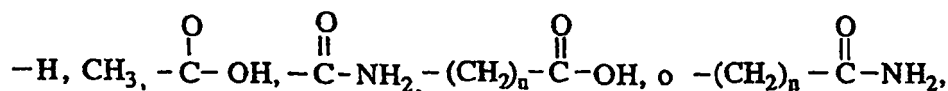
donde cada uno de R<sub>11</sub>-R<sub>17</sub> es independientemente igual que se ha definido arriba para R<sub>5</sub>;

H)



5

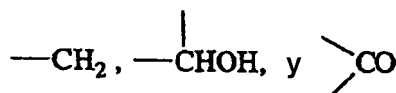
donde R<sub>18</sub>, R<sub>19</sub> y R<sub>20</sub> se seleccionan independientemente de



10 y n = 1 a 4.

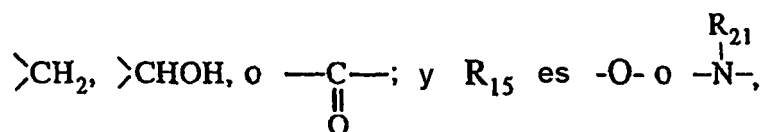
De acuerdo con ello, se describe la inhibición de la angiogénesis en un mamífero administrando una composición terapéutica que comprende uno de los compuestos descritos anteriormente en una dosis suficiente para inhibir la angiogénesis.

El compuesto puede tener la fórmula B), donde R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> se seleccionan del grupo constituido por:



15

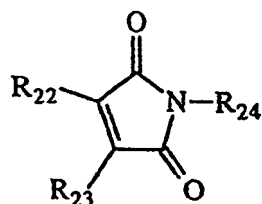
y R<sub>9</sub> tiene la fórmula F) o H); y R<sub>14</sub> y R<sub>16</sub> se seleccionan del grupo constituido por:



20

donde R<sub>21</sub> es -H, -CH<sub>3</sub>, o -OH. Compuestos específicos preferidos incluyen talidomida, sus precursores, metabolitos y análogos. Análogos particulares incluyen EM-12, ácido N-ftaloil-DL-glutámico (PGA) o anhídrido de N-ftaloil-DL-glutamina. Ejemplos de compuestos que son miembros de este género se enumeran en las Figuras 1 a 3.

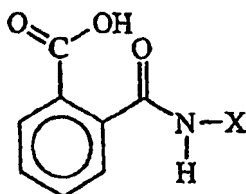
Compuestos de la fórmula siguiente que tienen propiedades antiangiogénicas:



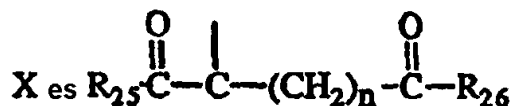
Donde R<sub>22</sub> y R<sub>23</sub> son (independientemente), -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; y R<sub>24</sub> es -H, -CH<sub>3</sub>, o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>.

5 También se describe la inhibición de la angiogénesis en un mamífero administrando un compuesto según la fórmula anterior en una dosificación suficiente para inhibir la angiogénesis. Ejemplos de compuestos específicos que son miembros de este género se presentan en la Figura 4.

Pueden utilizarse productos de hidrólisis de la talidomida inhibidores de la angiogénesis que tienen la fórmula general siguiente:

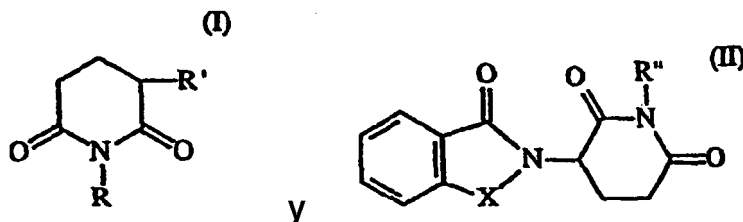


10 donde X es R<sub>6</sub> como se define arriba, o

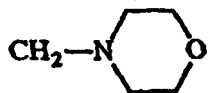


y R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> son, independientemente, -OH, -H, o NH<sub>2</sub>, y n = 1 a 4. Ejemplos de tales compuestos se muestran en la Figura 5.

Pueden utilizarse compuestos inhibidores de la angiogénesis que tienen la fórmula general siguiente:



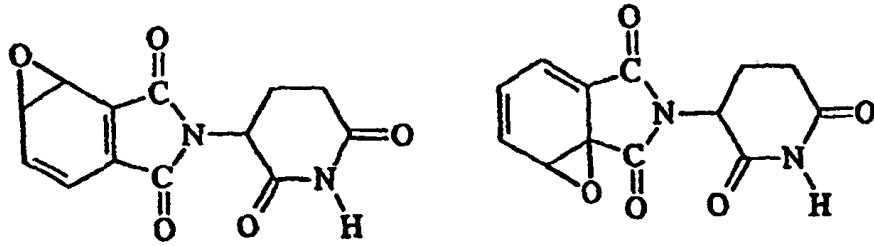
15 en donde R se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, radicales alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, el radical fenilo, y el radical bencilo; en donde R' se selecciona del grupo constituido por el radical ftalimido y el radical succinimido; en donde X es CH<sub>2</sub> o C=O; y en donde R'' es H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, o



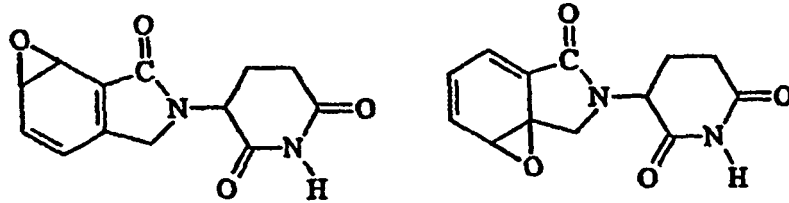
20 y productos de hidrólisis de los compuestos en los cuales R'' es H y el anillo piperidino o ambos anillos piperidino e imido están hidrolizados.

Otra serie de compuestos son los epóxidos de talidomida, EM-12 y EM-138. Compuestos epoxidicos representativos se muestran a continuación:

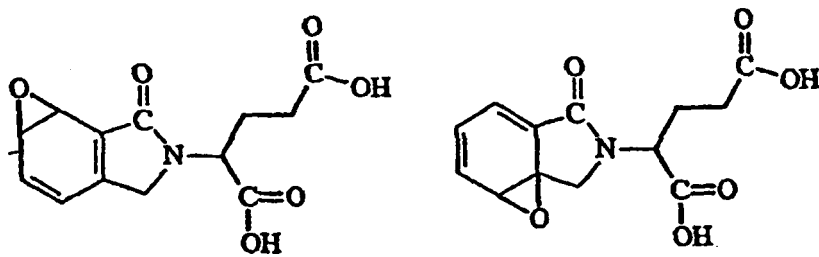




Epóxidos de talidomida

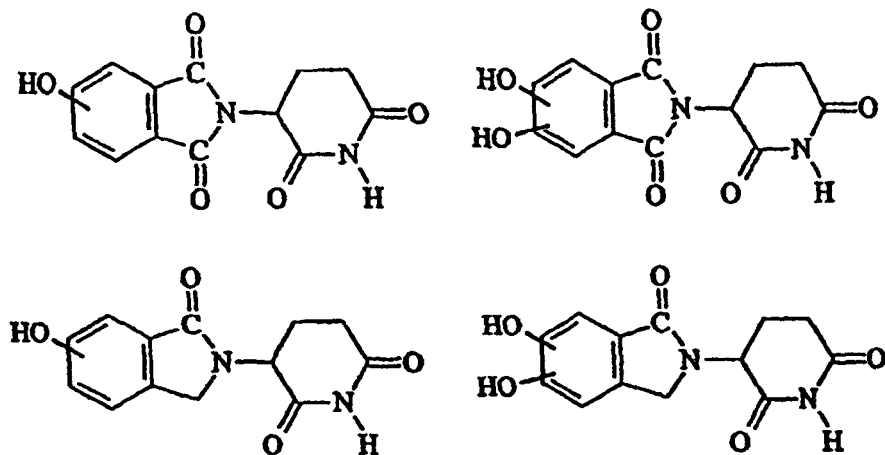


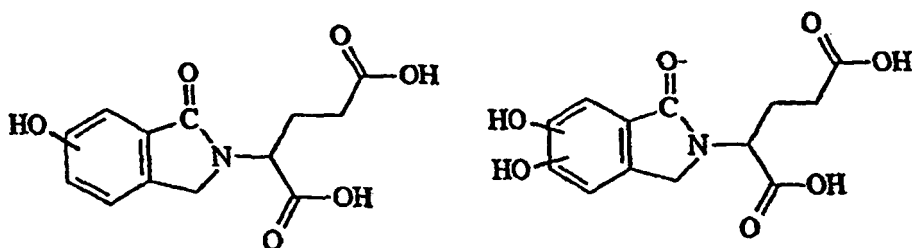
Epóxidos de EM 12



Epóxidos de EM 138

- 5 Debe entenderse que el epóxido puede estar unido en el sitio 6,1 en el anillo de benceno, el sitio 1,2, el sitio 2,3, el sitio 3,4 o el sitio 4,5. Los epóxidos de la talidomida, EM-12, y EM-138 pueden hidrolizarse a los compuestos siguientes:



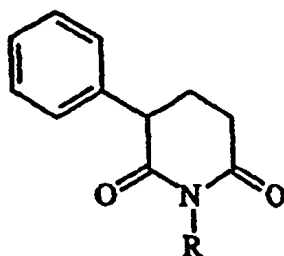


5 Debe entenderse que el grupo hidroxilo puede estar localizado en los carbonos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del anillo de benceno. Se contemplan también compuestos dihidroxilados en los cuales los dos grupos hidroxilo están localizados en posición bis uno con respecto al otro en los carbonos 1, 2, 3, 5 y 6 de los compuestos anteriores. Se contemplan todos, los epóxidos, los productos de hidrólisis de los epóxidos, y los productos de hidrólisis de la talidomida.

10 Es sabido que los epóxidos son hidrolizados por un grupo de enzimas conocidas como epóxido-hidrolasas. Existe una clase de compuestos que son inhibidores de las epóxido-hidrolasas. Ejemplos de estos compuestos son valpromida (2-propilpentanamida) y ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico). Dado que los epóxidos son inhibidores importantes de la angiogénesis, se contemplan composiciones que comprenden cualquiera de los compuestos inhibidores de la angiogénesis citados en esta memoria en combinación con inhibidores de las epóxido-hidrolasas. Los inhibidores de las epóxido-hidrolasas pueden administrarse a un humano o animal juntos o secuencialmente. El grupo epóxido parece ser un sustituyente importante común a varios inhibidores de la angiogénesis. El uso de inhibidores de las epóxido-hidrolasas para potenciar la actividad de cualquier inhibidor de la angiogénesis que contenga un epóxido se contempla como parte de la presente invención. Por ejemplo, los inhibidores de las epóxido-hidrolasas pueden administrarse con los compuestos antiangiogénesis siguientes que contienen epóxido: AGM 1470, Eponimicina, metabolitos microbianos de *Scolecobasidium arenarium* designados f/2015, fr/111142 y fr/18487. Véase Oikawa, *Biochem. Biophys. Res. Comm*, Vol. 81:1070 (1971) y Otsuka *J. Microbial. Biotech.*, Vol. 1:163 (1991).

20 Se contempla el uso de los inhibidores de la angiogénesis que contienen epóxido con o sin inhibidores de las epóxido-hidrolasas como un tratamiento de enfermedades mediadas por niveles elevados o tóxicos de TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  ha sido reconocido como manifestador de una toxicidad dependiente de la dosis. Si está presente a niveles bajos durante un período de tiempo largo, el TNF- $\alpha$  puede dar como resultado caquexia. La caquexia es una pérdida general de peso y masa muscular que se produce en el curso de algunas enfermedades crónicas tales como cáncer, infecciones oportunistas del SIDA, enfermedades inflamatorias, enfermedades parasitarias, tuberculosis, y terapia con dosis elevadas de IL-2. Los inhibidores de la angiogénesis que contienen epóxidos, con o sin inhibidores de las epóxido-hidrolasas, son también eficaces en el tratamiento de enfermedades tales como choque séptico, lepra y enfermedad de rechazo inverso.

30 Por ejemplo, otros compuestos causantes de dismelia pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención, v.g. ácido 4-metilftálico, piridoxina, vasopresina, acetazolamida, o un compuesto que tiene la fórmula siguiente (donde R=H, -OH, o -CH<sub>3</sub>):



Otros compuestos que son teratógenos, tales como el ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico) los retinoides, tales como el ácido cis-retinoico, y la rifampina pueden utilizarse también de acuerdo con la invención.

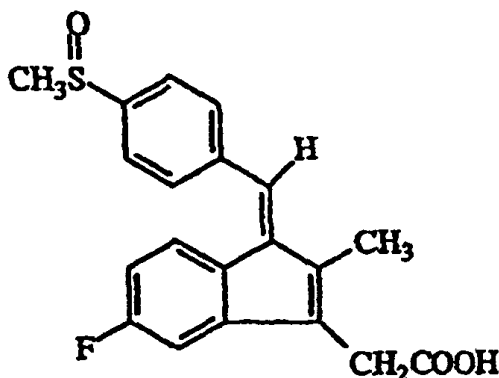
35 En resumen, los compuestos preferidos son talidomida, así como análogos, productos de hidrólisis, metabolitos y precursores de la talidomida que son teratógenos, y, más específicamente, que causan dismelia. Sin embargo, debe entenderse que no es necesario que un compuesto tenga a la vez actividad teratógena y actividad inhibidora de la angiogénesis para ser considerado como parte de la presente invención. Los compuestos causantes de dismelia pueden identificarse por los procedimientos generales de Helm, *Arzneimittelforschung*, 31(i/6):941-949 (1981), en los cuales se examinan crías de conejo después de exposición al compuesto en el útero. Los compuestos pueden adquirirse generalmente, v.g., de Andrusis Pharmaceuticals, Beltsville, MD, o sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos; Debe entenderse que los compuestos de la presente invención pueden existir como enantiómeros y que se consideran la mezcla racémica de enantiómeros o los enantiómeros aislados. Muchos de los

compuestos que se contemplan pueden estar enriquecidos en enantiómeros ópticamente activos de los compuestos arriba especificados. Específicamente, Blaschke ha comunicado que los S-enantiómeros pueden ser desproporcionadamente responsables del efecto productor de dismelia de estos compuestos. Véase en líneas generales Blaschke, *Arzneimittelforschung*, 29:1640-1642 (1979). Los artículos citados anteriormente describen en líneas generales procedimientos para obtener preparaciones ópticamente activas de los compuestos de interés. Véase, v.g. Shealy et al., *Chem. Indus.* 1030 (1965); y Casini et al., *Farmaco Ed. Sci.* 19:563 (1964).

La inhibición de la angiogénesis y el tratamiento de las enfermedades dependientes de la angiogénesis mediante administración de compuestos antiinflamatorios, sea solos o en combinación con otros compuestos inhibidores de la angiogénesis, tales como los arriba descritos, se describen también. Estos compuestos antiinflamatorios pueden ser esteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Ejemplos de esteroides que pueden utilizarse en la invención incluyen, pero sin carácter limitante, cortisona, cortisol, corticosterona, hidrocortisona, hidrocortisol, prednisona, prednisolona, dexametasona, beclometasona, betametasona, mometasona, mometasona-furoato, budesonida, triamcinolona-acetonido, y fluticasona. Esteroides preferidos son prednisona, hidrocortisona, cortisol, dexametasona, betametasona, y beclometasona. Esteroides especialmente preferidos son hidrocortisona, dexametasona, y betametasona.

Ejemplos de NSAIDs que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, esculetina, fenidona, quercetina, quetoprofeno, ácido nordihidroguayarático (NDGA), sulindac, sulindac-sulfona, sulindac-sulfuro, indometacina, NS-398 (un inhibidor de la ciclooxigenasa-2), inhibidores de la ciclooxigenasa-1, metilheptil-imidazol, furegrelato sódico, SKF525AHCL, inhibidores del tromboxano, toradol, ECASA, salsalato, diflunisal, ácido mefenámico, naproxeno, naproxeno-sodio, floctafenina, meclofenamato, fenilbutazona, oxifenbutazona, diclofenaco, etodolac, fenoprofeno, ácido flufenámico, flurbiprofeno, piroprofeno, tolmetina, apazona, fenbufeno, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, salicilato, y tenoxicam. NSAIDs preferidos son sulindac, sulindac-sulfona, sulindac-sulfuro, indometacina, NS-398, metilheptil-imidazol, furegrelato sódico, y SKF525AHCL. NSAIDs especialmente preferidos son indometacina y sulindac.

El sulindac, que incluye ácido (Z)-5-fluoro-2-metil-1-[[4-(metil-sulfinil)fenil]-metileno]-1H-indeno-3-acético, o ácido cis-5-fluoro-2-metil-1-[p-(metilsulfinil)-benciliden]-indeno-3-acético, tiene la estructura siguiente:



Tales compuestos pueden utilizarse para tratar enfermedades dependientes de la angiogénesis. Dichos compuestos pueden utilizarse solos o en combinación con otros compuestos inhibidores de la angiogénesis para tratar enfermedades dependientes de la angiogénesis, tales como el cáncer.

Los compuestos arriba descritos pueden proporcionarse como formulaciones farmacéuticamente aceptables utilizando métodos de formulación conocidos por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica. Estas formulaciones pueden administrarse por rutas estándar. En general, las combinaciones pueden administrarse por la ruta tópica, transdérmica, oral, rectal o parenteral (v.g., intravenosa, subcutánea o intramuscular). Adicionalmente, las combinaciones pueden incorporarse en polímeros biodegradables que permiten la liberación sostenida del compuesto, implantándose los polímeros en la proximidad de donde se desea el suministro del fármaco, por ejemplo, en el sitio de un tumor. Los polímeros biodegradables y su uso se describen, por ejemplo, en detalle en Brem et al., *J. Neurosurg.* 74:441-446 (1991).

La dosificación del compuesto dependerá de la afección de que se trate, del compuesto particular, y otros factores clínicos tales como el peso y el estado del humano o animal y la ruta de administración del compuesto. Debe entenderse que la presente invención tiene aplicación para uso tanto humano como veterinario. Para administración oral a humanos, es generalmente suficiente una dosificación comprendida entre aproximadamente 0,1 y 300 mg/kg/día, con preferencia entre aproximadamente 0,5 y 50 mg/kg/día, y de modo muy preferible entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg/día.

Las formulaciones incluyen aquéllas que son adecuadas para administración oral, rectal, oftálmica (con inclusión de las vías intravítrea o intracameral), nasal, tópica (con inclusión de bucal y sublingual), vaginal o parenteral (con inclusión de las vías subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal, y epidural).

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse por técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen el paso de poner en asociación el ingrediente activo y el o los vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, en caso necesario, conformando el producto.

Formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o tabletas que contienen en cada caso una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite y como un bolus, etc.

Una tableta puede producirse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Tabletas comprimidas pueden prepararse por compresión, en una máquina adecuada, del ingrediente activo en una forma que fluye por sí misma tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglomerante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Pueden producirse tabletas moldeadas por moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto pulverizado mojado con un diluyente líquido inerte. Las tabletas pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y se pueden formular de tal modo que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo contenido en ellas.

Formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen rótulas que comprenden los ingredientes en una base saborizada, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y elixires bucales que comprenden el ingrediente a administrar en un vehículo líquido adecuado.

Formulaciones adecuadas para administración tópica a la piel pueden presentarse como ungüentos, cremas, geles y pastas que comprenden el ingrediente a administrar en un vehículo farmacéutico aceptable. Un sistema de suministro tópico preferido es un parche transdérmico que contiene el ingrediente a administrar.

Las formulaciones para administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Formulaciones adecuadas para administración nasal, en las cuales el vehículo es un sólido, incluyen un polvo de grano grueso que tiene un tamaño de partícula comprendido, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la manera en que se administra el rapé, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un envase del polvo mantenido muy cerca de la nariz. Formulaciones adecuadas, en las cuales el vehículo es un líquido, para administración, como por ejemplo, una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas o aceitosas del ingrediente activo.

Formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, Tamports, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de spray que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tales como los que se conocen en la técnica como apropiados.

Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor propuesto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales herméticamente cerrados, y pueden guardarse en condiciones secadas por congelación (liofilizadas) que requieren únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su utilización. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles de la clase descrita previamente.

Formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquéllas que contienen una dosis o unidad diaria, o sub-dosis diaria del ingrediente administrado, como se ha expuesto anteriormente en esta memoria, o una fracción apropiada de la misma.

Debe entenderse que, además de los ingredientes mencionados particularmente arriba, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tienen relación con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, aquéllas que son adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

Enfermedades asociadas con la neovascularización de la córnea que pueden tratarse incluyen, pero sin carácter limitante, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad, rechazo de injertos de córnea, glaucoma neovascular y fibroplasia retrolental, queratoconjuntivitis epidémica, deficiencia en Vitamina A, uso excesivo de lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, queratitis seca del pterigio, síndrome de Sjögren, acné rosácea, filectenulosis, sífilis, infecciones por *Mycobacteria*, degeneración lipídica, quemaduras químicas, úlceras bacterianas, úlceras fúngicas, infecciones por *Herpes simplex*, infecciones por *Herpes zóster*, infecciones por protozoos, sarcoma de Kaposi, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratólisis marginal,

traumatismos artritis reumatoide, lupus sistémico, poliarteritis, sarcoidosis de Wegener, escleritis, enfermedad de Stevens-Johnson, queratotomía radial, penfigoide y rechazo de injertos de córnea.

Enfermedades asociadas con neovascularización retinal/coroidal que pueden tratarse incluyen, pero sin carácter limitante, retinopatía diabética, degeneración macular, anemia de células falciformes, sarcoide, sífilis, pseudoxantoma elástico, enfermedad de Paget, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva carotídea, uveítis/vitritis crónica, infecciones por micobacterias, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, retinopatía de la prematuridad, enfermedad de Eales, enfermedad de Behcet, infecciones causantes de retinitis o coroiditis, histoplasmosis ocular supuesta, enfermedad de Best, miopía, pozos ópticos enfermedad de Stargardt, pars planitis, desprendimiento crónico de retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, traumatismos y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen, pero sin carácter limitante, enfermedades asociadas con rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso con inclusión de todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, estén asociadas o no con diabetes.

Con las composiciones y los métodos descritos pueden tratarse enfermedades asociadas con inflamación crónica. Enfermedades con síntomas de inflamación crónica incluyen enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, psoriasis, sarcoidosis y artritis reumatoide. La angiogénesis es un elemento clave que tienen en común estas enfermedades inflamatorias crónicas. La inflamación crónica depende de la formación continua de brotes capilares para mantener el flujo de células inflamatorias. El flujo y la presencia de las células inflamatorias producen granulomas y, de este modo, mantienen el estado inflamatorio crónico. La inhibición de la angiogénesis por las composiciones y los métodos de la presente invención podría prevenir la formación de los granulomas y aliviar la enfermedad.

Las composiciones y los métodos pueden utilizarse para tratar pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Tanto la enfermedad de Crohn como la colitis ulcerosa se caracterizan por inflamación crónica y angiogénesis en diversos sitios del tracto gastrointestinal. La enfermedad de Crohn se caracteriza por inflamación granulomatosa crónica a todo lo largo del tracto gastrointestinal constituida por nuevos brotes capilares rodeados por un cilindro de células inflamatorias. La prevención de la angiogénesis por las composiciones y los métodos de la presente invención inhibe la formación de los brotes y previene la formación de granulomas.

La enfermedad de Crohn ocurre como una enfermedad inflamatoria crónica transmural que afecta en la mayoría de los casos al íleo distal y el colon, pero puede presentarse también en cualquier parte del tracto gastrointestinal desde la boca al ano y al área perianal. Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen generalmente diarrea crónica asociada con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso e hinchamiento abdominal. La colitis ulcerosa es también una enfermedad crónica, inespecífica, inflamatoria y ulcerosa que se origina en la mucosa del colon y se caracteriza por la presencia de diarrea sanguinolenta.

Las enfermedades intestinales inflamatorias exhiben también manifestaciones extraintestinales tales como lesiones en la piel. Dichas lesiones se caracterizan por inflamación y angiogénesis y pueden presentarse en muchos sitios distintos del tracto gastrointestinal. Las composiciones y los métodos de la presente invención son capaces también de tratar estas lesiones por prevención de la angiogénesis, reduciendo con ello el flujo de células inflamatorias y la formación de lesiones.

La sarcoidosis es otra enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza como un trastorno granulomatoso multisistémico. Los granulomas de esta enfermedad pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo y, por tanto, los síntomas dependen del sitio de los granulomas y de si la enfermedad es activa. Los granulomas son originados por los brotes capilares angiogénicos que proporcionan un suministro constante de células inflamatorias.

Las composiciones y los métodos descritos pueden tratar también las afecciones inflamatorias crónicas asociadas con la psoriasis. La psoriasis, una enfermedad de la piel, es otra enfermedad crónica y recurrente que se caracteriza por pápulas y placas de diversos tamaños. La prevención de la formación de los nuevos vasos sanguíneos necesarios para mantener las lesiones características conduce al alivio de los síntomas.

Otra enfermedad que puede tratarse es la artritis reumatoide. La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por inflamación inespecífica de las articulaciones periféricas. Se cree que los vasos sanguíneos en el revestimiento sinovial de las articulaciones sufren angiogénesis. Además de formar nuevas redes vasculares, las células endoteliales liberan factores y especies químicas de oxígeno reactivas que conducen al crecimiento del pannus y la destrucción del cartílago. Los factores implicados en la angiogénesis pueden contribuir activamente a, y ayudar a mantener el estado crónicamente inflamado de la artritis reumatoide.

Otras enfermedades que pueden tratarse son los hemangiomas, la enfermedad de Osler-Weber-Rendu, o la telangiectasia hemorrágica hereditaria, tumores sólidos o transportados por la sangre y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen el uso de compuestos inhibidores de la angiogénesis y compuestos antiinflamatorios, tales como esteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Las composiciones y métodos de la presente invención incluyen la combinación de compuestos

inhibidores de la angiogénesis, tales como talidomida o análogos afines a la talidomida o AMG-1470, EM-12 o EM-138 con compuestos antiinflamatorios, tales como esteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen también el uso de compuestos antiinflamatorios solos. Estas composiciones pueden utilizarse para tratar enfermedades dependientes de la angiogénesis.

5 Por ejemplo, se ha encontrado que la indometacina (5 mg/kg) inhibe la angiogénesis inducida por bFGF en un 59% y la angiogénesis inducida por VEGF en un 61%. Análogamente, se ha encontrado que el sulindac (25 mg/kg) inhibe la angiogénesis inducida por bFGF en un 50% y la angiogénesis inducida por VEGF en un 55%. El sulindac se metaboliza in vivo para dar dos metabolitos: sulindac-sulfuro y sulindac-sulfona. Sulindac-sulfuro inhibe activamente la síntesis de las prostaglandinas, mientras que sulindac-sulfona no lo hace; sin embargo, se ha  
10 encontrado que ambos son inhibidores de la angiogénesis. Se encontró que sulindac-sulfuro inhibe la neovascularización inducida por bFGF en un 34%, y sulindac-sulfona exhibía 31% de inhibición.

Se ha encontrado también que otros NSAIDs inhiben la neovascularización asociada con angiogénesis. Por ejemplo, carbometilheptil-imidazol y furegrelato sódico, inhibidores ambos del tromboxano, inhiben la neovascularización inducida por bFGF en un 32% y 22%, respectivamente. Se encontró que otro inhibidor del tromboxano, SKF525AHCL, que promueve la producción de prostaglandinas, inhibe la neovascularización inducida por bFGF en un 25%. El inhibidor específico de la ciclooxigenasa-2, NS-398, inhibía también la neovascularización inducida por bFGF en un 25%.

20 Cuando se combina sulindac con talidomida, se produce un efecto aditivo en la inhibición de la angiogénesis. Cuando se combina sulindac con otros compuestos inhibidores de la angiogénesis, tales como AMG 1470, EM-12 o EM-138, existe un efecto aditivo en la inhibición de la angiogénesis. La angiogénesis en el ojo, en el ensayo descrito en el Ejemplo 2, se produce por la presencia de bFGF (factor básico de crecimiento de los fibroblastos) y VEGF (factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares). La inhibición de dicha angiogénesis se demostró con los NSAIDs, esteroides, talidomida, o la combinación de talidomida y un NSAID, sulindac.

AGENTE	DOSIS	bFGF <sup>1</sup>	VEGF <sup>2</sup>
Aspirina	100 mg/kg	8	-
Acetaminofeno	100 mg/kg	0	0
Ibuprofeno	20 mg/kg	7	11
Hidrocloruro de cortisona	20 mg/kg	50	40
Sulindac	25 mg/kg	52	54
Talidomida	200 mg/kg	42	44
Talidomida + Sulindac	200 mg/kg (tal) + 25 mg/kg (sulindac)	65	74
AGM 1470	30 mg/kg qod	48	
AGM 1470 + Sulindac	30 mg/kg qod (AGM) + 25 mg/kg (Sulindac)	70	

25 <sup>1</sup> % de inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF

<sup>2</sup> % de inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF

30 La inhibición de VEGF en un 74% demuestra el efecto aditivo cuando se combinan talidomida y sulindac. Los datos para hidrocloruro de cortisona, sulindac, talidomida y talidomida + sulindac difieren significativamente de los controles (p < 0,0001). Los estudios con la composición que comprende talidomida y sulindac sobre el carcinoma V2 en los conejos han demostrado un valor T/C (relación de tratado a control) de 0,32 después de 18 días de tratamiento oral con 200 mg/kg de talidomida combinados con 25 mg/kg de sulindac.

35 Se observa también un efecto aditivo en la combinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros compuestos inhibidores de la angiogénesis tales como la combinación de sulindac y AGM-1470. AGM-1470 es un compuesto conocido inhibidor de la angiogénesis como se expone en Brem et al. Una resistencia mínima a los fármacos se produce después de terapia antiangiogénica prolongada con AGM-1470, *Surgical Forum* 45(0), 1994, pp 674-677, incorporado en esta memoria por referencia. Como se muestra en el cuadro anterior, sulindac más AGM-1470 exhibe un efecto inhibidor sobre la angiogénesis mayor que lo hace cualquiera de los compuestos por separado.

**Ejemplo I**

Se utiliza el ensayo de la membrana corioalantoica del embrión de pollo descrito por Crum et al., *Science* 230:1375 y siguientes (1985), para identificar compuestos que no requieren conversión metabólica ulterior. Véase también la Patente U.S. 5.001.116, que describe el ensayo CAM en la col. 7 de la patente. Resumidamente, se extrajeron de su cáscara embriones de pollo fertilizados el día 3 ó 4, y se implantó en la membrana corioalantoica un disco de metilcelulosa que contenía el compuesto. Los embriones se examinaron 48 horas más tarde y, si aparecía una zona clara desprovista de vasos alrededor del disco de metilcelulosa, se midió el diámetro de dicha zona.

**Ejemplo II***Ensayo de angiogénesis en la córnea del conejo*

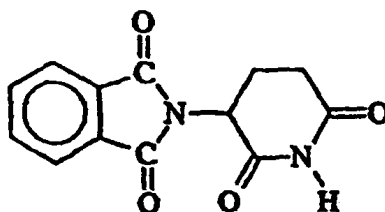
Se prepararon pelets para implantación en córneas de conejo por mezcla de 110 µl de solución salina que contenía 12 µg de bFGF recombinante (Takeda Pharmaceuticals-Japón) con 40 mg de sucralfato (Bukh Meditec-Dinamarca); se añadió esta suspensión a 80 µl de Hydron al 12% (Interferon Sciences) en etanol. Se pipetearon luego partes alícuotas de 10 µl de esta mezcla sobre fichas de Teflón y se dejaron secar, produciendo aproximadamente 17 pelets. Se implantó un pelet en las microbolsas corneales de cada ojo de un conejo blanco hembra de Nueva Zelanda anestesiado, a 2 mm del limbo, seguido por aplicación tópica de ungüento de eritromicina en la superficie corneal. Los animales se alimentaron diariamente a partir del segundo día después de la implantación por lavado gástrico con fármaco suspendido en carboximetil-celulosa al 0,5% o carboximetilcelulosa al 0,5% sola. La talidomida se adquirió de Andrus Pharmaceutical (Maryland) y EM-12 y Supidimida fueron proporcionados amablemente por Grunenthal GMBH (Alemania). Los animales se examinaron con una lámpara de rendija en días alternos de manera enmascarada por el mismo especialista de la córnea. El área de neovascularización de la córnea se determinó por medida de la longitud del vaso (L) con un retículo desde el limbo y el número de horas (C) del limbo implicado. Se utilizó una fórmula para determinar el área de un segmento de banda circular:  $C/12 * 3,1416[r^2 - (r-L)^2]$  donde r = 6 mm es el radio medido de la córnea del conejo. Se utilizaron diversos modelos matemáticos para determinar la magnitud de la córnea vascularizada, y se encontró que esta fórmula proporciona la aproximación más exacta del área de la banda de neovascularización que crece hacia el pelet.

Es importante indicar que el ensayo de la córnea del conejo es preferible debido a que el mismo reconocerá generalmente compuestos que son inactivos *per se* pero que se metabolizan para proporcionar compuestos activos. Se sabe que los compuestos afines a la talidomida, como se muestra a continuación en el Ejemplo III, son teratógenos y son candidatos para uso en la presente invención.

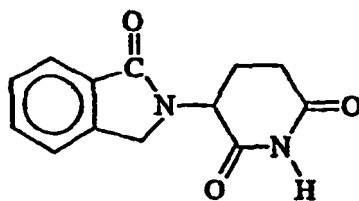
**Ejemplo III***Inhibición de la neovascularización corneal inducida por bFGF por la talidomida y análogos afines expresada como porcentaje del control mediano al cabo de 8 días*

Se implantaron pelets que contenían bFGF y sucralfato en las microbolsas de ambas córneas de conejos de acuerdo con el Ejemplo II. El crecimiento interno de vasos en la córnea transparente desde el limbo se observó por primera vez el día 2 y los tratamientos (200 mg/kg por vía oral) se iniciaron en dicho día. El área de neovascularización de la córnea se midió desde el día 4 hasta el día 12. Se utilizaron las medidas del octavo día para comparación entre grupos. No se observó regresión alguna de los vasos y se apreció una neovascularización cuasi-máxima en dicho momento. Se realizó el análisis estadístico con ANOVA con datos clasificados por rangos para dar cuenta de la variación interexperimental y prevenir contra una distribución no normal de los datos (es decir resultados aberrantes) utilizando un método no paramétrico.

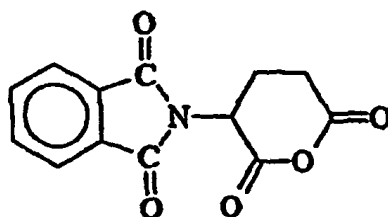
Los compuestos ensayados fueron los siguientes:



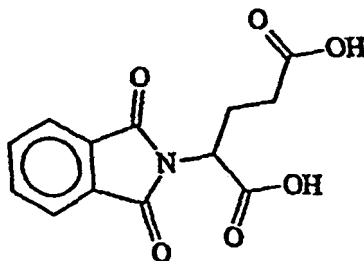
**talidomida**



EM-12



anhídrido ftaloil-glutámico (PGA)



ácido ftaloil-glutámico (Ácido PG)

- 5 El tratamiento con una dosis (200 mg/kg) de talidomida dio como resultado una inhibición del área vascularizada de la córnea que estaba comprendida entre 30 y 51% en tres experimentos con una inhibición mediana de 36% (Figura 6) (n = 30 ojos, p = 0,0001, ANOVA de 2 vías con datos clasificados por rangos). La inhibición de la angiogénesis por la talidomida se observó después de sólo dos dosis (Figura 7). Los conejos no demostraban sedación obvia y no se apreciaba signo alguno de toxicidad o pérdida de peso. El análogo teratógico
- 10 EM-12, que comparte las otras propiedades de la talidomida, era también inhibidor, con una inhibición mediana de 42% (n = 10 ojos, p = 0,002, ANOVA de 1 vía con datos clasificados por rangos). La supidimida, un análogo no teratológico de la talidomida que conserva las propiedades sedantes de la talidomida, no exhibía actividad alguna (área 107% del control, n = 10 ojos, estadísticamente no diferente del control). Otros análogos, PGA y ácido PG exhibían efectos inhibidores más débiles que la talidomida (datos no presentados). La densidad de crecimiento
- 15 interno de vasos en los animales tratados con talidomida se reducía también acusadamente.

#### Ejemplo IV

##### *Ensayo de EM-12 en la córnea del conejo*

Se evaluó EM-12 en el ensayo de la córnea del conejo descrito en el Ejemplo II a 100 mg/kg/día y exhibió un 21% de inhibición, y a 200 mg/kg/día el ensayo exhibió 43% de inhibición.

20

#### Ejemplo V

##### *Ácido ftaloil-glutámico en CAM*

Se evaluó el ácido ftaloil-glutámico en el ensayo CAM arriba descrito y exhibió una zona desprovista de vasos con una escara moderada.

#### Ejemplo VI

##### *Ensayo del ácido ftaloil-glutámico en la córnea del conejo*

El ácido ftaloil-glutámico arriba descrito a 200 mg/kg exhibía 29% de inhibición de la angiogénesis.

25



**Ejemplo VII***Ensayo del anhídrido ftaloil-glutámico en CAM*

Se testó el anhídrido ftaloil-glutámico en el ensayo CAM arriba descrito y exhibía una zona desprovista de vasos.

5

**Ejemplo VIII***Tratamiento de la enfermedad de Crohn*

Una mujer de 32 años que padecía la enfermedad de Crohn se trató utilizando los métodos de la presente invención. La paciente presentaba los síntomas característicos de la enfermedad de Crohn, a saber, complicación gastrointestinal grave (con inclusión de diarrea y retortijones) y una gran lesión en la piel en la parte inferior de la pierna. Se administró talidomida por vía oral a la mujer a una dosis de 100 mg dos veces al día. Después de tratamiento continuado durante una semana, los síntomas gastrointestinales, con inclusión de la diarrea y los retortijones, se aliviaron y la lesión de la piel se resolvió.

10

**Ejemplo IX***Ensayo de las microbolsas corneales*

Se obtuvieron ratones macho C57B16, de 6 a 8 semanas, de Jackson Laboratories, MA. Se anestesiaron los ratones, y se practicaron bolsas de 0,4 x 0,4 mm en el estroma de la córnea de los ratones adyacente al limbo. Se implantaron en los pelets (sic) pelets que contenían 80 ng de bFGF o VEGF. Los pelets que contenían bFGF se implantaron a 1,0-1,2 mm de los vasos límbicos, mientras que los pelets que contenían VEGF se implantaron a 0,5-0,7 mm de los vasos límbicos. Se aplicó luego eritromicina por vía tópica.

15

Los ratones se trataron luego con dosis variables de fármacos antiinflamatorios como se muestra en la tabla siguiente. La respuesta vascular a los pelets se midió por la longitud máxima de los vasos y el número de horas de neovascularización 5 días después de la implantación de los pelets de bFGF y 6 días después de la implantación de los pelets de VEGF. El área de neovascularización de la córnea se calculó utilizando la fórmula siguiente que se aproximaba óptimamente al área de neovascularización: Área (mm<sup>2</sup>) = [π x horas x longitud (mm) x 0,2 (mm)]. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

20

25

AGENTE	DOSIS	bFGF <sup>1</sup>	VEGF <sup>2+</sup>	n	Valor p
Acetaminofeno	100 mg/kg	0	-	8	ns
Aspirina	10-160 mg/kg	0-11	-	8	ns
NDGA	25 mg/kg	30	-	8	ns
Esculetina	200 mg/kg	15	-	8	0,02
Fenidona	100 mg/kg	17	-	8	< 0,01
Quercetina	300 mg/kg	18	-	8	< 0,01
Ibuprofeno	25 mg/kg	6	8	23/8	ns/ns
Quetoprofeno	80 mg/kg	30	41	8/8	< 0,01
Indometacina	5 mg/kg	59	61	15/21	< 0,01/< 0,01
Sulindac	25 mg/kg	50	55	15/15	< 0,01/< 0,01

<sup>1</sup> % de Inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF

<sup>2</sup> % de Inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF

30

El efecto inhibitor se expresa en porcentaje representando el área de neovascularización de la córnea por bFGF o VEGF en comparación con los controles (n = 8/experimento) de los experimentos en los cuales se ensayó dicho fármaco particular. N = el número de ojos que se ensayaron, y los fármacos se administraron una sola vez al día por vía sc, ip u oral como se describe.

**Ejemplo X**

35

Se obtuvieron ratones macho C57B16 de 6 a 8 semanas de Jackson Laboratories, MA. Se anestesiaron los ratones, y se practicaron bolsas de 0,4 x 0,4 mm en el estroma de la córnea de los ratones adyacente al limbo. Se implantaron pelets que contenían 80 ng de bFGF o VEGF. Los pelets que contenían bFGF se implantaron a 1,0-1,2

mm de los vasos límbicos, mientras que los pelets que contenían VEGF se implantaron a 0,5-0,7 mm de los vasos límbicos. Se aplicó después eritromicina por vía tópica.

5 Los ratones se trataron luego con talidomida, indometacina, sulindac, o combinaciones de talidomida con indometacina o sulindac. La respuesta vascular a los pelets se midió por la longitud máxima de los vasos y el número de horas de neovascularización 5 días después de la implantación de los pelets de bFGF y 6 días después de la implantación de los pelets de VEGF. El área de neovascularización de la córnea se calculó utilizando la fórmula siguiente que se aproxima óptimamente al área de neovascularización:  $\text{Área (mm}^2\text{)} = [\pi \times \text{horas} \times \text{longitud (mm)} \times 0,2 \text{ (mm)}]$ . Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

AGENTE	DOSIS	bFGF <sup>1</sup>	VEGF <sup>2</sup>	n
Talidomida	200 mg/kg	41	40	31/39
Indometacina	5 mg/kg	59	61	15/21
Sulindac	25 mg/kg	50	55	15/15
Talidomida + Indometacina	200 mg/kg + 5 mg/kg	67	61	15/21
Talidomida + Sulindac	200 mg/kg + 25 mg/kg	63 <sup>3</sup>	74 <sup>3</sup>	15/16

<sup>1</sup> % de Inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF

10 <sup>2</sup> % de Inhibición de la angiogénesis inducida por VEGF

<sup>3</sup> El efecto inhibitor es significativamente diferente del de cualquier agente por separado ( $p < 0,01$ , ensayado por ANOVA).

15 El efecto inhibitor se expresa en porcentaje representando el área de neovascularización de la córnea por bFGF o VEGF comparado con los controles ( $n = 8/\text{experimento}$ ) de los experimentos en los cuales se ensayó dicho fármaco particular. N = el número de ojos que se ensayaron, y los fármacos se administraron una sola vez al día por vía sc, ip u oral como se ha descrito.

### Ejemplo XI

20 Se anestesiaron ratones macho C57B16 de 6 a 8 semanas, obtenidos de Jackson Laboratories, MA, y se practicaron bolsas de 0,4 x 0,4 mm en el estroma de la córnea de los ratones adyacente al limbo. Se implantaron pelets que contenían 80 ng de bFGF a 1,0-1,2 mm de los vasos límbicos. Se aplicó luego eritromicina por vía tópica.

25 Los ratones se trataron después con sulindac, o uno de los derivados de sulindac, sulindac-sulfona o sulindac-sulfuro. La respuesta vascular a los pelets se midió por la longitud máxima de los vasos y el número de horas de neovascularización 5 días después de la implantación de los pelets de bFGF. El área de neovascularización de la córnea se calculó utilizando la fórmula siguiente que se aproxima óptimamente al área de neovascularización:  $\text{Área (mm}^2\text{)} = [\pi \times \text{horas} \times \text{longitud (mm)} \times 0,2 \text{ (mm)}]$ . Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

AGENTE	DOSIS	% inhibición	n
Sulindac	25 mg/kg	50	15
Sulindac-sulfuro	25 mg/kg	31	8
	50 mg/kg	34	8
Sulindac-sulfona	25 mg/kg	31	16

30 El efecto inhibitor se expresa en porcentaje representando el área de neovascularización de la córnea por bFGF en comparación con los controles ( $n = 8/\text{experimento}$ ). N = el número de ojos que se ensayaron, y los fármacos se administraron una sola vez al día por vía sc, ip u oral como se ha descrito.

**Ejemplo XII***Ensayo de Tumor*

5 Se utilizaron conejos hembra blancos de Nueva Zelanda, que pesaban aproximadamente 1,5 kg, obtenidos de Charles River, MA, para propagar el carcinoma V2. Este tumor es originado por un papiloma inducido por el virus Shope. Se implantaron pequeños fragmentos de 0,5 x 0,5 cm por vía intramuscular en el muslo derecho. El

10 tratamiento con 200 mg/kg/día de talidomida (n = 14), 60 mg/kg/día de sulindac (n = 5) o una combinación de talidomida y sulindac (n = 10) se inició el día 10 después de la implantación del tumor, cuando el volumen medio del tumor era 6 cm<sup>3</sup>. Los animales de control (n = 13) se trataron con metilcelulosa. Los conejos se sacrificaron 17 días después del comienzo del tratamiento cuando el volumen medio de los tumores de control era 100 cm<sup>3</sup>. Los

15 resultados de este experimento (Figura 8) indican que la combinación de talidomida y sulindac es más eficaz en la reducción del tamaño de los tumores del carcinoma V2 que la talidomida o el sulindac solos. La combinación de talidomida y sulindac inhibía el crecimiento del tumor en un 75% y era significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) de cualquier agente solo o del grupo de control. El tratamiento oral con sulindac o talidomida inhibía el crecimiento del tumor en, respectivamente, 35% (n = 5,  $p < 0,01$ ) y 55% (n = 14,  $p < 0,01$ ). Los datos se recogieron en 3 experimentos separados y cada barra representa el error estándar del valor medio.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor transportado por la sangre, donde la talidomida y dexametasona se administran a un humano o animal conjuntamente.
- 5 2.- Talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor transportado por la sangre, donde la talidomida y dexametasona se administran a un humano o animal secuencialmente.
- 3.- Talidomida y dexametasona para usar en el tratamiento de un tumor sólido, donde la talidomida y dexametasona se administran a un humano o animal conjuntamente o secuencialmente.
- 4.- Talidomida y dexametasona, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cantidad de talidomida es de 0,1 a 300 mg/kg/día.
- 10 5.- Talidomida y dexametasona, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cantidad de talidomida es de 0,5 a 50 mg/kg/día.
- 6.- Talidomida y dexametasona, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cantidad de talidomida es de 1 a 10 mg/kg/día.
- 15 7.- Talidomida y dexametasona, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la talidomida y la dexametasona deben administrarse por vía parenteral.
- 8.- Talidomida y dexametasona, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la talidomida y la dexametasona deben administrarse por vía oral.

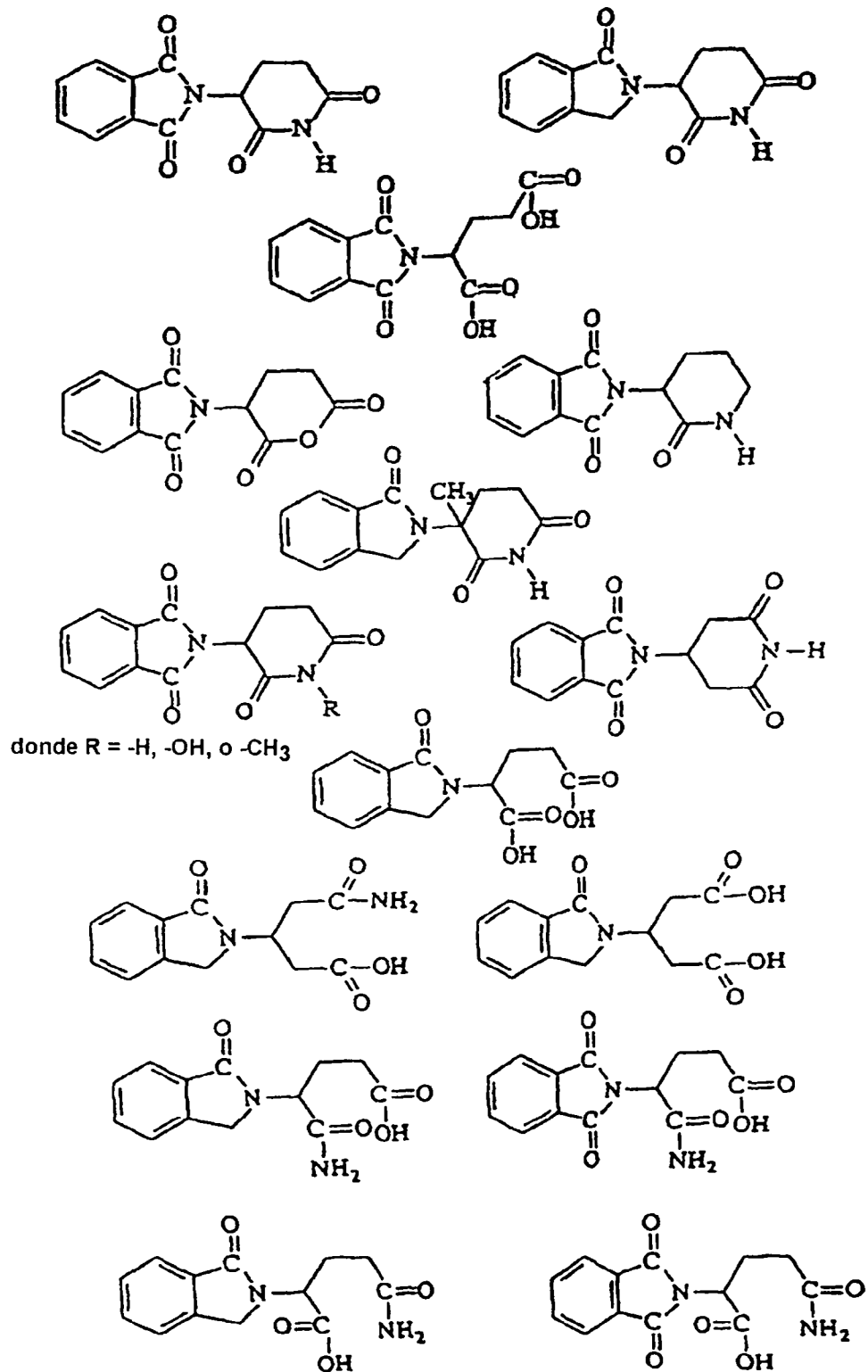


FIGURA 1

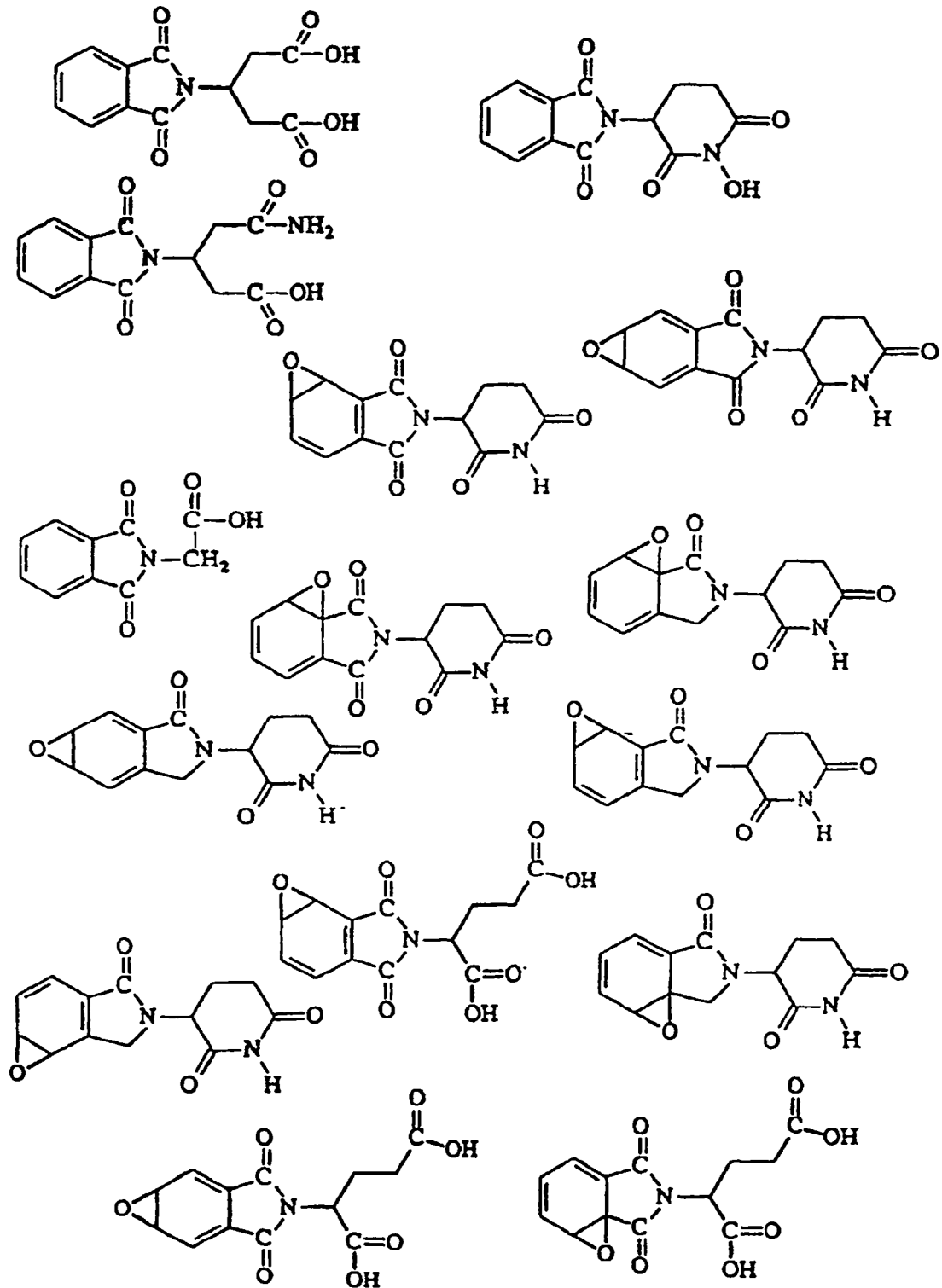


Figura 2

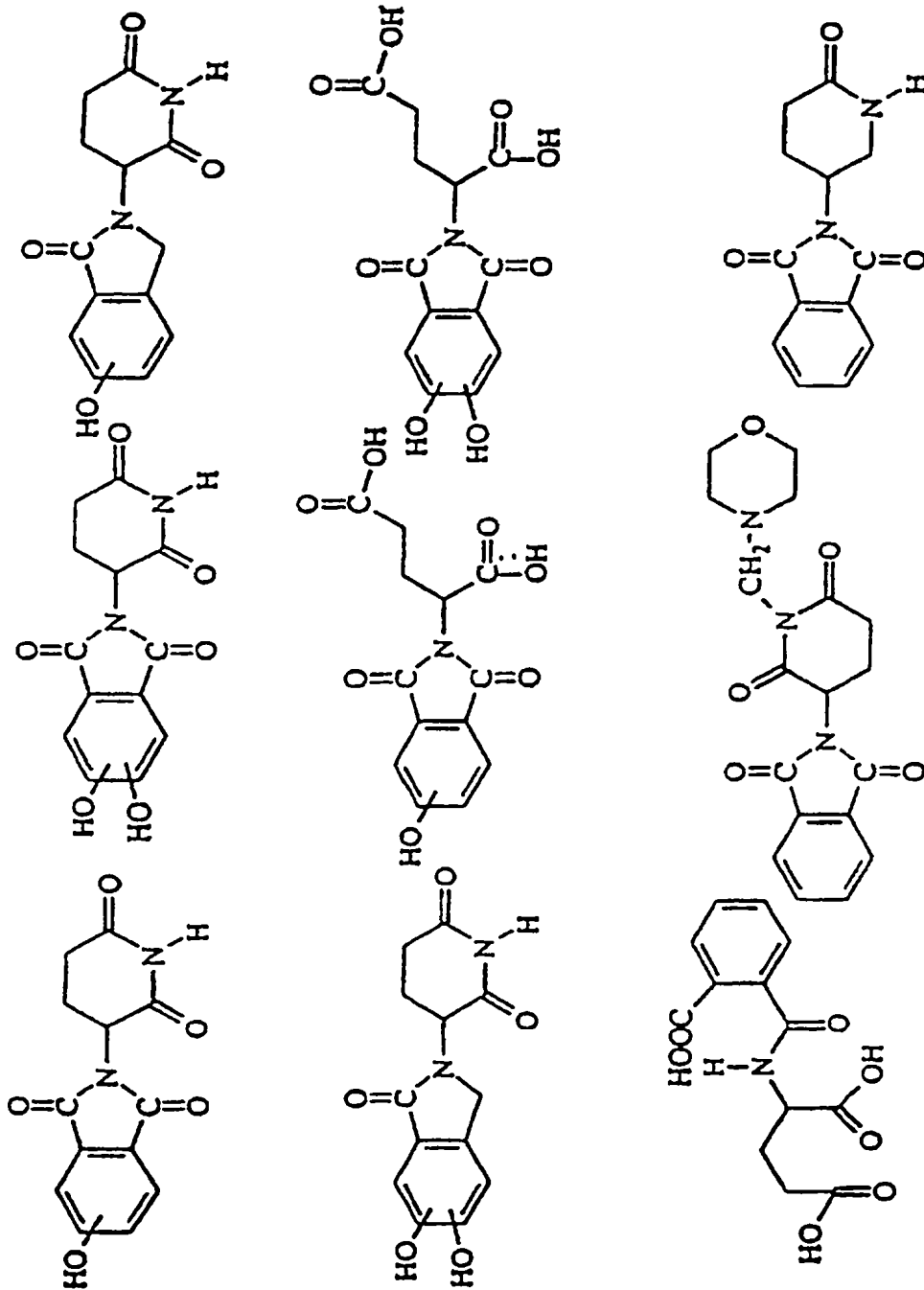


Figura 3

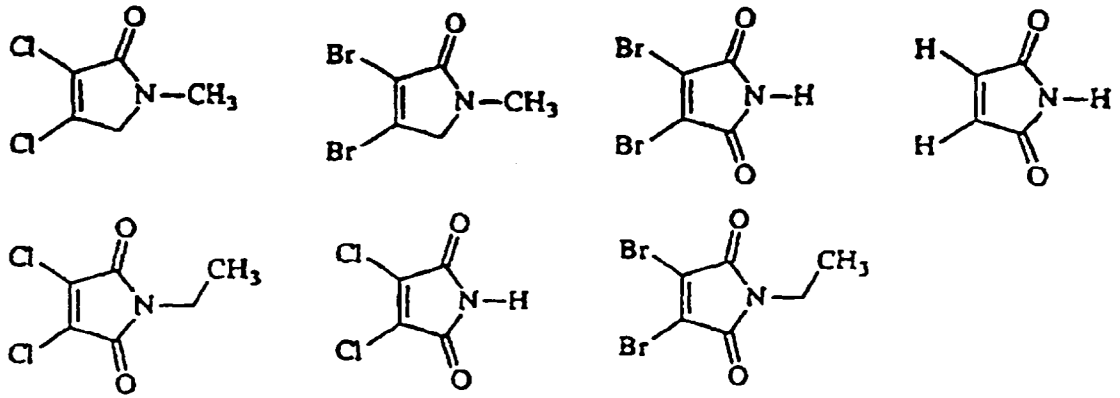


Figura 4



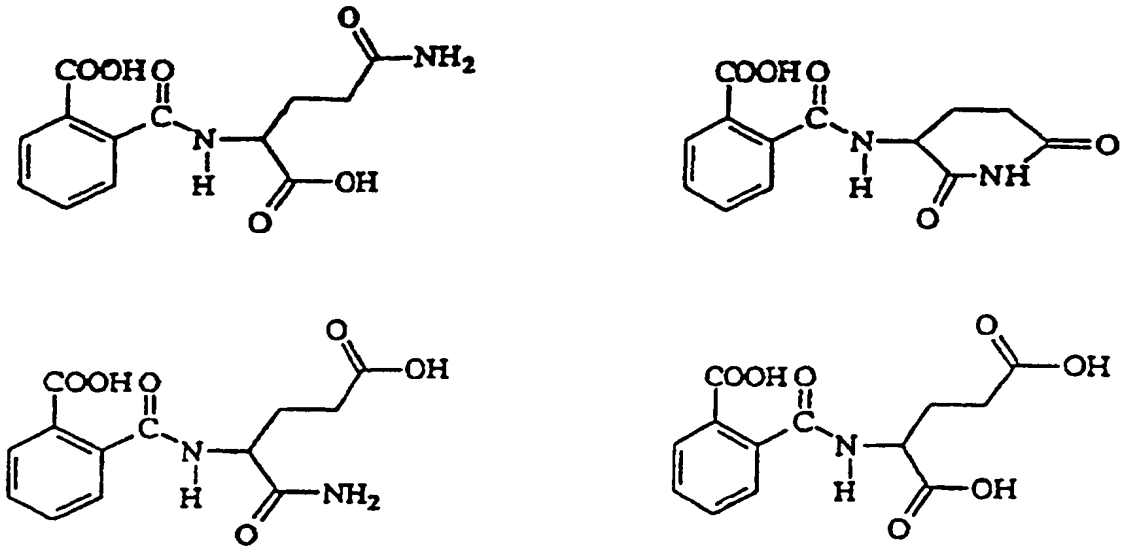


Figura 5

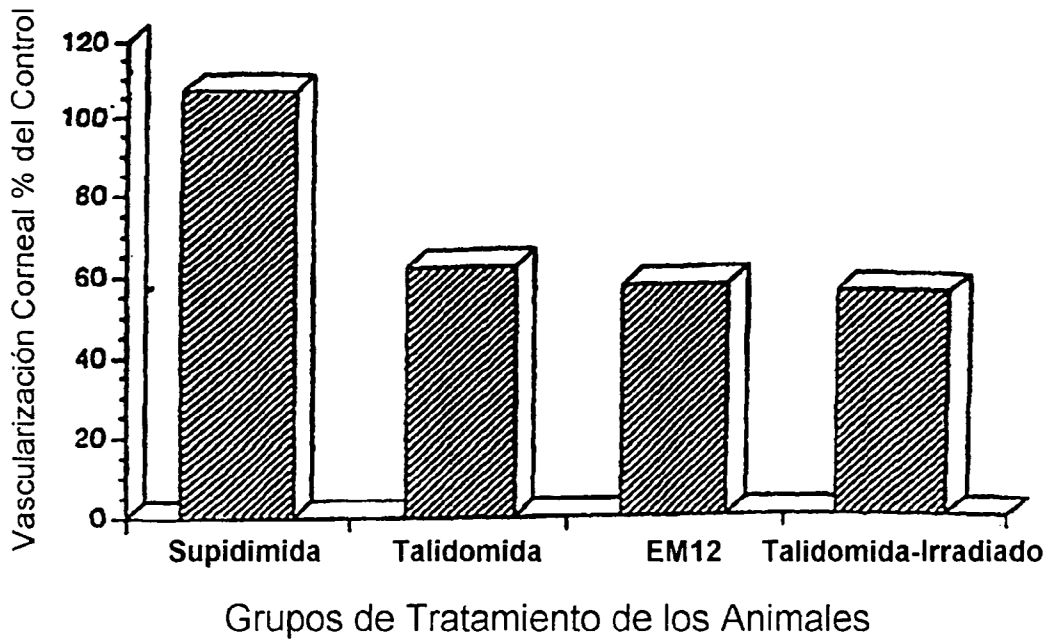


Figura 6

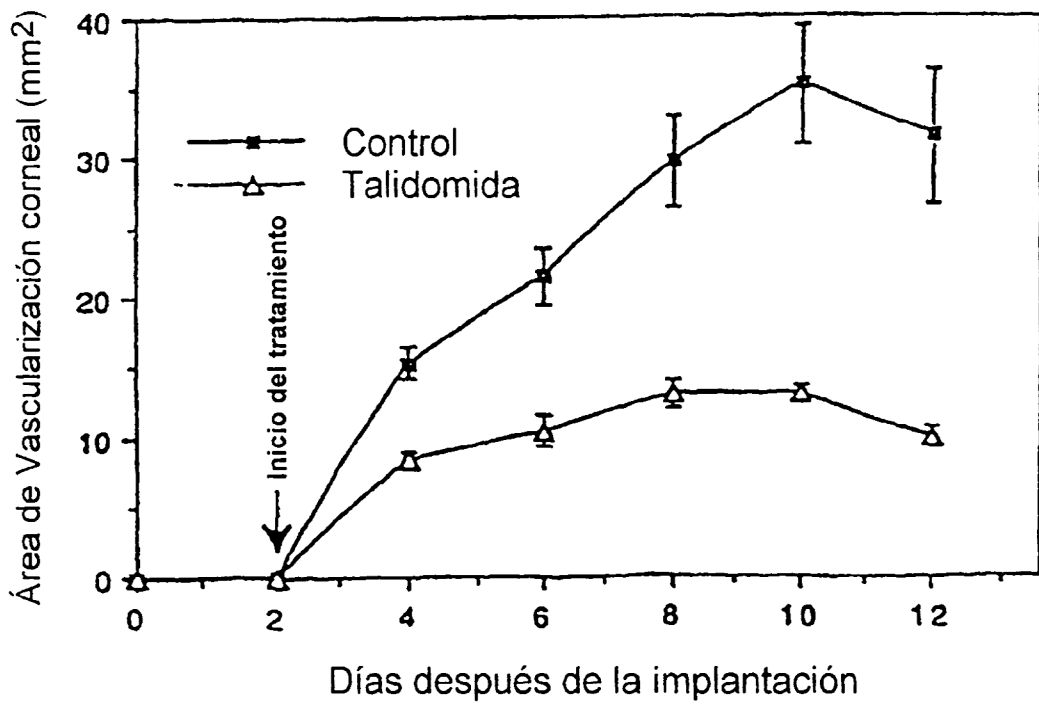


Figura 7

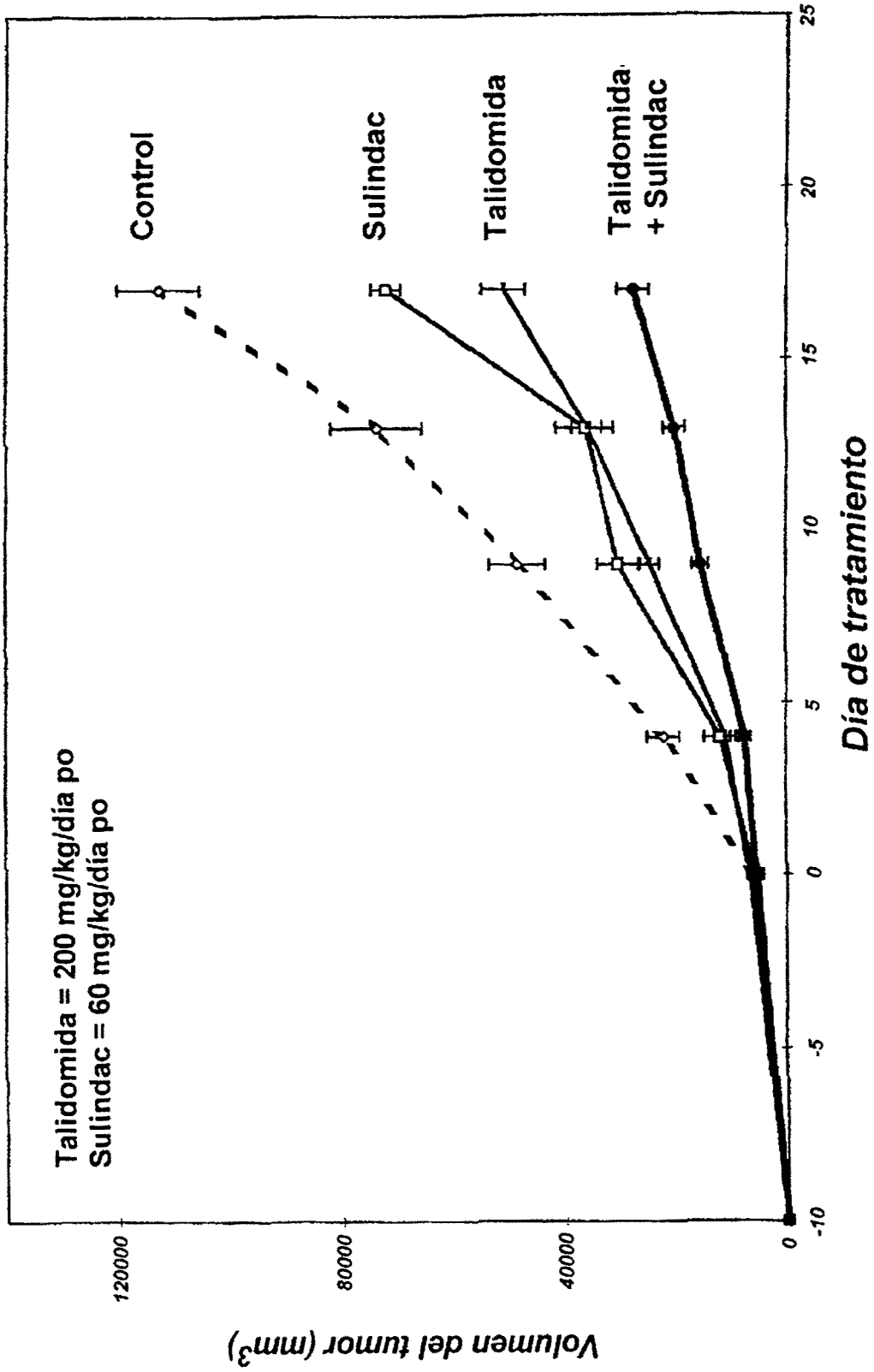


FIGURA 8