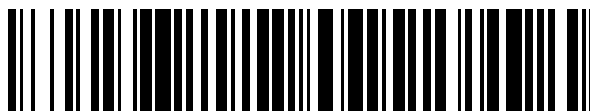


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 800**

51 Int. Cl.:

A61K 31/28	(2006.01)	A61P 3/02	(2006.01)
C07C 211/00	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C07C 213/00	(2006.01)		
C07C 215/00	(2006.01)		
C07C 217/00	(2006.01)		
C07C 229/00	(2006.01)		
C07D 207/06	(2006.01)		
C07D 211/92	(2006.01)		
C07D 213/18	(2006.01)		
C07D 213/20	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2003 E 03765973 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1556029**

54 Título: **Sales de tiomolibdato y sus usos**

30 Prioridad:

23.07.2002 US 202346
18.12.2002 US 434742 P
12.05.2003 US 436958
28.05.2003 US 447585

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2014

73 Titular/es:

WILSON THERAPEUTICS AB (50.0%)
Strandvägen 5B
11451 Stockholm, SE y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (50.0%)

72 Inventor/es:

TERNANSKY, ROBERT J.;
MAZAR, ANDREW;
GLADSTONE, PATRICIA L.;
COUCOUVANIS, DIMITRI;
ALLAN, AMY L.;
O'HARE, SEAN M.;
PRICE, MELLISSA L. P.;
PIRIE-SHEPHERD, STEVEN ROBERT y
DONATE, FERNANDO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 448 800 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

Sales de tiomolibdato y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a nuevos derivados de tiomolibdato, a métodos para preparar nuevos derivados de tiomolibdato, a composiciones farmacéuticas de nuevos derivados de tiomolibdato y a métodos para utilizar nuevos derivados de tiomolibdato y composiciones farmacéuticas de nuevos derivados de tiomolibdato para tratar o prevenir enfermedades asociadas con la vascularización aberrante, los trastornos del metabolismo del cobre, los trastornos neurodegenerativos, la obesidad o la desregulación de NF- κ B.

Antecedentes de la invención

10 La mayoría de los cánceres se derivan de tumores sólidos (Shockley et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1991, 617:367-382), que son clínicamente resistentes a terapias, tales como el uso de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas. La terapia antiangiogénica para el tratamiento del cáncer ha sido desarrollada a partir del reconocimiento de que los tumores sólidos necesitan de la angiogénesis (es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos) para el mantenimiento del crecimiento (Folkman, Ann. Surg., 1972, 175:409-416; Folkman, Mol. Med., 1995, 1(2):120-122; Folkman, Breast Cancer Res. Treat., 1995, 36(2):109-118; Hanahan et al., Cell, 1996, 86(3):353-364). Se ha demostrado la eficacia de la terapia antiangiogénica en modelos animales (Millauer et al., Cancer Res., 1996, 56:1615-1620; Borgstrom et al., Prostrate, 1998, 35:1-10; Benjamin et al., J. Clin. Invest., 1999, 103:159-165; Merajver et al., Proceedings of Special AACR Conference on Angiogenesis and Cancer, 1998, resumen n.º B-11, 22-24 de enero). En ausencia de angiogénesis, las capas de células internas de los tumores sólidos no se nutren de forma adecuada. Además, se ha implicado a la angiogénesis (es decir, la vascularización aberrante) en numerosas otras enfermedades (por ejemplo, enfermedad neovascular ocular, degeneración macular, artritis reumatoide, etc.). En fechas más recientes, la inhibición de la angiogénesis se ha correlacionado directamente con la pérdida de tejido adiposo y la pérdida de peso en modelos animales, lo cual sugiere que una terapia antiangiogénica puede ser útil para la prevención de la obesidad (Rupnick et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99:10730-10735).

25 Por contraste, el tejido normal no requiere de la angiogénesis excepto bajo circunstancias especiales (por ejemplo, reparación de heridas, proliferación del revestimiento interno del útero durante el ciclo menstrual, etc.). Por consiguiente, la necesidad de una angiogénesis es una diferencia significativa entre las células tumorales y el tejido normal. De forma importante, la dependencia de las células tumorales de la angiogénesis, cuando se compara con células normales, es cuantitativamente mayor que las diferencias en la replicación celular y la muerte celular entre el tejido normal y el tejido tumoral, que a menudo se aprovechan en la terapia del cáncer.

30 La angiogénesis necesita del cobre, según han demostrado numerosos estudios (Parke et al., Am. J. Pathol., 1988, 137:173-178; Raju et al., Natl. Cancer Inst., 1982, 69:1183-1188; Ziche et al., Natl. Cancer Inst., 1982, 69:475-482; Gullino, Anticancer Res., 1986, 6(2):153-158). En la técnica se han descrito intentos para prevenir la angiogénesis y, por tanto, el crecimiento tumoral en modelos animales mediante la reducción in vivo de las cantidades de cobre (Brem et al., Neurosurgery, 1990, 26:391-396; Brem et al., Am. J. Pathol., 1990, 137(5):1121-1142; Yoshida et al., Neurosurgery, 1995, 37(2):287-295). Estas estrategias incorporan quelantes de cobre y dietas bajas en cobre. En fechas más recientes, Brewer et al., solicitud internacional n.º PCT/US99/20374 han demostrado que los quelantes de cobre (por ejemplo, tetratiomolibdato) pueden ser eficaces para tratar enfermedades (por ejemplo, el crecimiento de tumores sólidos) que necesitan de la angiogénesis.

40 La publicación de solicitud internacional n.º WO 03/099223 A2, publicada el 4 de diciembre, 2003, describe compuestos de tetratiomolibdato, que incluyen las sales de tetraetilamonio, tetrapropilamonio y colina del tetratiomolibdato, y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, y también indica que el tetratiomolibdato ha sido utilizado de modo experimental para el tratamiento de la enfermedad de Wilson, y que ha sido empleado en estudios clínicos para tratar el cáncer.

45 El documento WO 00/13712 describe composiciones farmacéuticas que comprenden tetratiomolibdato de amonio para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con altos niveles de cobre y, en particular, para el tratamiento de cánceres.

50 Además de la inducción de la angiogénesis, el cobre también puede desempeñar un papel directo en el crecimiento y la supervivencia de células tumorales. Existen unos niveles altos de cobre en el plasma y en el tejido tumoral de pacientes con muchos cánceres sólidos diferentes (Chakravarty et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1984, 108:312-315). En fechas recientes se ha demostrado que el tetratiomolibdato infrarregula la expresión de NF- κ B, así como inhibe su translocación hacia el núcleo en la línea de células de cancer de mama inflamatorio SUM 149 (Pan et al., Cancer Res., 2002, 62:4854-4859). El sistema NF- κ B puede estar implicado en la mediación de la supervivencia de células tumorales y, por tanto, la infrarregulación de su expresión en células tumorales por el tetratiomolibdato sugiere un efecto directo de la quelación del cobre sobre la supervivencia del tumor.

55 Por consiguiente, son necesarios nuevos compuestos de tiomolibdato, que sean quelantes del cobre, para explorar a

fondo el potencial de los quelantes de cobre para tratar y/o prevenir la angiogénesis y para reducir la viabilidad de células tumorales. Estos nuevos compuestos de tiomolibdato pueden ser eficaces para tratar diversas enfermedades asociadas con la angiogénesis, tales como cáncer, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos u obesidad, así como para tratar enfermedades, tales como trastornos inflamatorios en los que la vía del NF- κ B esté desregulada.

Sumario de la invención

La presente invención satisface estas y otras necesidades proporcionando nuevos derivados de tiomolibdato, métodos para preparar nuevos derivados de tiomolibdato, composiciones farmacéuticas de nuevos derivados de tiomolibdato, métodos para utilizar nuevos derivados de tiomolibdato y sus composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con la vascularización aberrante, los trastornos del metabolismo del cobre, los trastornos neurodegenerativos, la obesidad o la desregulación de NF- κ B.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto según la reivindicación 1.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona los nuevos derivados de tiomolibdato para su uso en medicina. Las composiciones farmacéuticas generalmente comprenden uno o más derivados de tiomolibdato, sus hidratos o sus solvatos, y un diluyente, vehículo, excipiente y adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del diluyente, vehículo, excipiente y adyuvante dependerá, entre otros factores, de la vía de administración deseada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra el efecto del tetratiomolibdato de bis(colina) sobre la producción de células endoteliales.

La figura 2 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) no induce la apoptosis en células endoteliales.

La figura 2 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) es antiangiogénico en un ensayo de lecho corto de Matrigel.

La figura 4 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) infrarregula la secreción de IL-8 desde células endoteliales confluentes.

La figura 5 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) infrarregula la expresión de IL-8 desde monocitos activados.

La figura 6 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) provoca una disminución en los niveles plasmáticos de KC murino.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los "compuestos de la invención" se refieren a compuestos incluidos en las reivindicaciones. Los compuestos de la invención pueden identificarse por su estructura química y/o nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico entren en conflicto, la estructura química determina la identidad del compuesto. Los compuestos de la invención pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros o diastereómeros. Por consiguiente, las estructuras químicas mostradas en la presente incluyen todos los posibles enantiómeros y estereoisómeros de los compuestos ilustrados, incluyendo la forma estereoisoméricamente pura (por ejemplo, geoméricamente pura, enantioméricamente pura o diastereoméricamente pura) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas. Los compuestos de la invención también pueden existir en varias formas tautómeras. Por consiguiente, las estructuras químicas mostradas en la presente incluyen todas las posibles formas tautómeras de los compuestos ilustrados. Los compuestos de la invención también incluyen compuestos marcados isotópicamente, en los que uno o más átomos tienen una masa atómica diferente de la masa atómica que se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , etc. Los compuestos de la invención pueden existir como formas no solvatadas y como formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas, y como N-óxidos. En general, las formas hidratadas y solvatadas están dentro del alcance de la presente invención. Ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención. Además, cuando se ilustran estructuras parciales de los compuestos de la invención, debe entenderse que los paréntesis indican el punto de unión de la estructura parcial al resto de la molécula.

"Alquilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal, ramificada o cíclica saturado o insaturado obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino de origen. Los grupos alquilo típicos incluyen metilo; etilos,

tales como etanilo, etenilo, etinilo; propilos, tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo, ciclopropan-1-ilo, prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo, prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butilos, tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metilpropan-1-ilo, 2-metilpropan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metilprop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.

El término "alquilo" pretende incluir específicamente grupos que tienen cualquier grado o nivel de saturación, es decir, grupos que tienen exclusivamente enlaces carbono-carbono sencillos, grupos que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono, grupos que tienen uno o más triples enlaces carbono-carbono, y grupos que tienen mezclas de enlaces sencillos, dobles y triples carbono-carbono. Cuando se desea un nivel de saturación específico, se emplean los términos "alcanilo", "alquenilo" y "alquinilo". Preferiblemente, un grupo alquilo comprende de 1 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono, y lo más preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono.

"Alcanilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica saturado obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano de origen. Los grupos alcanilo típicos incluyen, pero no se limitan a metanilo; etanilo; propanilos, tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos, tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (sec-butilo), 2-metilpropan-1-ilo (isobutilo), 2-metilpropan-2-ilo (t-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.

"Alquenilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alqueno de origen. El grupo puede estar en la conformación cis o trans alrededor del doble enlace o enlaces. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero no se limitan a etenilo; propenilos, tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), prop-2-en-2-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo, cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos, tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc.

"Alquinilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal, ramificada o cíclica insaturado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alquino de origen. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero no se limitan a etinilo; propinilos, tales como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos, tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.

"Alquildiilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente de cadena lineal, ramificada o cíclica saturado o insaturado obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquilo de origen, o por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de un único átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquilo de origen. Los dos centros de radicales monovalentes o cada valencia del centro del radical divalente pueden formar enlaces con el mismo átomo o con átomos diferentes. Los grupos alquildiilo típicos incluyen, pero no se limitan a metandiilo; etildiilos, tales como etan-1,1-diilo, etan-1,2-diilo, eten-1,1-diilo, eten-1,2-diilo; propildiilos, tales como propan-1,1-diilo, propan-1,2-diilo, propan-2,2-diilo, propan-1,3-diilo, ciclopropan-1,1-diilo, ciclopropan-1,2-diilo, prop-1-en-1,1-diilo, prop-1-en-1,2-diilo, prop-2-en-1,2-diilo, prop-1-en-1,3-diilo, cicloprop-1-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,1-diilo, prop-1-in-1,3-diilo, etc.; butildiilos, tales como butan-1,1-diilo, butan-1,2-diilo, butan-1,3-diilo, butan-1,4-diilo, butan-2,2-diilo, 2-metilpropan-1,1-diilo, 2-metilpropan-1,2-diilo, ciclobutan-1,1-diilo, ciclobutan-1,2-diilo, ciclobutan-1,3-diilo, but-1-en-1,1-diilo, but-1-en-1,2-diilo, but-1-en-1,3-diilo, but-1-en-1,4-diilo, 2-metilprop-1-en-1,1-diilo, 2-metanilidenpropan-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,2-diilo, buta-1,3-dien-1,3-diilo, buta-1,3-dien-1,4-diilo, ciclobut-1-en-1,2-diilo, ciclobut-1-en-1,3-diilo, ciclobut-2-en-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,3-diilo, but-1-in-1,3-diilo, but-1-in-1,4-diilo, buta-1,3-diin-1,4-diilo, etc. Cuando se desea un nivel de saturación específico, se emplea la nomenclatura alcanildiilo, alquendiilo y/o alquindiilo. Preferiblemente, el grupo alquildiilo es alquildiilo(C1-C20), más preferiblemente alquildiilo(C1-C10), lo más preferiblemente alquildiilo(C1-C6). Se prefieren los grupos alcanildiilo acíclicos saturados en los que los centros de los radicales están en los carbonos terminales, por ejemplo, metandiilo (metano); etan-1,2-diilo (etano); propan-1,3-diilo (propano); butan-1,4-diilo (butano) (también denominado alquileo, definido a continuación).

"Alquileo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo alquildiilo de cadena lineal que tiene dos centros de radicales monovalentes terminales obtenidos por la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono terminales del alcano, alqueno o alquilo de cadena lineal de origen. Los grupos alquileo típicos incluyen, metano; etilenos, tales como etano, eteno, etino; propilenos, tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.; butilenos, tales como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, but[1]ino, but[2]ino, but[1,3]diino, etc.; y similares. Cuando se desea un nivel de saturación específico, se emplea la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. Preferiblemente, el grupo alquileo es alquileo(C1-C20), más preferiblemente alquileo(C1-C10), y lo más preferiblemente alquileo(C1-C6). Se prefieren los grupos alcano saturados de cadena lineal, por ejemplo, metano, etano, propano, butano.

"Acilo", por sí solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical -C(O)R₃₀, en el que R₃₀ es hidrógeno,

alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, según se definen en la presente. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a formilo, acetilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilmetilcarbonilo, benzoílo, bencilcarbonilo.

5 "Acilamino", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical -NR₃₁C(O)R₃₂, en el que R₃₁ y R₃₂ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo, arilalquilo, heteroalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, según se definen en la presente. Los ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a formilamino, acetilamino, ciclohexilcarbonilamino, ciclohexilmetilcarbonilamino, benzoilamino, bencilcarbonilamino.

10 "Alcoxi", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical -OR₃₃, en el que R₃₃ representa un grupo alquilo o cicloalquilo, según se definen en la presente. Los ejemplos representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, ciclohexiloxi.

"Alcoxicarbonilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical -C(O)OR₃₄, en el que R₃₄ representa un grupo alquilo o cicloalquilo, según se definen en la presente.

15 "Arilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical hidrocarbonado aromático monovalente obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono del sistema de anillo aromático de origen. Los grupos arilo típicos incluyen grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno. Preferiblemente, un grupo arilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, y más preferiblemente de 6 a 20

12 átomos de carbono.
"Arilalquilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, generalmente un átomo de carbono terminal o sp³, está reemplazado por un grupo arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo. Cuando se desean restos alquilo específicos, se emplea la nomenclatura arilalcanilo, arilalquenilo y/o arilalquinilo. Preferiblemente, un grupo arilalquilo es arilalquilo(C₆-C₃₀), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C₁-C₁₀) y el resto arilo es (C₆-C₂₀), más preferiblemente un grupo arilalquilo es arilalquilo(C₆-C₂₀), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C₁-C₈) y el resto arilo es (C₆-C₁₂).

30 "Cicloalquilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo cíclico saturado o insaturado. Cuando se desea un nivel de saturación específico, se emplea la nomenclatura "cicloalcanilo" o "cicloalquenilo". Los grupos cicloalquilo típicos incluye grupos derivados de ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano y similares. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es cicloalquilo(C₃-C₁₀), más preferiblemente cicloalquilo(C₃-C₇).

35 "Cicloheteroalquilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo cíclico saturado o insaturado en el que uno o más átomos de carbono (y cualquier átomo de hidrógeno asociado) están reemplazados independientemente por el mismo heteroátomo o heteroátomos diferentes. Los heteroátomos típicos para reemplazar a un átomo o átomos de carbono incluyen N, P, O, S, Si, etc. Cuando se desea un nivel específico de saturación, se emplea la nomenclatura "cicloheteroalcanilo" o "cicloheteroalquenilo". Los grupos cicloheteroalquilo típicos incluyen grupos derivados de epóxidos, azirinas, tiiranos, imidazolidina, morfolina, piperazina, piperidina, pirazolidina, pirrolidina, quinuclidina.

45 "Heteroalquilo, heteroalcanilo, heteroalquenilo, heteroalcanilo, heteroalquildiilo y heteroalquilenilo", por si solos o como parte de otro sustituyente, se refieren a grupos alquilo, alcanilo, alquenilo, alquinilo, alquildiilo y alquilenilo, respectivamente, en los que uno o más de los átomos de carbono (y cualquier átomo de hidrógeno asociado) han sido reemplazados independientemente por los mismos grupos heteroatómicos o con grupos heteroatómicos diferentes. Los grupos heteroatómicos típicos que pueden incluirse en estos grupos incluyen -O-, -S-, -O-O-, -S-S-, -O-S-, -NR₃₅R₃₆-, =N-N=, -N=N-, -N=N-NR₃₇R₃₈-, -PR₃₉-, -P(O)₂-, -POR₄₀-, -O-P(O)₂-, -SO-, -SO₂-, -SnR₄₁R₄₂- y similares, en los que R₃₅, R₃₆, R₃₇, R₃₈, R₃₉, R₄₀, R₄₁ y R₄₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, heteroalquilo, heteroalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo o heteroarilalquilo sustituido.

50 "Heteroarilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical heteroaromático monovalente obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de un sistema de anillo heteroaromático de origen. Los grupos heteroarilo típicos incluyen grupos derivados de acridina, arindol, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridiazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno.

Preferiblemente, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5-20 miembros, más preferiblemente un heteroarilo de 5-10 miembros. Los grupos heteroarilo preferidos son los derivados de tiofeno, pirrol, benzotiofeno, benzofurano, indol, piridina, quinolina, imidazol, oxazol y pirazina.

5 "Heteroarilalquilo", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, generalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está reemplazado por un grupo heteroarilo. Cuando se desean restos alquilo específicos, se emplea la nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilalquenilo y/o heteroarilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-30 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenil o alquinil del heteroarilalquilo tiene 1-10 miembros y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-20 miembros, más preferiblemente, un heteroarilalquilo de 6-20 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo tiene 1-8 miembros y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-12 miembros.

15 Un "sistema de anillo aromático de origen", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un sistema de anillo cíclico o policíclico insaturado que tiene un sistema de electrones π conjugados. Dentro de la definición del "sistema de anillo aromático de origen" se incluyen específicamente los sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, etc. Los sistemas de anillos aromáticos de origen típicos incluyen aceantrileno, acenaftileno, acenfantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiaden, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno.

20 Un "sistema de anillo heteroaromático de origen", por si solo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un sistema de anillo aromático de origen en el que uno o más átomos de carbono (y cualquier átomo de hidrógeno asociado) han sido reemplazados independientemente por el mismo heteroátomo o heteroátomos diferentes. Los heteroátomos típicos para reemplazar a los átomos de carbono incluyen N, P, O, S, Si, etc. Dentro de la definición del "sistema de anillo heteroaromático de origen" se incluyen específicamente los sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, arsindol, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. Los sistemas de anillos heteroaromáticos de origen típicos incluyen arsindol, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno.

25 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto de la invención, que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto de origen. Estas sales incluyen: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico; o formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanpropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 1,2-etandisulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto de origen es reemplazado por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo, o un ion aluminio; o se coordina con una base orgánica, tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina.

30 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto de la invención.

35 Un "paciente" incluye a seres humanos. La expresión "ser humano" y el término "paciente" se emplean de modo intercambiable en la presente.

40 "Prevenir" o "prevención" se refiere a la reducción del riesgo de adquirir una enfermedad o un trastorno (es decir, provocar que al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrolle en un paciente que puede estar expuesto o que esté predispuesto a la enfermedad pero que aún no haya sufrido o mostrado síntomas de la enfermedad).

45 Un "profármaco" se refiere a un derivado de una molécula de fármaco que requiere una transformación dentro del cuerpo para liberar el fármaco activo. Los profármacos, con frecuencia pero no necesariamente, son farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en el fármaco de origen. Un fármaco que contiene hidroxilo puede convertirse, por ejemplo, en un profármaco de sulfonato, éster o carbonato, que puede ser hidrolizado in vivo para proporcionar el compuesto de hidroxilo. Un fármaco que contiene amino puede convertirse, por ejemplo, en un

5 profármaco de carbamato, amida, enamina, imina, N-fosfonilo, N-fosforilo o N-sulfenilo, que puede ser hidrolizado in vivo para proporcionar el compuesto de amino. Un fármaco de ácido carboxílico puede convertirse en un profármaco de éster (que incluye silil ésteres y tioésteres), amida o hidrazida, que puede ser hidrolizado in vivo para proporcionar el compuesto de ácido carboxílico. Los profármacos para fármacos con grupos funcionales diferentes a los listados anteriormente son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Un "prorresto" se refiere a una forma de proteger a un grupo que, cuando se emplea para ocultar un grupo funcional dentro de una molécula de fármaco, convierte el fármaco en un profármaco. Generalmente, el prorresto estará unido al fármaco a través de un enlace o enlaces que se rompen in vivo por medios enzimáticos o no enzimáticos.

10 Un "grupo protector" se refiere a un agrupamiento de átomos que, cuando se unen a un grupo funcional reactivo en una molécula, ocultan, reducen o previenen la reactividad del grupo funcional. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en Green et al., "Protective Groups in Organic Chemistry" (Wiley, 2ª ed. 1991), y Harrison et al., "Compendium of Synthetic Organic Methods", vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de amino representativos incluyen formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo ("CBZ"), terc-
15 butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsililetansulfonilo ("SES"), tritilo y grupos tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("FMOC"), nitroveratrilocarbonilo ("NVOC") y similares. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero no se limitan a los grupos en los que el grupo hidroxilo está acilado o alquilado, tales como bencilo, y tritilo éteres, así como alquil éteres, tetrahidropiridil éteres, trialkilsilil éteres y alil éteres.

20 "Sustituido" se refiere a un grupo en el que uno o más átomos de hidrógeno están independientemente reemplazados por un sustituyente o sustituyentes iguales o diferentes. Los sustituyentes típicos incluyen -M, -R60, -O-, =O, -OR60, -SR60, -S-, =S, -NR60R61, =NR60, -CF3, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO2, =N2, -N3, -S(O)2O-, -S(O)2OH, -S(O)2R60, -OS(O)2O-, -OS(O)2R60, -P(O)(O-)2, -P(O)(OR60)(O-), -OP(O)(OR60)(OR61), -C(O)R60, -C(S)R60, -C(O)OR60, -C(O)NR60R61, -C(O)O-, -C(S)OR60, -NR62C(O)NR60R61, -NR62C(S)NR60R61, -NR62C(NR63)NR60R61 y -C(NR62)NR60R61, en los que M es independientemente un halógeno; R60, R61, R62 y
25 R63 son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, u opcionalmente R60 y R61, junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido; y R64 y R65 son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido, u opcionalmente R64 y R65, junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo cicloheteroalquilo o cicloheteroalquilo sustituido. Preferiblemente, los sustituyentes incluyen -M, -R60, -O-, =O, -OR60, -SR60, -S-, =S, -NR60R61, =NR60, -CF3, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO2, =N2, -N3, -S(O)2R60, -OS(O)2O-, -OS(O)2R60, -P(O)(O-)2, -P(O)(OR60)(O-), -OP(O)(OR60)(OR61), -C(O)R60, -C(S)R60, -C(O)OR60, -C(O)NR60R61, -C(O)O-, -NR62C(O)NR60R61, más preferiblemente -M, -R60, =O, -OR60, -SR60, -NR60R61, -CF3, -CN, -NO2, -S(O)2R60, -P(O)(OR60)(O-), -OP(O)(OR60)(OR61), -C(O)R60, -C(O)OR60, -C(O)NR60R61, -C(O)O-,
30 lo más preferiblemente -M, -R60, =O, -OR60, -SR60, -NR60R61, -CF3, -CN, -NO2, -S(O)2R60, -OP(O)(OR60)(OR61), -C(O)R60, -C(O)OR60, -C(O)O-, en los que R60, R61 y R62 son como se definió anteriormente.

40 "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o el trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el paciente. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a inhibir la enfermedad o el trastorno, de modo físico (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológico (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar la
45 aparición de la enfermedad o el trastorno.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para realizar dicho tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del paciente que se va a tratar.

50 A continuación se aludirá en detalle a las realizaciones preferidas de la invención.

Compuestos de la invención

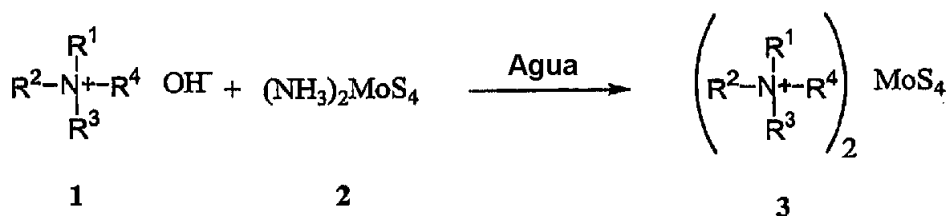
En una primera realización, los compuestos de la invención incluyen un compuesto de tetratiomolibdato, o su solvato o su hidrato, seleccionado del grupo que consiste en tetratiomolibdato de propan-1,3-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(1-etil-3-metil-1H-imidazolilo); tetratiomolibdato de bis(trimetilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(tetrapropilamonio); tetratiomolibdato de bis(colina); tetratiomolibdato de bis(trietilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(metiltriethylamonio); tetratiomolibdato de bis(1,1-dimetilpirrolidinio); tetratiomolibdato de bis(trimetilbencilamonio); tetratiomolibdato de pentan-1,5-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(viniltrimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(ciclopropilmetiltrimetilamonio); tetratiomolibdato de hexan-1,6-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(acetilcolina); tetratiomolibdato de bis(1,4-dimetilpiridinio);

tetratiomolibdato de etilen-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de butan-1,4-bis(trimetilamonio).

Síntesis de los compuestos de la invención

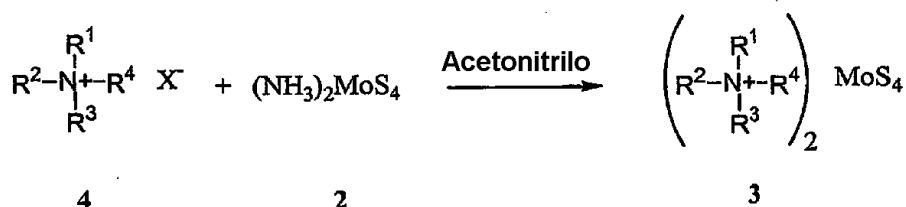
Los compuestos de la invención pueden obtenerse a través de métodos sintéticos convencionales ilustrados en los esquemas 1 y 2. Los materiales de partida útiles para preparar compuestos de la invención y sus intermedios están disponibles en el mercado o pueden prepararse mediante métodos sintéticos muy conocidos. Por ejemplo, el tiomolibdato de amonio puede adquirirse de suministradores químicos muy conocidos (por ejemplo, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI). Las sales de amonio sustituidas (por ejemplo, hidróxidos de amonio y haluros de amonio) pueden adquirirse de fuentes comerciales o pueden sintetizarse con facilidad utilizando métodos sintéticos muy conocidos (Harrison et al., "Compendium of Synthetic Organic Methods", vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996); "Beilstein Handbook of Organic Chemistry", Beilstein Institute of Organic Chemistry, Frankfurt, Alemania; Feiser et al., "Reagents for Organic Synthesis", volúmenes 1-17, Wiley Interscience; Trost et al., "Comprehensive Organic Synthesis", Pergamon Press, 1991; "Theilheimer's Synthetic Methods of Organic Chemistry", volúmenes 1-45, Karger, 1991; March, "Advanced Organic Chemistry", Wiley Interscience, 1991; Larock "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers, 1989; Paquette, "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1995). Otros métodos para la síntesis de los compuestos descritos en la presente y/o materiales de partida están descritos en la técnica o serán evidentes para los expertos en la técnica. Por consiguiente, los métodos presentados en los esquemas 1 y 2 de la presente son ilustrativos y no exhaustivos.

Esquema 1



Tal como se muestra en el anterior esquema 1, la adición de un hidróxido de amonio cuaternario al tiomolibdato en presencia de agua conduce a un intercambio catiónico (el equilibrio hacia el producto está dirigido por la eliminación del amoniaco volátil) para proporcionar el derivado de tiomolibdato deseado.

Esquema 2



Tal como se muestra en el anterior esquema 1, la adición de un haluro de amonio cuaternario al tiomolibdato en presencia de acetonitrilo conduce a un intercambio catiónico (el equilibrio hacia el producto está dirigido por la formación del haluro de amonio) para proporcionar el derivado de tiomolibdato deseado.

Pueden prepararse derivados de tiomolibdato en los que los contraiones de amonio sean diferentes a partir de los compuestos 3 tratando con un equivalente de otro contraión de amonio. Se espera que esta reacción produzca una mezcla estadística de productos.

Ensayos para los compuestos de la invención

Los expertos en la técnica apreciarán que los ensayos in vitro e in vivo útiles para medir la actividad de los compuestos de la invención descritos en la presente son ilustrativo y no exhaustivos.

Ensayo para la migración de células endoteliales

Para la migración de células endoteliales, se revistieron transpocillos con colágeno de tipo I (50 µg/ml) añadiendo 200 µl de disolución de colágeno por transpocillo, y después incubando durante la noche a 37 °C. Los transpocillos se ensamblaron en una placa de 24 pocillos y se añade un quimioatrayente (por ejemplo, FGF-2) a la cámara inferior en un volumen total de 0,8 ml de medio. Células endoteliales, tales como células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) que han sido desprendidas de un cultivo en monocapa utilizando tripsina, se diluyen hasta una concentración final de aproximadamente 106 células/ml con medio sin suero y se añaden 0,2 ml de esta suspensión

celular a la cámara superior de cada transpocillo. Se añaden inhibidores a la cámara inferior y superior, y se deja que se desarrolle la migración durante 5 hr en una atmósfera humidificada a 37 °C. Los transpocillos se retiran de la placa teñida utilizando DiffQuik®. Las células que no migran se retiran de la cámara superior raspando con una torunda de algodón, y las membranas se desprenden, se montan en portaobjetos, y se cuentan bajo un campo de alta potencia (400x) para determinar el número de células que han migrado.

Ensayo biológico de la actividad antiinvasiva

Los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la invención se ensayan para su capacidad antiinvasiva. Se ensaya la capacidad de las células, tales como células endoteliales o células tumorales (por ejemplo, carcinoma prostático humano PC-3) para invadir a través de una membrana basal reconstituida (Matrigel®) en un ensayo conocido como ensayo de invasión de Matrigel® (Kleinman et al., *Biochemistry*, 1986, 25: 312-318; Parish et al., *Int. J. Cancer*, 1992, 52:378-383). El Matrigel® es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, sulfato de heparano, proteoglicanos tales como perlecano, que localizan y se unen al bFGF, vitronectina, así como factor del crecimiento transformante- β (TGF- β), activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno tisular (tPA), y la serpina conocida como inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) (Chambers et al., *Canc. Res.*, 1995, 55:1578-1585). Los resultados obtenidos en este ensayo para los compuestos que se dirigen a enzimas o receptores extracelulares generalmente son predictivos de la eficacia de estos compuesto in vivo (Rabhani et al., 1995, *Int. J. Cancer*, 63: 840-845).

Estos ensayos emplean insertos de cultivo de tejidos de transpocillos. Las células invasivas se definen como células que son capaces de atravesar el Matrigel® y el aspecto superior de una membrana de policarbonato y adherirse a la parte inferior de la membrana. Los transpocillos (Costar) que contienen membranas de policarbonato (8,0 μ m de tamaño de poro) se revisten con Matrigel® (Collaborative Research), que ha sido diluido en PBS estéril hasta una concentración final de 75 μ g/ml (60 μ l de Matrigel® diluido por inserto), y se coloca en los pocillos de una placa de 24 pocillos. Las membranas se dejan secar durante la noche en una cabina de seguridad biológica, y después se rehidratan añadiendo 100 μ l de DMEM que contiene antibióticos durante 1 hora en una mesa de agitación. El DMEM se retira de cada inserto por aspiración y se añaden 0,8 ml de DMEM/FBS al 10%/antibióticos a cada pocillo de la placa de 24 pocillos de modo que rodee el exterior del transpocillo ("cámara inferior"). Se añade DMEM/antibióticos fresco (100 μ l), Glu-plasminógeno humano (5 μ g/ml) y los inhibidores que se van a ensayar al interior de la parte superior del transpocillo ("cámara superior"). Las células que se van a tratar se tripsinizan y se resuspenden en DMEM/antibióticos, después se añaden a la cámara superior del transpocillo a una concentración final de 800.000 células/ml. El volumen final de la cámara superior se ajusta a 200 μ l. La placa ensamblada después se incuba en una atmósfera de CO₂ al 5% húmeda durante 72 horas. Después de la incubación, las células se fijan y se tiñen utilizando DiffQuik® (tinción de Giemsa) y después la cámara superior se raspa utilizando una torunda de algodón para eliminar el Matrigel® y las células que no han realizado la invasión a través de la membrana. Las membranas se desprenden del transpocillo utilizando una cuchilla X-acto®, se montan sobre portaobjetos utilizando Permount® y cubreobjetos, y después se cuentan bajo un campo de alta potencia (400x). Se determina la media de las células invasoras a partir de 5-10 campos contados y se representa gráficamente como una función de la concentración del inhibidor.

Ensayos de formación de tubos de la actividad antiangiogénica

Los compuestos de la invención pueden ensayarse para la actividad antiangiogénica en uno de dos sistemas de ensayo diferentes in vitro. Células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) o células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC), que puede prepararse u obtenerse en el mercado, se mezclan a una concentración de 2×10^5 células/ml con fibrinógeno (5 mg/ml en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en una proporción 1:1 (en v/v). Se añade trombina (5 unidades/ml de concentración final) y la mezcla se traslada inmediatamente a una placa de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo). Se deja que se forme el gel de fibrina y después se añaden VEGF y bFGF a los pocillos (cada uno a una concentración final de 5 ng/ml), junto con el compuesto de ensayo. Las células se incuban a 37 °C en CO₂ al 5% durante 4 días, tras lo cual se cuentan las células en cada pocillo y se clasifican como redondeadas, alargadas sin ramificaciones, alargadas con una ramificación, o alargadas con 2 o más ramificaciones. Los resultados se expresan como la media de 5 pocillos diferentes para cada concentración de compuesto. Generalmente, en presencia de inhibidores angiogénicos, las células permanecen redondeadas o forman tubos indiferenciados (por ejemplo, 0 o 1 ramificación). En la técnica se reconoce que este ensayo es predictivo de la eficacia angiogénica (o antiangiogénica) in vivo (Min et al., *Cancer Res.*, 1996, 56: 2428-2433).

En un ensayo alternativo, se observa la formación de tubos de células endoteliales cuando se cultivan células endoteliales en Matrigel® (Schnaper et al., *J. Cell. Physiol.*, 1995, 165:107-118). Se trasladan células endoteliales (1×10^4 células/pocillo) a placas de 24 pocillos revestidas con Matrigel® y se cuantifica la formación de tubos después de 48 horas. Se ensayan los inhibidores mediante su adición al mismo tiempo que las células endoteliales o en diversos momentos después. La formación de tubos también puede estimularse añadiendo factores del crecimiento angiogénicos, tales como bFGF o VEGF, agentes de estimulación de la diferenciación (por ejemplo, PMA) o sus combinaciones.

Este ensayo modela la angiogénesis presentando un tipo particular de membrana basal a las células endoteliales, concretamente la capa de matriz que previsiblemente se encontrarán en primer lugar las células endoteliales en diferenciación y migrantes. Además de factores del crecimiento unidos, los componentes de la matriz que se encuentran en el Matrigel® (y las membranas basales in situ) o sus productos proteolíticos también pueden ser

5

10 Ensayos de inhibición de la proliferación

Puede determinarse la capacidad de los compuestos de la invención para inhibir la proliferación de células endoteliales en un formato de 96 pocillos. Se emplea colágeno de tipo I (gelatina) para revestir los pocillos de la placa (0,1-1 mg/ml en PBS, 0,1 ml por pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente). Después de lavar la placa (3x con PBS), se cultivan 3-6.000 células por pocillo y se dejan que prendan durante 4 horas (37 °C/CO₂ al 5%) en medio de crecimiento endotelial ("Endothelial Growth Medium", EGF, Clonetics) o medio M199 que contiene FBS al 0,1-2%. Los medios y las células no unidas se retiran al final de las 4 horas y se añade medio fresco que contiene bFGF (1-10 ng/ml) o VEGF (1-10 ng/ml) a cada pocillo. Se añaden los compuestos que se van a ensayar y la placa se deja en incubación (37 °C/CO₂ al 5%) durante 24-48 h. Se añade MTS (Promega) a cada pocillo y se deja en incubación durante 1-4 horas. Después se mide la absorbancia a 490 nm, que es proporcional al número de células, para determinar las diferencias en la proliferación entre los pocillos control y los que contienen compuestos de ensayo. Puede disponerse un sistema de ensayo similar con células tumorales adherentes cultivadas. Sin embargo, el colágeno puede omitirse en este formato. Se cultivan células tumorales (por ejemplo, 3.000-10.000/pocillo) y se deja que prenda durante la noche. Después se añade medio sin suero a los pocillos, y las células se sincronizan durante 24 hr. Entonces se añade medio que contiene FBS al 10% a cada pocillo para estimular la proliferación. Los compuestos que se van a ensayar se incluyen en algunos de los pocillos. Después de 24 hr se añade MTS a la placa y el ensayo se revela y se lee como se ha descrito anteriormente. También puede emplearse una metodología similar para evaluar los efectos de los compuestos de la invención sobre la proliferación de otros tipos celulares, que incluyen células tumorales, excepto que no se empleará VEGF y bFGF para estimular el crecimiento de las células. Si existen pruebas de actividad antiproliferativa, la inducción de la apoptosis puede medirse utilizando TumorTACS (Genzyme).

15

20

25

30

Ensayos de citotoxicidad

Pueden determinarse los efectos citotóxicos de los compuestos de la invención para diversos tipos celulares, que incluyen células tumorales, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos.

Un ensayo típico implica cultivar células a una densidad de 5-10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. El compuesto que se va a ensayar se añade a una diversidad de concentraciones y se deja en incubación con las células durante 24 horas. Las células se lavan 3x con medio. Para los ensayos de citotoxicidad (que miden la lisis celular) se emplea un kit de citotoxicidad de 96 pocillos de Promega.

35

Modelo de angiogénesis corneal

El protocolo utilizado es fundamentalmente idéntico al descrito por Volpert et al., J. Clin. Invest., 1996, 98:671-679. Brevemente, ratas Fischer hembra (120-140 gr) se anestesian y se implantan gránulos (5 µl) formados por Hydrón®, bFGF (150 nM) y los compuestos que se van a ensayar, en pequeñas incisiones realizadas en la córnea a 1,0-1,5 mm del limbo. Se evalúa la neovascularización a los 5 y 7 días después de la implantación. En el día 7, los animales se anestesian y se infunden con un tinte, tal como carbón coloidal, para teñir los vasos. Después los animales se eutanizan, las córneas se fijan con formaldehído, y las córneas se aplanan y se fotografían para evaluar el grado de neovascularización. Los neovasos pueden cuantificarse mediante la formación de imágenes del área de vasos total o su longitud, o simplemente contando los vasos.

40

45

Ensayo de lecho corto de Matrigel®

Este ensayo se realiza fundamentalmente como se describe en Passaniti et al., Lab Invest., 1992, 67:519-528. Se mezcla Matrigel® enfriado en hielo (por ejemplo, 500 µl) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) con heparina (por ejemplo 50 µg/ml), FGF-2 (por ejemplo, 400 ng/ml) y el compuesto que se va a ensayar. En algunos ensayos, el bFGF puede sustituirse por células tumorales como estímulo angiogénico. La mezcla de Matrigel® se inyecta por vía subcutánea en ratones atímicos "nude" de 4-8 semanas de edad en sitios cercanos a la línea media abdominal, preferiblemente 3 inyecciones por ratón. El Matrigel® inyectado forma un gel sólido palpable. Los sitios de la inyección se eligen de modo que cada animal recibe un lecho corto de control positivo (tal como FGF-2 + heparina), un lecho corto de control negativo (por ejemplo, tampón + heparina) y un lecho corto que incluye el compuesto que se va a ensayar para su efecto sobre la angiogénesis (por ejemplo, FGF-2 + heparina + compuesto). Todos los tratamientos se realizan preferiblemente por triplicado. Los animales se sacrifican mediante dislocación cervical aproximadamente 7 días después de la inyección o en otro momento que pueda ser óptimo para observar la

50

55

angiogénesis. La piel del ratón se desprende a lo largo de la línea media abdominal, y los lechos cortos de Matrigel® se recuperan y se escanean inmediatamente a alta resolución. Después los lechos cortos se dispersan en agua y se incuban a 37 °C durante la noche. Se determinan los niveles de hemoglobina (Hb) utilizando una disolución de Drabkin (por ejemplo, obtenida en Sigma) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de Hb en el lecho corto es una medición indirecta de la angiogénesis, puesto que refleja la cantidad de sangre en la muestra. Además, o como alternativa, a los animales se les puede inyectar antes del sacrificio 0,1 ml de tampón (preferiblemente PBS) que contenga un dextrano de alto peso molecular con el que está conjugado un fluoróforo. La cantidad de fluorescencia en el lecho corto dispersado, determinada de modo fluorométrico, también sirve como una medición de la angiogénesis en el lecho corto. También puede utilizarse una tinción con un mAb anti-CD31 (CD31 es una molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas o PECAM) para confirmar la formación de neovasos y la densidad de los microvasos en los lechos cortos.

Ensayo de la angiogénesis de la membrana corioalantoica de pollitos (CAM)

Este ensayo se realiza fundamentalmente como se describe en Nguyen et al., *Microvascular Res.*, 1994, 47:31-40. Una malla que contiene factores angiogénicos (bFGF) o células tumorales más inhibidores se coloca sobre la CAM de un embrión de pollo de 8 días de edad, y se observa la CAM durante 3-9 días después de la implantación de la muestra. Se cuantifica la angiogénesis determinando el porcentaje de cuadrados en la malla que contienen vasos sanguíneos.

Evaluación in vivo de la inhibición de la angiogénesis y los efectos antitumorales utilizando el ensayo del lecho corto de Matrigel® con células tumorales

En este ensayo, células tumorales, por ejemplo, 1-5 x 10⁶ células de carcinoma de pulmón de Lewis 3LL o la línea de células de prostata de rata MatLyLu, se mezclan con Matrigel® y después se inyectan en el flanco de un ratón siguiendo el protocolo descrito en la anterior sección 5.4.7. Puede observarse una masa de células tumorales y una poderosa respuesta angiogénica en los lechos cortos después de aproximadamente 5 a 7 días. La acción antitumoral y antiangiogénica de un compuesto en un entorno real de tumor puede evaluarse incluyéndolo en el lecho corto. Entonces se realiza la medición del peso tumoral, los niveles de Hb o los niveles de fluorescencia (de un dextrano conjugado con un fluoróforo inyectado antes del sacrificio). Para medir la Hb o la fluorescencia, los lechos cortos primero se homogeneizan con un homogeneizador de tejidos.

Modelo de xenoinjerto del crecimiento de tumores subcutáneos

Se inoculan ratones atímicos con células MDA-MB-231 (carcinoma de mama humano) y Matrigel® (1 x 10⁶ células en 0,2 ml) por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales. Los tumores se estadifican hasta 200 mm³ y después se inicia el tratamiento con un compuesto de ensayo. Se obtienen los volúmenes tumorales cada día alterno y los animales se sacrifican después de 2 semanas de tratamiento. Los tumores se extirpan, se pesan y se introducen en parafina. Las secciones histológicas de los tumores se analizan mediante tinción de H y E, anti-CD31, Ki-67, TUNEL y CD68.

También pueden utilizarse otras líneas de células tumorales humanas que incluyen, pero no se limitan a PC-3, CWR22R, SK-OV-3, A2780, A549, HCT116, HT29, para ensayar la actividad antitumoral de los compuestos de la invención de una manera similar.

Modelo de xenoinjerto de la metástasis

Los compuestos de la invención también pueden ensayarse para la inhibición de la metástasis tardía utilizando un modelo de metástasis experimental (Crowley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 5021-5025). La metástasis tardía implica las etapas de unión y extravasación de células tumorales, la invasión local, el sembrado, la proliferación y la angiogénesis. Se inoculan en ratones atímicos células de carcinoma prostático humano (PC-3) transfectadas con un gen indicador, preferiblemente el gen de la proteína fluorescente verde (GFP), pero como alternativa con un gen que codifica las enzimas cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa o LacZ. Esta estrategia permite la utilización de cualquiera de estos marcadores (detección de la fluorescencia de GFP o detección colorimétrica histoquímica de la actividad enzimática) para seguir el destino de estas células.

Las células se inyectan, preferiblemente por vía intravenosa, y se identifican las metástasis después de aproximadamente 14 días, en particular en los pulmones pero también en los nódulos linfáticos regionales, los fémures y el cerebro. Esto imita el tropismo de órganos de las metástasis naturales en el cáncer de próstata humano. Por ejemplo, se inyectan células PC-3 que expresan GFP (1 x 10⁶ células por ratón) por vía intravenosa en las venas de la cola de ratones atímicos ("nude", nu/nu). Los animales se tratan con una composición de ensayo a 100 µg/animal/día administrada q.d. IP. Se visualizan los focos y las células metastásicas individuales y se cuantifican mediante histoquímica de microscopía de fluorescencia o de microscopía óptica, o triturando el tejido y realizando un ensayo colorimétrico cuantitativo del marcador detectable.

Inhibición de la metástasis espontánea in vivo mediante HPRG y derivados funcionales

El sistema de cáncer de mama singeneico de rata (Xing et al., Int. J. Cancer, 67:423-429 (1996)) emplea células de cáncer de mama de rata Mat BIII. Las células tumorales, por ejemplo aproximadamente 106 suspendidas en 0,1 ml de PBS, se inoculan en las almohadillas de grasa mamarias de ratas Fisher hembra. En el momento de la inoculación se implanta por vía intraperitoneal una minibomba osmótica Alza de 14 días para dispensar el compuesto de ensayo. El compuesto se disuelve en PBS (por ejemplo, disolución madre de 200 mM), se esteriliza mediante filtración, y se coloca en la minibomba para lograr una velocidad de liberación de aproximadamente 4 mg/kg/día. Los animales control reciben vehículo (PBS) solo o un péptido control con vehículo en la minibomba. Los animales se sacrifican aproximadamente en el día 14.

- 5
- 10 También pueden utilizarse otros modelos de metástasis experimental para evaluar los compuestos de la invención. Estos modelos utilizarán las líneas de células tumorales humanas descritas anteriormente inyectadas por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón atómico. Generalmente, estos ratones son sacrificados 28 días después de la inoculación de las células tumorales y se evalúan sus pulmones para la presencia de metástasis.

Carcinoma de pulmón de Lewis 3LL: crecimiento de un tumor primario

- 15 Esta línea tumoral surgió espontáneamente en 1951 como un carcinoma de pulmón en un ratón C57BL/6 (Cancer Res., 1955, 15:39; véase también Malave et al., J. Nat'l. Canc. Inst., 1979, 62:83-88). Se propaga por transferencia en ratones C57BL/6 mediante inoculación subcutánea y se ensaya en ratones C57BL/6xDBA/2 F1 semiallogeneicos o en ratones C3H allogeneicos. Generalmente, se emplean seis animales por grupo para el implante subcutáneo, o diez para el implante intramuscular. El tumor puede implantarse mediante una inoculación subcutánea como un fragmento de 2-4 mm, o implantarse por vía intramuscular o implantarse por vía subcutánea como un inóculo de células suspendidas de aproximadamente 0,5-2 x 10⁶ células. El tratamiento comienza 24 horas después del implante o se retrasa hasta que pueda palpase un tumor de un tamaño específico (habitualmente de aproximadamente 400 mg). El compuesto de ensayo se administra IP diariamente durante 11 días.

- 20
- 25 Se realiza un seguimiento de los animales mediante el pesado, la palpación y la medición del tamaño de los tumores. El peso típico del tumor en receptores control no tratados en el día 12 después de la inoculación intramuscular es de 500-2500 mg. El tiempo de supervivencia medio típico es de 18-28 días. Se emplea un control positivo, por ejemplo, ciclofosfamida a 20 mg/kg/inyección diarios en los días 1-11. Los resultados computados incluyen la media del peso del animal, el tamaño del tumor, el peso del tumor, y el tiempo de supervivencia. Para confirmar la actividad terapéutica, la composición de ensayo debería ensayarse en dos ensayos de múltiples dosis.

- 30 Carcinoma de pulmón de Lewis 3LL: modelo de crecimiento primario y metástasis espontánea

- Este modelo ha sido utilizado por una serie de investigadores (Gorelik et al., 1980, J. Nat'l. Canc. Inst., 65:1257-1264; Gorelik et al., 1980, Rec. Results Canc. Res., 75:20-28; Isakov et al., Invasion Metas., 1982, 2:12-32; Talmadge et al., J. Nat'l. Canc. Inst., 1982, 69:975-980; Hilgard et al., Br. J. Cancer, 1977, 35:78-86). Los ratones de ensayo son ratones C57BL/6 macho, de 2-3 meses de edad. Después de la implantación subcutánea, intramuscular o dentro de la almohadilla de la pata, este tumor produce metástasis, preferentemente en los pulmones. Con algunas líneas del tumor, el tumor primario ejerce sus efectos antimetastásicos y primero debe extirparse antes del estudio de la fase metastásica (patente de EEUU n.º 5.639.725).

- 35
- 40 Se preparan suspensiones de células individuales a partir de tumores sólidos tratando el tejido tumoral triturado con una disolución de tripsina al 0,3%. Las células se lavan 3 veces con PBS (pH 7,4) y se suspenden en PBS. La viabilidad de las células 3LL preparadas de esta manera es generalmente de aproximadamente 95-99% (por exclusión de tinte de azul de tripano). Se inyectan células tumorales viables (3 x 10⁴-5 x 10⁶) suspendidas en 0,05 ml de PBS, por vía subcutánea en la región dorsal o en una almohadilla de la pata trasera de ratones C57BL/6. Aparecen tumores visibles 3-4 días después de la inyección subcutánea dorsal de 10⁶ células. Se mide el día de aparición del tumor y los diámetros de los tumores establecidos con un calibrador cada dos días.

- 45 El tratamiento se administra como una o dos dosis del péptido o derivado semanales. En otra realización, el péptido se administra mediante una minibomba osmótica.

- En los experimentos que implican la extirpación de tumores dorsales, cuando los tumores alcanzan un tamaño de aproximadamente 1500 mm³, los ratones se aleatorizan en dos grupos: (1) tumores primarios completamente extirpados; o (2) se realiza una cirugía simulada y el tumor se deja intacto. Aunque los tumores de 500-3000 mm³ inhiben el crecimiento de metástasis, el tamaño mayor del tumor primario que puede extirparse con una alta supervivencia y sin recrecimiento local es de 1500 mm³. Después de 21 días, todos los ratos se sacrifican y se les realiza una autopsia.

- 50
- 55 Se retiran los pulmones y se pesan. Los pulmones se fijan en disolución de Bouin y se registra el número de metástasis visibles. También se miden los diámetros de las metástasis utilizando un estereoscopio binocular equipado con un ocular que contiene un micrómetro con un aumento de 8x. Basándose en los diámetros registrados es posible calcular el volumen de cada metástasis. Para determinar el volumen total de las metástasis por pulmón, se multiplica el número medio de metástasis visibles por el volumen medio de las metástasis. Para determinar

también el crecimiento metastásico, es posible medir la incorporación de ^{125}I dUrd en las células pulmonares (Thakur et al., J. Lab. Clin. Med., 1977, 89:217-228). Diez días después de la amputación de los tumores se inoculan 25 μg de fluorodesoxiuridina en el peritoneo de los ratones que portan tumores (y, si se emplean, de los ratones con tumores extirpados). Después de 30 min, los ratones reciben 1 μCi de ^{125}I dUrd (yododesoxiuridina). Un día después, los pulmones y los bazo se retiran y se pesan, y se mide el grado de incorporación de ^{125}I dUrd utilizando un contador gamma.

En los ratones con tumores en las almohadillas de las patas, cuando los tumores alcanzan un diámetro de aproximadamente 8-10 mm, los ratones se aleatorizan en dos grupos: (1) las patas con tumores se amputan después de una ligadura por encima de las articulaciones de la rodilla; o (2) los ratones se dejan intactos como controles que portan tumores no amputados (la amputación de una pata sin tumores en un ratón que porta tumores no tiene un efecto conocido sobre las posteriores metástasis, excluyendo los posibles efectos de la anestesia, el estrés o la cirugía). Los ratones se sacrifican 10-14 días después de la amputación. Las metástasis se evalúan según se describió anteriormente.

Usos terapéuticos

Según la invención, un compuesto de la invención y/o una composición farmacéutica de este, se administra a un paciente, preferiblemente un ser humano, que padece una enfermedad que se caracteriza por una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, obesidad, o desregulación de NF- κ B. La vascularización aberrante incluye la neovascularización anómala, tal como la formación de nuevos vasos sanguíneos, vasos sanguíneos más grandes, vasos sanguíneos más ramificados y cualquier otro mecanismo que conduzca a una mayor capacidad de transporte de la sangre hacia un tejido o sitio enfermo.

Las enfermedades caracterizadas por una vascularización aberrante incluyen, pero no se limitan a cáncer (por ejemplo, cualquier tumor vascularizado, preferiblemente un tumor sólido, que incluye carcinomas de pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículo, hígado, parótida, tracto biliar, colon, recto, cuello del útero, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroide, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas microcíticos, melanomas, gliomas, neuroblastomas, sarcomas (por ejemplo, angiosarcomas, condrosarcomas)), artritis, diabetes, arteriosclerosis, malformaciones arteriovenosas, neovascularización de injertos corneales, curación de heridas retrasada, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, granulaciones, quemaduras, articulaciones hemofílicas, artritis reumatoide, cicatrices hipertróficas, glaucoma neovascular, fracturas sin unión, síndrome de Osier Weber, psoriasis, granuloma, fibroplasia retrolental, pterigio, escleroderma, tracoma, adhesiones vasculares, neovascularización ocular, enfermedades parasitarias, hipertrofia tras una cirugía, inhibición del crecimiento del cabello, degeneración macular (que incluye de tipo húmedo y seco), artritis reumatoide, y osteoartritis. En una realización, las enfermedades caracterizadas por una vascularización aberrante son cáncer, degeneración macular y artritis reumatoide.

Además, según la invención, un compuesto de fórmula estructural (I) y/o una composición farmacéutica de este, puede administrarse a un paciente, preferiblemente un ser humano, que padece una enfermedad asociada con trastornos del metabolismo del cobre (por ejemplo, enfermedad de Wilson) para tratar dicha enfermedad.

Además, según la invención, un compuesto de fórmula estructural (I) y/o una composición farmacéutica de este, puede administrarse a un paciente, preferiblemente un ser humano, para tratar la obesidad. Los compuestos de fórmula estructural (I) también pueden utilizarse para reducir los niveles de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , IL-8, etc.) y del inhibidor del activador de plasminógeno, que pueden estar asociados con la angiogénesis y la obesidad (Loskutoff et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 2000, 902:272-281; Pan et al., Cancer Res., 2002, 62:4854-4859; Hanada et al., Cytokine Growth Factor Rev., 2002, 13: 413-421; Chen et al., Science, 2002, 296:1634-1635; Miyake et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 59:18-28; Koch et al., Science, 1992, 258:1798-801; Osawa et al., Infect. Immun., 2002, 70:6294-6301; Bajou et al., Nat. Med., 1998, 4, 923-928).

Además, según la invención, un compuesto de la invención y/o una composición farmacéutica de este, puede administrarse a un paciente, preferiblemente un ser humano, que padece un trastorno neurodegenerativo, para tratar el trastorno neurodegenerativo. En la técnica se ha indicado que unos niveles elevados de cobre median en la patobiología de diversos trastornos neurodegenerativos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedades de priones (Llanos et al., DNA Cell Biol., 2002, 21: 259-270; Carri et al., Funct. Neurol., 2001, 16:181-188; Perry et al., CNS Drugs, 2002, 16:339-352; Kowalik-Jankowska et al., Environ Health Perspect, 2002, 5: 869-870; Maynard et al., J. Biol. Chem., 2002, septiembre, 4; Gnjec et al., Front Biosci., 2002, 16-23; Strausak et al., Brain Res. Bull., 2001, 55: 175-185; Brown, Brain Res. Bull., 2001, 55:165-173; Brown, Biochem. Soc. Trans., 2002, 30:742-745).

Además, según la invención, un compuesto de la invención y/o una composición farmacéutica de este, puede administrarse a un paciente, preferiblemente un ser humano, para tratar enfermedades que se caracterizan por una actividad desregulada de NF- κ B o una inflamación desregulada de la respuesta inflamatoria.

Además, en ciertas realizaciones los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas se administran a un paciente, preferiblemente un ser humano, como una medida preventiva contra diversas

5 enfermedades o trastornos que se caracterizan por una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, obesidad, o desregulación de NF- κ B. Por consiguiente, los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para la prevención de una enfermedad o un trastorno y, al mismo tiempo, tratar otro (por ejemplo, prevenir la enfermedad de Wilson o de Alzheimer mientras se trata un cáncer).

10 La idoneidad de los compuestos de la invención y/o las composiciones farmacéuticas de compuestos de la invención para tratar o prevenir diversas enfermedades o trastornos que se caracterizan por una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, obesidad, o desregulación de NF- κ B puede determinarse mediante los métodos descritos en la técnica y en la presente. Por consiguiente, dentro de la capacidad de los expertos en la técnica está ensayar y utilizar los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, obesidad, o desregulación de NF- κ B.

Administración terapéutica/profiláctica

15 Los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas pueden utilizarse de modo ventajoso en la medicina humana. Tal como se describió anteriormente en la sección 5.5, los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades que se caracterizan por una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, obesidad, o desregulación de NF- κ B.

20 Cuando se emplean para tratar o prevenir las anteriores enfermedades o trastornos, los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas pueden administrarse o aplicarse por sí solos o en combinación con otros agentes. Los compuestos de la invención y/o sus composiciones farmacéuticas también pueden administrarse o aplicarse por sí solos, en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos (por ejemplo, otros agentes anticáncer, otros agentes antiangiogénicos, otros quelantes, tales como cinc, penicilamina, etc., y otros agentes antiobesidad), que incluyen otros compuestos de la invención.

25 La presente invención proporciona métodos para el tratamiento y la profilaxis mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica y/o un compuesto de la invención. El paciente puede ser un animal, más preferiblemente es un mamífero, y lo más preferiblemente es un ser humano.

30 Los presentes compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención, que comprenden uno o más compuestos de la invención, se administran preferiblemente por vía oral. Los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse mediante cualquier otra vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración (por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc.) que pueden utilizarse para administrar un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, mediante inhalación, o por vía tópica, en particular a los oídos, nariz, ojos o piel. La vía de administración preferida se deja al criterio del médico y dependerá, en parte, del sitio del trastorno médico. En la mayoría de los casos, la administración producirá la liberación de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención hacia la corriente sanguínea.

35 40 En realizaciones específicas, puede resultar deseable administrar uno o más compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención de modo local al área que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante una infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de una cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas silásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser una inyección directa en el sitio (o sitio anterior) del cáncer o la artritis.

45 50 En ciertas realizaciones, puede resultar deseable introducir uno o más compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, que incluye la inyección intraventricular, intratecal y epidural. La inyección intraventricular puede verse facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

55 Un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención también puede administrarse directamente al pulmón mediante inhalación. Para la administración mediante inhalación, un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención puede administrarse de modo conveniente al pulmón mediante una serie de dispositivos diferentes. Por ejemplo, puede utilizarse un inhalador dosimétrico ("Metered Dose Inhaler", MDI) que utilice botes que contienen un propelente de bajo punto de ebullición adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o cualquier otro gas adecuado) para administrar los

compuestos de la invención directamente al pulmón.

Como alternativa, puede utilizarse un dispositivo inhalador de polvo seco ("Dry Powder Inhaler", DPI) para administrar un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención al pulmón. Los dispositivos DPI generalmente utilizan un mecanismo, tal como una explosión de gas, para crear una nube de polvo seco dentro de un recipiente, que entonces puede ser inhalado por el paciente. Los dispositivos DPI también son muy conocidos en la técnica. Una variación popular es el sistema DPI de múltiples dosis (MDDPI), que permite la administración de más de una dosis terapéutica. Los dispositivos MDDPI están disponibles en empresas tales como AstraZeneca, GlaxoWellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma y Vectura. Por ejemplo, las cápsulas y los cartuchos de gelatina para su uso como un inhalador o insuflador pueden formularse para que contengan una mezcla de polvos de un compuesto de la invención y un polvo base adecuado, tal como lactosa o almidón, para estos sistemas.

Otro tipo de dispositivo que puede utilizarse para administrar un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención al pulmón es un dispositivo de pulverización de líquidos suministrado, por ejemplo, por Aradigm Corporation. Los sistemas de pulverización de líquidos emplean orificios en la boquilla extremadamente pequeños para formar un aerosol de las formulaciones de fármacos líquidas, que después pueden inhalarse directamente al pulmón.

En una realización, se emplea un nebulizador para administrar un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención al pulmón. Los nebulizadores crean aerosoles a partir de las formulaciones de fármacos líquidas utilizando, por ejemplo, energía ultrasónica para formar partículas finas que pueden inhalarse con facilidad (véase, por ejemplo, Verschoye et al., *British J. Cancer*, 1999, 80, supl. 2, 96, que se incorpora en la presente como referencia). Los ejemplos de nebulizadores incluyen los dispositivos suministrados por Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd. (véase, Armer et al., patente de EEUU n.º 5.954.047; van der Linden et al., patente de EEUU n.º 5.950.619; van der Linden et al., patente de EEUU n.º 5.970.974), Aventis y Batelle Pulmonary Therapeutics.

En otra realización, se emplea un dispositivo de aerosol electrohidrodinámico (EHD) para administrar un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención al pulmón. Los dispositivos de aerosol EHD emplean la energía eléctrica para producir un aerosol de suspensiones o disoluciones de fármacos líquidas (véase, por ejemplo, Noakes et al., patente de EEUU n.º 4.765.539). Las propiedades electroquímicas de la formulación pueden ser parámetros importantes para optimizar el momento en que se administra un compuesto y/o una composición farmacéutica de la invención al pulmón con un dispositivo de aerosol EHD, y esta optimización la realizan habitualmente los expertos en la técnica. Los dispositivos de aerosol EHD pueden administrar fármacos al pulmón con más eficacia que las tecnologías de administración pulmonar existentes.

En otra realización, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, Langer, 1990, *Science*, 249:1527-1533; Treat et al., en "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer", López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); véase, en general, "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer", López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989)).

En otra realización, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a través de sistemas de liberación sostenida, preferiblemente sistemas de liberación sostenida oral. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase, Langer, supra; Sefton, 1987, *CRC Crit RefBiomed Eng.*, 14:201; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.*, 321:574).

En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase "Medical Applications of Controlled Release", Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); "Controlled Drug Bioavailability", Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol Chem.*, 23:61; véase también Levy et al., 1985, *Science*, 228:190; Doring et al., 1989, *Ann. Neurol.*, 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.*, 71:105). En otra realización, se emplean materiales poliméricos para una administración de liberación sostenida oral. Los polímeros preferidos incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e hidroxietilcelulosa (el más preferido es la hidroxipropilmetilcelulosa). Se han descrito otros éteres de celulosa preferidos (Alderman, *Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr.*, 1984, 5(3), 1-9). Los factores que afectan a la liberación de fármacos son muy conocidos por los expertos en la técnica y se han descrito en la técnica (Bamba et al., *Int. J. Pharm.*, 1979, 2, 307).

En otra realización, pueden utilizarse preparaciones con revestimiento entérico para una administración de liberación sostenida oral. Los materiales de revestimiento preferidos incluyen polímeros con una solubilidad dependiente del pH (es decir, liberación controlada por el pH), polímeros con una velocidad de hinchamiento, de disolución o de erosión lenta o dependiente del pH (es decir, liberación controlada por el tiempo), polímeros que son degradados por enzimas (es decir, liberación controlada por enzimas), y polímeros que forman capas firmes que son destruidas por un aumento en la presión (es decir, liberación controlada por la presión).

En otra realización, se emplean sistema de administración osmótica para una administración de liberación sostenida oral (Verma et al., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000, 26:695-708). En otra realización, se emplean dispositivos osmóticos OROS™ como dispositivos para una administración de liberación sostenida oral (Theeuwes et al., patente de EEUU

n.º 3.845.770; Theeuwes et al., patente de EEUU n.º 3.916.899).

En otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca de la diana de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la invención, con lo cual solo se necesita una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en "Medical Applications of Controlled Release", supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). También pueden utilizarse otros sistemas de liberación controlada analizados en Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Composiciones farmacéuticas de la invención

Las presentes composiciones farmacéuticas contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la invención, preferiblemente en una forma purificada, junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable, para proporcionar una forma para la administración adecuada a un paciente.

Cuando se administran a un paciente, los compuestos de la invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua es un vehículo preferido cuando el compuesto de la invención se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones de dextrosa y glicerol acuosas como vehículos líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol. Las presentes composiciones farmacéuticas, si se desea, también pueden contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulgentes, o agentes tamponantes del pH. Además, pueden utilizarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención pueden prepararse mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de una manera convencional utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables, que facilitan el procesamiento de los compuestos de la invención para producir preparaciones que puedan utilizarse de modo farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Las presentes composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, granulados, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizados, suspensiones o cualquier otra forma adecuada de uso. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula (véase, por ejemplo, Grosswald et al., patente de EEUU n.º 5.698.155). Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se han descrito en la técnica (véase, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Philadelphia College of Pharmacy and Science, 20ª edición, 2000).

Para la administración tópica, un compuesto de la invención puede formularse como disoluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc., como se conoce en la técnica.

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para la administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para la administración transdérmica, transmucósica, oral o pulmonar. Las formulaciones sistémicas pueden fabricarse en combinación con otro agente activo que mejore la eliminación mucociliar del moco de las vías respiratorias o reduzca la viscosidad mucosa. Estos agentes activos incluyen, pero no se limitan a bloqueantes del canal de sodio, antibióticos, N-acetilcisteína, homocisteína y fosfolípidos.

En una realización, los compuestos de la invención se formulan según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Generalmente, los compuestos de la invención para la administración intravenosa son disoluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Para la inyección, un compuesto de la invención puede formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer, o tampón de disolución salina fisiológica. La disolución puede contener agentes formulatorios, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Cuando sea necesario, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones farmacéuticas para la administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local, tal como lignocaína, para mitigar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o un sobre, que indican la cantidad del agente activo. Cuando el compuesto de la invención se administra mediante infusión, puede dispensarse, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene disolución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando el compuesto de la invención se administra mediante una inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina, de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Para la administración transmucósica, en la formulación se emplean penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. Estos penetrantes son conocidos en la técnica en general.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones farmacéuticas administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, tales como fructosa, aspartamo o sacarina, agentes aromatizantes, tales como menta, aceite de gualteria, o agentes colorantes de cereza, y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente de sabor agradable. Además, cuando están en forma de comprimidos o pastillas, los compuestos pueden ser revestidos para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando con ello una acción sostenida a lo largo de un periodo de tiempo largo. Las membranas selectivamente permeables que rodean a un compuesto director osmóticamente activo también son adecuadas para los compuestos de la invención administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea a la cápsula es embebido por el compuesto director, que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una abertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de administración de orden fundamentalmente cero, en oposición a los perfiles con picos de las formulaciones de liberación inmediata. También puede utilizarse un material de retraso en el tiempo, tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos convencionales, tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Estos vehículos preferiblemente son de calidad farmacéutica.

Para las preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y disoluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, disolución salina, alquilenglicoles (por ejemplo, propilenglicol), polialquilenglicoles (por ejemplo, polietilenglicol), aceites, alcoholes, tampones ligeramente ácidos con un pH entre 4 y 6 (por ejemplo, acetato, citrato, ascorbato entre aproximadamente 5,0 mM a aproximadamente 50,0 mM), etc. Además, pueden añadirse agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, sales biliares, acilcarnitinas y similares.

Para la administración bucal, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas, etc., formulados de una manera convencional.

Las formulaciones de fármacos líquidas adecuadas para su uso con nebulizadores, dispositivos de pulverización de líquidos y dispositivos de aerosol EHD generalmente incluirán un compuesto de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido, tal como alcohol, agua, polietilenglicol o un perfluorocarbono. Opcionalmente, puede añadirse otro material para alterar las propiedades de aerosol de la disolución o suspensión de los compuestos de la invención. Preferiblemente, este material es un líquido, tal como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Otros métodos para formular disoluciones o suspensiones de fármacos líquidas adecuadas para su uso en dispositivos de aerosol son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Biesalski, patente de EEUU n.º 5.112.598; Biesalski, patente de EEUU n.º 5.556.611).

Un compuesto de la invención también puede formularse en composiciones farmacéuticas rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases para supositorios convencionales, tales como mantequilla de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, un compuesto de la invención también puede formularse como una preparación de liberación lenta ("depot"). Estas formulaciones de acción larga pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante una inyección intramuscular. Así, por ejemplo, un compuesto de la invención puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Cuando un compuesto de la invención es ácido, puede incluirse en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como el ácido libre, una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o un hidrato. Las sales farmacéuticamente aceptables retienen sustancialmente la actividad del ácido libre, pueden prepararse mediante una reacción con bases, y tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que la correspondiente forma de ácido libre.

Dosis terapéuticas

Un compuesto de la invención, o sus composiciones farmacéuticas, se emplearán generalmente en una cantidad eficaz para lograr el objetivo previsto. Para su uso para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se caracterizan por una vascularización aberrante, trastornos del metabolismo del cobre, trastornos neurodegenerativos, y obesidad, los compuestos de fórmula estructural (I) y/o sus composiciones farmacéuticas se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La cantidad de un compuesto de la invención que es eficaz para el tratamiento de un trastorno o afección concretos descritos en la presente dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede ser determinada mediante técnicas clínicas convencionales conocidas en la técnica, tal como se ha descrito previamente. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos in vitro o in vivo para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

La cantidad de un compuesto de la invención administrada dependerá, por supuesto, entre otros factores, del sujeto que se está tratando, el peso del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y el criterio del médico encargado.

5 Por ejemplo, la dosificación puede administrarse en una composición farmacéutica mediante una única administración, mediante aplicaciones múltiples o liberación controlada. En una realización, los compuestos de la invención se administran mediante administración de liberación sostenida oral. Preferiblemente, en esta realización, los compuestos de la invención se administran dos veces diarias (más preferiblemente, una vez diaria). La dosificación puede repetirse de modo intermitente, puede proporcionarse sola o en combinación con otros fármacos, y puede continuar el tiempo que se requiera para un tratamiento eficaz del estado de enfermedad o trastorno.

10 Los intervalos de dosificación adecuados para la administración oral dependen de la potencia del fármaco, pero en general serán de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 200 mg de un compuesto de la invención por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación pueden ser determinados con facilidad mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

15 Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa (i.v.) son de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal. Los supositorios generalmente contienen de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 50 miligramos de un compuesto de la invención por kilogramo de peso corporal, y comprenden el ingrediente activo en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% en peso. Las dosificaciones recomendadas para la administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, epidural, sublingual o intracerebral están en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 200 mg por kilogramo de peso corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o in vitro. Estos modelos animales y sistemas son muy conocidos en la técnica.

20 Los compuestos de la invención se ensayan preferiblemente in vitro e in vivo para la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, pueden emplearse ensayos in vitro para determinar si se prefiere la administración de un compuesto de la invención específico o una combinación de compuestos de la invención para reducir las convulsiones. También puede demostrarse que los compuestos de la invención son eficaces y seguros utilizando sistemas de modelos animales.

25 Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención descrito en la presente proporcionará un beneficio terapéutico sin provocar una toxicidad sustancial. La toxicidad de los compuestos de la invención puede determinarse utilizando procedimientos farmacéuticos convencionales y puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica. La proporción de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Un compuesto de la invención preferiblemente mostrará unos índices terapéuticos particularmente altos en el tratamiento de enfermedades y trastornos. La dosificación de un compuesto de la invención descrito en la presente preferiblemente estará dentro de un intervalo de concentraciones en la circulación que incluye una dosis eficaz con poco o ninguna toxicidad.

Terapia de combinación

30 En ciertas realizaciones de la presente invención, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse en una terapia de combinación con al menos otro agente terapéutico. El compuesto y/o la composición farmacéutica de la invención y el agente terapéutico pueden actuar de modo aditivo o, más preferiblemente, sinérgico. En una realización preferida, un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de un compuesto de la invención se administra al mismo tiempo que la administración de otro agente terapéutico, que puede ser parte de la misma composición farmacéutica que el compuesto de la invención, o ser una composición farmacéutica diferente. En otra realización, una composición farmacéutica de un compuesto de la invención se administra antes o después de la administración de otro agente terapéutico.

35 En particular, en una realización preferida, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse en una terapia de combinación con otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, agentes alquilantes (por ejemplo, gases mostaza (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfaleno, clorambucilo, hexametilmelamina, tiotepa), sulfonatos de alquilo (por ejemplo, busulfano, nitrosoureas, triazinas) antimetabolitos (por ejemplo, análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo, floxuridina, citosina arabinósido, etc.), análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, etc.), productos naturales (por ejemplo, vinblastina, vincristina, etopósido, tertipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxurrubicina, bleomicina, mitromicina, mitomicina C, L-asparaginasa, interferón-alfa), complejos de coordinación de platino (por ejemplo, cis-platino, carboplatino, etc.), mitoxantrona, hidroxiaurea, procarbazona, hormonas y antagonistas (por ejemplo, prednisona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megesterol, dietilestilbestrol, etinilestradiol, tamoxifeno, propionato de testosterona, fluoximesterona, flutamida, leuprolida, etc.), inhibidores o agentes antiangiogénesis (por ejemplo, angiostatina, ácidos retinoicos y paclitaxel, derivados de estradiol, derivados de tiazolopirimidina, etc.), agentes inductores de la apoptosis (por ejemplo, nucleótidos antisentido que bloquean oncogenes que inhiben la apoptosis, supresores tumorales, TRAIL, polipéptido

de TRAIL, factor 1 asociado a Fas, enzima convertora de interleuquina-1 β , inhibidores de fosfotirosina, agonistas del receptor de retinoides RXR, derivados de carboestirilo, etc.), quelantes (penicilamina, cinc, trientina, etc.) y otros agentes antiobesidad.

Kits terapéuticos

5 La presente invención proporciona kits terapéuticos que comprenden los compuestos de la invención o las composiciones farmacéuticas de la invención. Los kits terapéuticos también pueden contener otros compuestos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, productos naturales, hormonas o antagonistas, inhibidores o agentes antiangiogénesis, agentes inductores de la apoptosis o quelantes) o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos.

10 Los kits terapéuticos pueden incluir un único recipiente que contiene el compuesto de la invención o las composiciones farmacéuticas de la invención, con o sin otros componentes (por ejemplo, otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos), o pueden incluir distintos recipientes para cada componente. Preferiblemente, los kits terapéuticos de la invención incluyen un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención envasada para su uso en combinación con la coadministración de un
15 segundo compuesto (preferiblemente, un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o antagonista, un inhibidor o agente antiangiogénesis, agentes inductores de la apoptosis o quelantes) o una composición farmacéutica de este. Los componentes del kit pueden estar precomplejados o cada componente puede estar en un recipiente separado distinto antes de la administración a un paciente.

20 Los componentes del kit pueden proporcionarse en una o más disoluciones líquidas, preferiblemente una disolución acuosa, más preferiblemente una disolución acuosa estéril. Los componentes del kit también pueden proporcionarse como sólidos, que pueden convertirse en líquidos mediante la adición de disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro recipiente distinto.

25 El recipiente de un kit terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa o cualquier otro medio para encerrar un sólido o un líquido. Habitualmente, cuando existe más de un componente, el kit contendrá un segundo vial u otro recipiente, que permita la dosificación separada. El kit también puede contener otro recipiente para un líquido farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, un kit terapéutico contendrá aparatos (por ejemplo, una o más agujas, jeringas, dispensadores de gotas oculares, pipetas, etc.) que permitan la administración de los componentes del kit.

Ejemplos

30 La invención se define más a fondo haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que describen en detalle la preparación de compuestos de la invención y los métodos para ensayar la actividad biológica.

Ejemplo 1: Procedimiento general para la síntesis de derivados de tetratiomolibdato

Una disolución acuosa disponible en el mercado de hidróxido de amonio cuaternario (2 eq.) se añadió a tetratiomolibdato de amonio (1 eq.), seguido de agua desionizada hasta que todo el material sólido se hubo disuelto.
35 La disolución se colocó en un evaporador rotatorio al vacío (aproximadamente 5-10 torr) a 20 °C durante 2 horas, y el agua fue reemplazada cuando fue necesario para mantener un volumen constante. Si este procedimiento produce un precipitado, el sólido se recoge mediante filtración, se lava con isopropanol, etanol y éter dietílico, y después se seca a un vacío elevado durante 24 horas en un secador al vacío en presencia de P2O5. Si la disolución se
40 mantiene transparente, la mezcla de reacción primero se filtra para eliminar pequeñas cantidades de impurezas sólidas, y el producto precipita del filtrado con isopropanol. El sólido se recoge mediante filtración, se lava con isopropanol, etanol y éter dietílico y después se seca a un vacío elevado durante 24 horas en un secador al vacío en presencia de P2O5.

Ejemplo 2: Procedimiento general para la síntesis de derivados de tetratiomolibdato

45 Un haluro de amonio cuaternario sólido (2 eq.) se añade a una suspensión de tetratiomolibdato de amonio (1 eq.) en acetonitrilo seco (5 ml por mmol de TM) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. Si este procedimiento produce un precipitado, el sólido se recoge mediante filtración, se lava con agua, isopropanol, etanol y éter dietílico, y después se seca a un vacío elevado durante 24 horas en un secador al vacío en presencia de P2O5. Si la disolución se mantiene transparente, la mezcla de reacción primero se
50 filtra, y el filtrado se concentra al vacío. El sólido resultante se suspende en agua y se filtra, y el sólido se lava con isopropanol, etanol y éter dietílico y después se seca a un vacío elevado durante 24 horas en un secador al vacío en presencia de P2O5.

Ejemplo 3: Tetratiomolibdato de bis(trietilmetilamonio)

Este compuesto se preparó a partir de tetratiomolibdato de amonio (994 mg, 3,82 mmol) y una disolución acuosa al 20% en peso de hidróxido de trietilmetilamonio (5,12 g, 7,69 mmol) según el procedimiento del ejemplo 1, y se

obtuvieron 1,05 g (60%) del compuesto del título como un sólido de color naranja-rojo. IR (KBr, cm⁻¹) 472; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3,27 (q, J = 7,3 Hz, 12H), 2,89 (s, 6H), 1,19 (tt, J = 7,3, 1,8 Hz, 18H); RMN de 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 55,1 (6C), 46,1 (2C), 7,7 (6C); ES MS m/z (trietilmetilamonio)+ 116,3; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12000). Análisis: calc. para C₁₄H₃₆MoN₂S₄: C, 36,82; H, 7,95; N, 6,13. Encontrado: C, 37,07; H, 7,88; N, 6,24.

5 Ejemplo 4: Tetratiomolibdato de bis(trietilfenilamonio)

Este compuesto se preparó a partir de tetratiomolibdato de amonio (1,00 g, 3,85 mmol) y una disolución acuosa al 10% en peso de hidróxido de trietilfenilamonio (15,1 g, 7,71 mmol) según el procedimiento del ejemplo 1, y se obtuvieron 388 mg (17%) del compuesto del título como un sólido de color naranja. IR (KBr, cm⁻¹) 470; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7,91 (d, J = 8,2 Hz, 4H), 7,69-7,55 (m, 6H), 3,89 (q, J = 6,9 Hz, 12H), 1,04 (t, J = 6,9 Hz, 18H); RMN de 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 141,9 (2C), 130,5 (4C), 130,1 (2C), 122,7 (4C), 55,3 (6C), 8,0 (6C); ES MS m/z (trietilfenilamonio)+ 178,2; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12300). Análisis: calc. para C₂₄H₄₀MoN₂S₄: C, 49,63; H, 6,94; N, 4,82; S, 22,08. Encontrado: C, 49,39; H, 7,23; N, 5,15; S, 22,41.

15 Ejemplo 5: Tetratiomolibdato de bis(colina)

En la presente solicitud, el tetratiomolibdato de bis(colina) tiene la misma estructura química que el tetratiomolibdato de bis[2-(hidroxietil)trimetilamonio]. Este compuesto se preparó a partir de tetratiomolibdato de amonio (1,08 g, 4,15 mmol) y una disolución acuosa al 50% en peso de hidróxido de colina (2,01 g, 8,29 mmol) según el procedimiento del ejemplo 1, y se obtuvieron 1,30 g (73%) del compuesto del título como un sólido de color naranja. IR (KBr, cm⁻¹) 3389, 474; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5,21 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,87-3,79 (m, 4H), 3,43 (t, J = 4,6 Hz, 4H), 3,13 (s, 18H); RMN de 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 67,1 (2C), 55,5 (2C), 53,3 (6C); ES MS m/z (colina)+ 104,2; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12900). Análisis: calc. para C₁₀H₂₈MoN₂O₂S₄: C, 27,77; H, 6,52; N, 6,48; S, 29,65; Mo, 22,18. Encontrado: C, 27,63; H, 6,84; N, 6,39; S, 29,86; Mo, 22,23.

20 Ejemplo 6: Tetratiomolibdato de bis(acetilcolina)

Este compuesto se preparó a partir de cloruro de acetilcolina (732 mg, 4,03 mmol) y tetratiomolibdato de amonio (500 mg, 1,92 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2, y se obtuvieron 390 mg (39%) del compuesto del título como un sólido de color naranja-rojo. IR (KBr, cm⁻¹) 1747, 1728, 482, 469, 461; RMN de 1H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 4,47-4,41 (m, 4H), 3,72-3,69 (m, 4H), 3,16 (s, 18H), 2,07 (s, 6H); RMN de 13C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 170,1 (2C), 63,9 (2C), 58,0 (2C), 53,1 (6C), 20,9 (2C); ES MS m/z (acetilcolina)+ 146,4; UV (H₂O) 468 nm (ε = 13300). Análisis: calc. para C₁₄H₃₂MoN₂O₄S₄: C, 32,55; H, 6,24; N, 5,42; S, 24,82. Encontrado: C, 32,66; H, 6,23; N, 5,51; S, 24,97.

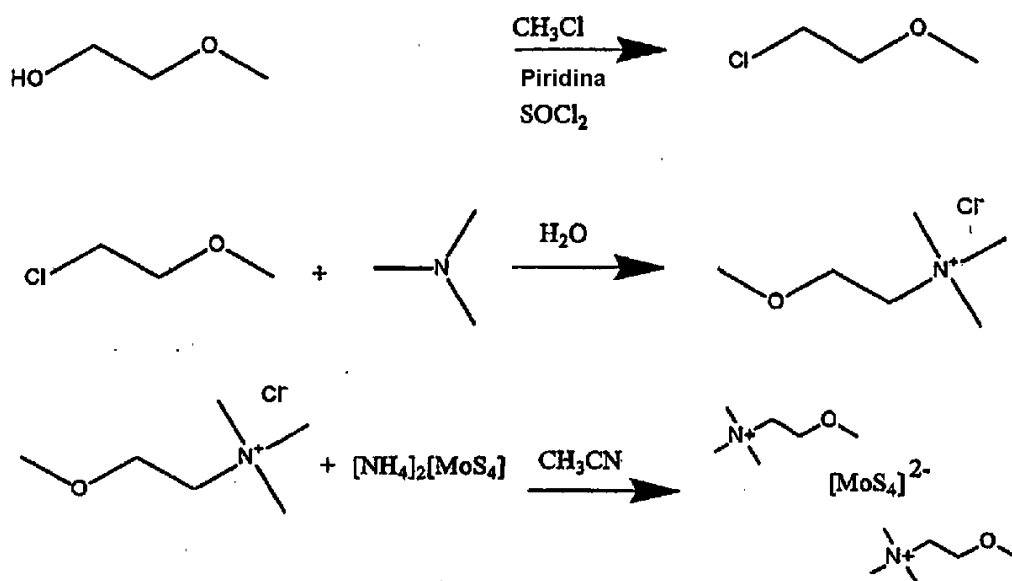
25 Ejemplo 7: Tetratiomolibdato de bis[2-(metoxi)etiltrimetilamonio]

Este compuesto no es parte de la invención. Este compuesto se preparó a partir de tetratiomolibdato de amonio (5 g, 19,2 mmol) y cloruro de 2-(metoxi)etiltrimetilamonio (6,199 g, 40,3 mmol, véase a continuación en este ejemplo para la síntesis) en una suspensión en agitación de acetonitrilo (125 ml). La suspensión se agitó durante 2 horas, durante las cuales se formó un polvo fino de color rojo claro. El precipitado se filtró sobre vidrio frito y el acetonitrilo se evaporó para producir 1,76 g (820%) del compuesto del título que se secó al vacío. Análisis: calc. para C₁₄H₃₂MoN₂O₄S₄: C, 31,293; H, 7,003; N, 6,082. Encontrado: C, 30,85; H, 6,89; N, 6,11.

El cloruro de 2-(metoxi)etiltrimetilamonio se preparó combinando 1-cloro-2-metoxietano (3,636 g, 38,5 mmol, véase a continuación en este ejemplo para la síntesis) en un matraz de fondo redondo de 25 ml con trimetilamina (al 40% en agua, 7,77 ml, 50 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas, se enfrió hasta la temperatura ambiente y se lavó tres veces con 15 ml de éter dietílico. El disolvente se evaporó de la capa acuosa después de dejar un sólido blanco terroso que se lavó con isopropanol y se secó al vacío para producir 4,136 g (70%) del compuesto.

El 1-cloro-2-metoxietano se preparó reuniendo 20 ml de cloroformo con 2-metoxietanol (5,4 ml, 69 mmol) en una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron secuencialmente cloruro de tionilo (5,0 ml, 69 mmol) y piridina (5,5 ml, 69 mmol) mediante una jeringa, se agita a temperatura ambiente durante 1 hora, y se somete a reflujo durante 1 hora más. Los componentes de la reacción se enfriaron, se extinguieron con agua, se lavaron dos veces con 25 ml de HCl 1 M y el disolvente se evaporó. Los productos de la reacción se filtraron sobre gel de sílice y se eluyeron con acetona para producir 5,94 g (91%) del componente de cloro marrón claro.

El mecanismo para la síntesis de tetratiomolibdato de bis[2-(metoxi)etiltrimetilamonio] según el presente ejemplo es el siguiente:



Ejemplo 8: Tetratiomolibdato de bis[alquildimetil(fenilmetil)amonio]

5 Este compuesto no es parte de la invención. Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de amonio (1,00 g, 3,84 mmol) y cloruro de benzalconio (2,90 g, 8,07 mmol) según el procedimiento del ejemplo 6 y se obtuvieron 2,75 g (82%) del compuesto del título como un aceite rojo espeso. IR (película, cm^{-1}) 471; RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,58-7,46 (m, 10H), 4,54 (s, 4H), 3,24-3,20 (m, 4H), 2,95 (s, 12H), 1,83-1,71 (m, 4H), 1,30-1,21 (m, 40H), 0,88-0,81 (m, 6H); ES MS m/z [dodecildimetil(fenilmetil)amonio] $^+$ 304,7, [tetradecildimetil(fenilmetil)amonio] $^+$ 332,7; UV (DMSO) 473,5 nm ($\epsilon = 10100$).

Ejemplo 9: Tetratiomolibdato de bis(1-etil-3-metil-1H-imidazolio)

10 Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de bis(amonio) (1,00 g, 3,84 mmol) y cloruro de 1-etil-3-metil-1H-imidazolio (1,18 g, 8,06 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2 con la siguientes modificaciones; la mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío, y los sólidos resultantes se filtraron, se enjuagaron con EtOH y éter etílico y se secaron a un secador de vacío elevado durante 24 hr produciendo el compuesto del título (0,419 g, 24%) como un sólido marrón rojizo. IR (gránulos de KBr, cm^{-1}) 3064, 1566, 1167, 465; RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9,24 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 4,20 (q, $J = 7,3$ Hz), 3,86 (s, 3H), 1,40 (t, $J = 7,3$ Hz); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 136,9, 123,5, 121,8, 44,1, 35,7, 15,3; MS m/z ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2$) $^+$ 111,2; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon = 11016$). Análisis: calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4$ MoS_4 : C, 32,28; H, 4,97; N, 12,55; S, 28,72. Encontrado: C, 31,88; H, 4,87; N, 12,56; S, 28,79.

Ejemplo 10: Tetratiomolibdato de bis(feniltrimetilamonio)

20 Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de bis(amonio) (1,00 g, 3,84 mmol) y cloruro de feniltrimetilamonio (1,38 g, 8,06 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2, y se obtuvo el compuesto del título (0,859 g, 45%) como un sólido de color naranja. IR (gránulos de KBr, cm^{-1}) 3032, 3005, 1485, 1458, 473; RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,98 (m, 4H), 7,61 (m, 6H), 3,62 (s, 18H); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 147,2, 130,0, 129,9, 120,5, 56,3; MS m/z ($\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}$) $^+$ 136,2; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon = 12900$). Análisis: calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 43,53; H, 5,68; N, 5,64; S, 25,83. Encontrado: C, 43,66; H, 5,98; N, 5,76; S, 25,73.

Ejemplo 11: Tetratiomolibdato de bis(benciltrimetilamonio)

30 Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de bis(amonio) (0,500 g, 1,92 mmol) e hidróxido de benciltrimetilamonio (1,60 g de una disolución acuosa al 40%, 3,84 mmol) según el procedimiento del ejemplo 1, proporcionando el compuesto del título (0,869 g, 91%) como un sólido rojo. P.f. 179-181 °C. (descomp); IR (gránulos de KBr, cm^{-1}) 2995, 1483, 1454, 474; RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,52 (m, 10H), 4,56 (s, 4H), 3,04 (s 18H); RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) δ 132,9, 130,2, 128,9, 128,4, 67,7, 51,7; MS m/z ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}$) $^+$ 150,3; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon = 12008$). Análisis: calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 45,78; H, 6,15; N, 5,34; S, 24,44. Encontrado: C, 45,67; H, 6,15; N, 5,62; S, 24,41.

Ejemplo 12: Tetratiomolibdato de pentan-1,5-bis(trimetilamonio)

35 A una suspensión de tetratioamolibdato de bis(amonio) (0,100 g, 0,226 mmol) en CH_3CN (2 ml) se le añadió una

disolución de yoduro de pentan-1,5-bis(trimetilamonio) (0,054 g, 0,205 mmol) disuelto en agua (2 ml). Después de agitar durante 5 horas a temperatura ambiente, los sólidos de color rojo marrónáceo se filtraron, se suspendieron en agua, después de volvieron a filtrar y se lavaron con EtOH, iPrOH y Et₂O. Después de secar en un secador de vacío elevado durante la noche se obtuvo un sólido rojo, proporcionándose el compuesto del título (0,051 g, 60%). IR (gránulos de KBr, cm⁻¹) 2997, 472; RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₅) δ 3,22 (m, 4H), 2,98 (s, 18H), 1,70 (m, 4H), 1,31 (2H); RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 79,4, 64,9, 52,2, 21,6; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12025). Análisis: calc. para C₁₁H₂₈N₂MoS₄: C, 32,03; H, 6,84; N, 6,79; S, 31,09. Encontrado: C, 32,40; H, 6,74; N, 6,80; S, 30,87.

Ejemplo 13: Tetratiomolibdato de bis(2-hidroxiiminometil-1-metilpiridinio)

Este compuesto no es parte de la invención. Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de bis(amónio) (1,00 g, 3,84 mmol) y cloruro de and 2-hidroxiiminometil-1-metilpiridinio (1,39 g, 8,06 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2 con la siguiente modificación: se añadió agua (10 ml) para disolver el haluro de amonio. El compuesto del título (1,20 g, 66%) se obtuvo como un sólido rojo. IR (gránulos de KBr, cm⁻¹) 1002, 477; RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,05 (d ap., 1H), 8,67 (s, 1H), 8,54 (t ap., 1H), 8,08 (d ap., 1H), 8,04 (t ap., 1H), 4,39 (s, 3H); RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 147,6, 147,1, 145,1, 142,0, 127,4, 124,9, 46,3; MS m/z (C₇H₉N₂O)⁺ 137,1; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12092).

Ejemplo 14: Tetratiomolibdato de bis(11-dimetilpirrolidinio)

Este compuesto se preparó a partir de tetratiomolibdato de amonio (0,644 g, 2,47 mmol) y yoduro de 1,1-dimetilpirrolidinio (1,18 g, 5,19 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2, y se obtuvo un sólido de color naranja. IR (KBr, cm⁻¹) 471; RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2,09 (m, 4H), 3,10 (s, 6H), 3,47 (t, J = 6 Hz, 4H); ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 21,44, 50,86, 64,68; ES MS m/z (1,1-dimetilpirrolidinio)⁺ 100; UV (H₂O) 468 nm (ε = 14130). Análisis: calc. para C₁₂H₂₈N₂MoS₄: C, 33,94; H, 6,64; N, 6,59; S, 30,21. Encontrado: C, 33,68; H, 6,97; N, 6,58; S, 30,06.

Ejemplo 15: Tetratiomolibdato de etilen-bis-amonio

Este compuesto no es parte de la invención. Se disolvieron cloruro de amonio (0,411 g, 7,68 mmol) y etilendiamina (0,230 g, 3,84 mmol) en 50 ml de agua. A esta disolución se le añadió tetratioamolibdato de amonio (1,0 g, 3,84 mmol) y la mezcla se agitó durante 3 horas. El sólido de color rojo ladrillo que se formó se recogió mediante filtración (233 mg), se enjuagó con isopropanol y Et₂O y se secó a un vacío elevado durante 24 horas en un secador al vacío en presencia de P₂O₅. Los licores madre se concentraron hasta aproximadamente 1/3 de su volumen original, y los cristales recién formados de nuevo se recogieron mediante filtración y se enjuagaron (387 mg). La recuperación total del compuesto del título fue de 620 mg (56,8%). IR (KBr, cm⁻¹) 474; RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3,08 (s, 4H), 7,79 (s a, 4H); ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 37,08; ES MS m/z (etilen-bis-amonio)⁺ 60,5; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12310). Análisis: calc. para C₂H₁₀MoN₂S₄: C, 8,39; H, 3,52; N, 9,78; S, 44,80. Encontrado: C, 8,75; H, 3,28; N, 10,05; S, 44,99.

Ejemplo 16: Tetratiomolibdato de bis(1,4-dimetilpiridinio)

Este compuesto se preparó a partir de tetratioamolibdato de amonio (0,50 g, 1,92 mmol) y yoduro de 1,4-dimetilpiridinio (0,95 g, 4,03 mmol) según el procedimiento del ejemplo 2 y proporcionó 203 mg (24%) del compuesto del título como un sólido de color naranja. IR (KBr, cm⁻¹) 469; RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2,49 (s, 3H), 4,30 (s, 3H), 7,93, (d, J = 6 Hz, 2H), 8,85 (d, J = 6 Hz, 2H); ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 21,31, 47,03, 127,94 (2C), 144,77, 157,93; ES MS m/z bis(1,4-dimetilpiridinio)⁺ 108,2; UV (H₂O) 468 nm (ε = 13480). Análisis: calc. para C₁₄H₂₀N₂MoS₄: C, 38,17; H, 4,57; N, 6,35; S, 29,11. Encontrado: C, 38,27; H, 4,24; N, 6,36; S, 28,89.

Ejemplo 17: Tetratiomolibdato de bis(feniltrimetilamonio)

Este compuesto se preparó según el procedimiento del ejemplo 1. IR (cm⁻¹) 470; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,99-7,97 (d, J = 8,4 Hz, 4H), 7,66-7,56 (m, 6H), 3,62 (s, 18H); UV (H₂O) 468 nm (ε = 13151). Análisis: calc. para C₁₈H₂₈MoN₂S₄: C, 43,53; H, 5,68; N, 5,64; S, 25,83. Encontrado: C, 42,72; H, 5,20; N, 5,27; S, 27,54.

Ejemplo 18: Tetratiomolibdato de bis(viniltrimetilamonio)

Este compuesto se preparó según el procedimiento del ejemplo 1. IR (cm⁻¹) 470; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6,62-6,56 (m, 2H), 5,76 (d, J = 15,2 Hz, 2H), 5,54 (m, 2H), 3,24 (s, 18H); UV (H₂O) 468 nm (ε = 18012).

Ejemplo 19: Tetratiomolibdato de bis(ciclopropilmetiltrimetilamonio)

Este compuesto se preparó según el procedimiento del ejemplo 2. IR (cm⁻¹) 474; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,24 (d, J = 7,2 Hz, 4H), 3,11 (s, 18H), 1,16 (m, 2H), 0,72-0,69 (m, 4H), 0,42-0,38 (m, 4H); UV (H₂O) 468 nm (ε = 14239).

Ejemplo 20: Tetratiomolibdato de bis(bencilfenildimetilamonio)

Este compuesto no es parte de la invención. Este compuesto se preparó según el procedimiento del ejemplo 2. IR (cm⁻¹) 470; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,76-6,60 (m), 5,00 (s), 2,87 (s); UV (H₂O) 468 nm (ε = 15606).

Ejemplo 21: Tetratiomolibdato de hexan-1,6-bis(trimetilamonio)

Este compuesto se preparó según el procedimiento del ejemplo 2. IR (cm⁻¹) 478; UV (DMSO) 468 nm (ε = 12666).

5 Ejemplo 22: Tetratiomolibdato de bis[(2-hidroxi)etil]trimetilamonio]

Este compuesto no es parte de la invención. Se añadió hidróxido de colina (al 50% en p/p en agua, 2,56 ml, 11,3 mmol) a una disolución de tetratiomolibdato de amonio (1,00 g, 5,66 mmol de Mo) en 2,5 ml de agua desionizada. Se burbujeó sulfuro de hidrógeno gaseoso a través de la disolución durante 50 minutos a temperatura ambiente, durante lo cual el color de la disolución viró de marrón a rojo. Se burbujeó nitrógeno gaseoso a través de la disolución durante 10 min para purgar la mezcla de reacción del sulfuro de hidrógeno disuelto, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El sólido rojo se disolvió en agua desionizada (3 x 25 ml) y el disolvente se eliminó repetidamente a presión reducida para eliminar el amoniaco disuelto. El producto bruto se disolvió en 20 ml de agua desionizada y se filtró. El producto se precipitó mediante la adición de isopropanol a la capa acuosa. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con etanol (3x) y éter dietílico (3x) para producir el compuesto del título bruto (2,218 g, 90%). Una recristalización en agua desionizada e isopropanol, y un lavado con etanol (3x) y éter dietílico (3x) produjeron el compuesto del título (1,565 g, 62%) como cristales rojos similares a láminas. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5,23 (t a, J = 4,7 Hz, 2H), 3,85 (s a, 4H), 3,46-3,43 (m, 4H), 3,14 (s, 18H).

Ejemplo 23: Tetratiomolibdato de bis[(2-hidroxi)etil]trimetilamonio]

Este compuesto no es parte de la invención. Se burbujeó sulfuro de hidrógeno gaseoso a través de una disolución de hidróxido de colina (al 50% en p/p en agua, 5,2 ml, 23 mmol) e hidróxido de amonio (al 30% en p/p en agua, 8,2 ml, 70 mmol) en un recipiente de presión tarado durante seis minutos. La cantidad de sulfuro de hidrógeno disuelto en la disolución fue de 2,5 g. Se añadió molibdato de amonio tetrahidrato (2,01 g, 11,4 mmol) disuelto en agua desionizada (2,5 ml) al recipiente de presión y los lados se lavaron con agua desionizada (0,5 ml). La mezcla de reacción se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y 45 minutos, durante lo cual se formaron cristales en la disolución roja. La mezcla se trasladó a un matraz de fondo redondo y se añadió agua desionizada hasta que el sólido se disolvió. El disolvente se retiró a presión reducida, el residuo se suspendió en agua desionizada y se repitió la etapa de concentración. El residuo rojo resultante se recristalizó en agua desionizada e isopropanol, y las láminas rojas se lavaron una vez con isopropanol, una vez con etanol, una vez con éter dietílico, y se secaron en un secador de vacío en presencia de pentaóxido de fósforo durante 23 horas para producir 3,05 g (62%) del compuesto del título. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5,21 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,87-3,79 (m, 4H), 3,43 (t, J = 4,6 Hz, 4H), 3,13 (s, 18H); RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 67,1 (2C), 55,5 (2C), 53,3 (6C); MS m/z (colina)+ 104,2; UV (H₂O) 468 nm (ε = 12400). Análisis: calc. para C₁₀H₂₈MoN₂O₂S₄: C, 27,77; H, 6,52; N, 6,48; S, 29,65. Encontrado: C, 27,76; H, 6,59; N, 6,85; S, 29,52.

Ejemplo 24: Tetratiomolibdato de bis[(2-hidroxi)etil]trimetilamonio]

Este compuesto no es parte de la invención. Se añadió agua desionizada (200 ml) a hidróxido de colina (al 50% en p/p en agua, 38,2 ml, 14,7 mmol), seguido de tetratiomolibdato de amonio (19,1 g, 7,35 mmol) y el matraz se agitó hasta que todo el material sólido se hubo disuelto. La disolución se colocó en un evaporador rotatorio al vacío (aproximadamente 5-10 torr) con un baño a 20 °C durante 110 minutos, y el agua se reemplazó según fue necesario para mantener un volumen constante. La mezcla de reacción se filtró para eliminar las pequeñas cantidades de impurezas sólidas, y el producto se precipitó del filtrado con isopropanol (1 l). El sólido se recogió mediante filtración, se lavó con isopropanol, etanol y éter dietílico, y después se secó a un vacío elevado durante 21 horas para producir 28,32 g (89%) del producto deseado como un polvo naranja. El producto bruto se recristalizó en agua desionizada e isopropanol para producir láminas rojas, que se lavaron una vez con isopropanol, una vez con etanol, una vez con éter dietílico, y se secaron en un secador de vacío en presencia de pentaóxido de fósforo durante 24 horas para producir 20,76 g (65%) del compuesto del título. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5,23 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 3,89-3,81 (m, 4H), 3,44 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,14 (s, 18H). Análisis: calc. para C₁₀H₂₈MoN₂O₂S₄: C, 27,77; H, 6,52; N, 6,48; S, 29,65. Encontrado: C, 27,91; H, 6,21; N, 6,26; S, 29,70.

Ejemplo 25: Tetratiomolibdato de bis[(2-hidroxi)etil]trimetilamonio]

Este compuesto no es parte de la invención. En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se suspendió [NH₄]₂[MoS₄] (100 g, 0,380 mol) en 200 ml de agua destilada. A la suspensión se le añadió una disolución al 45% en peso de hidróxido de colina en metanol (250 ml) (disponible en el mercado). Después de la adición se formó una gran cantidad de un precipitado de color rojo brillante. Bajo una corriente de nitrógeno, la suspensión se calentó hasta 40 °C con agitación vigorosa hasta que todos los sólidos se disolvieron (aproximadamente 1 hora). La disolución de color rojo oscuro se mantuvo a presión reducida durante 4 horas, durante las cuales precipitó un sólido cristalino rojo. La suspensión se enfrió en un baño de hielo durante 30 minutos y después se filtró. El producto se lavó con alcohol isopropílico hasta que los lavados fueron transparentes, después se lavó con éter dietílico y, por último, se secó al vacío para producir 138 g de un producto altamente cristalino (rendimiento del 83%).

Ejemplo 26: Determinación de la estructura por rayos X del tetratiomolibdato de colina

5 Los datos de difracción para un cristal rojo de (colina)₂MoS₄ se recogieron a 158(2) K utilizando un difractómetro de área Siemens SMART (Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, D-80333, Munich, República Federal de Alemania). Se obtuvo un látice P monoclinico con una célula: $a = 18,6066(1)$, $b = 12,7061(1)$, $c = 17,7621(2)$, y $\beta = 117,540(1)$ (grupo espaciador P2₁/c). La estructura cristalina se resolvió por métodos directos y muestra 2 [MoS₄] y 4 cationes colina en la unidad asimétrica. Después de un refinamiento de mínimos cuadrados de todos los átomos que no son hidrógeno en la unidad de célula y la convergencia, el factor R final fue de 0,06. Las coordenadas de célula de los átomos en la unidad de células fueron las siguientes:

Átomo	x/a	y/b	z/c
Mo1	0,3502	0,7432	0,4307
Mo2	0,1641	0,2579	0,0786
N1	0,4724	0,6022	0,2250
N2	0,3306	0,3142	0,4043
N3	-0,0120	0,0317	-0,3170
N4	0,1920	0,8572	0,1184
S1	0,2450	0,8268	0,4246
S2	0,4354	0,8566	0,4245
S3	0,4096	0,6553	0,5492
S4	0,3114	0,6324	0,3236
S5	0,2769	0,1760	0,1066
S6	0,1167	0,1908	0,1604
S7	0,0768	0,2372	-0,0535
S8	0,1883	0,4248	0,1079
O1	0,6860	0,9215	0,6690
O2	0,6133	0,6075	0,8536
O3	0,8951	0,3408	0,7335
O4	0,9355	0,3376	0,5362
C1	0,7156	0,8812	0,6189
C2	0,6576	0,7959	0,5590
C3	0,6471	0,6801	0,6669
C4	0,7534	0,6488	0,6274
C5	0,6139	0,6151	0,5265
C6	0,6288	0,5111	0,8973
C7	0,6144	0,4157	0,8417
C8	0,5016	0,4766	0,7046
C9	0,5221	0,2904	0,7373
C10	0,4710	0,4023	0,8135
C11	0,9086	0,4169	0,7986

ES 2 448 800 T3

C12	0,9240	0,5165	0,7797
C13	1,0580	0,4580	0,7905
C14	1,0186	0,6375	0,7813
C15	1,0496	0,5430	0,9103
C16	0,9086	0,4815	0,5675
C17	0,8505	0,4262	0,4598
C18	0,7199	0,3849	0,3353
C19	0,8417	0,3763	0,3214
C20	0,8182	0,2446	0,4035

Ejemplo 27: Datos de estabilidad química para los análogos

<u>Sal</u>	<u>PM</u>	<u>% remanente después de 10 días</u> <u>Condiciones abiertas al aire</u>
propan-1,3-bis(trimetilamonio)	384,2	52
1-etil-3-metil-1H-imidazol	446,5	75
trimetilfenilamonio	496,6	85
tetrapropilamonio	596,92	*82
amonio	260,28	*48
acetilcolina	516,6	39
colina	432,52	62
triethylfenilamonio	580,77	76
metiltriethylamonio	456,63	63
1,1-dimetilpirrolidinio	424,57	70
butan-1,4-bis(trimetilamonio)	398,53	40
1,4-dimetilpiridinio	440,53	32
trimetilbencilamonio	524,69	94
etilen-bis(trimetilamonio)	370,5	40
pentan-1,5-bis(trimetilamonio)	412,5	86
		* 9 días; un estudio diferente
		7 días, HR 74-77%, TA
bis(feniltrimetilamonio)	496,61	98
bis(viniltrimetilamonio)	396,49	72
bis(ciclopropilmetiltrimetilamonio)	452,60	86
bis(bencilfenildimetilamonio)	648,81	45
hexan-1-6-bis(trimetilamonio)	426,56	94

Ejemplo 28: Datos biológicos que comparan el tetratiomolibdato con tetratiomolibdato de colina in vivo en el carcinoma pulmonar de Lewis 3LL: crecimiento de tumores primarios

El modelo de tumor utilizado fue 3LL JF en ratones C57BL/6. Esta línea tumoral surgió espontáneamente en 1951 como un carcinoma de pulmón en un ratón C57BL/6 (Cancer Res., 1955, 15:39; véase también Malave et al., J. Nat'l. Canc. Inst., 1979, 62:83-88). Se propaga por transferencia en ratones C57BL/6 mediante inoculación subcutánea y se ensaya en ratones C57BL/6xDBA/2 F1 semialogeneicos o en ratones C3H alogeneicos. Generalmente, se emplean seis animales por grupo para el implante subcutáneo, o diez para el implante intramuscular. El tumor puede implantarse por vía subcutánea como un fragmento de 2-4 mm, o por vía intramuscular como un inóculo de células suspendidas de aproximadamente 0,5-2 x 10⁶ células. El tratamiento comienza 24 horas después del implante o se retrasa hasta que pueda palpase un tumor de un tamaño específico (habitualmente de aproximadamente 100 mg). El compuesto de ensayo se administra a diario durante 11-25 días.

Se realiza un seguimiento de los animales mediante el pesado, la palpación y la medición del tamaño de los tumores. El peso típico del tumor en receptores control no tratados en el día 12 después de la inoculación subcutánea es de 500-2500 mg, y el tiempo de supervivencia medio típico es de 18-28 días. Se emplea un compuesto de control positivo, por ejemplo, se administra ciclofosfamida a 170 mg/kg/inyección diarios cada 6 días. Los resultados computados incluyen la media del peso del animal, el tamaño del tumor, el peso del tumor, y el tiempo de supervivencia. Para confirmar la actividad terapéutica, la composición de ensayo debería ensayarse en dos ensayos de múltiples dosis. Ratones C57/BL hembra se inocularon con 1 x 10⁶ células de carcinoma de pulmón de Lewis (3LL) por vía subcutánea en la mitad de la espalda. El tratamiento con tetratiomolibdato y tiomolibdato de colina se inició el día después de la inoculación de los tumores (50 mg/kg por sonda oral). Se empleó ciclofosfamida (170 mg/kg administrados cada 6 días por vía subcutánea, comenzando en el día 3 después de la inoculación de las células tumorales) como control. Los volúmenes tumorales y el peso de los animales se midieron 2x/semana, y los animales se eutanizaron cuando el volumen de los tumores en el grupo control alcanzó una media de 2000 mm³. Se determinó la proporción (T/C) de los volúmenes tumorales en el grupo tratado (T) frente al grupo control (C). Se obtuvieron sangrados cardíacos terminales y se analizaron para la concentración de eritrocitos sanguíneos (hematocrito, HCT).

Tratamiento	n	T/C	Peso del ratón, % del inicial	HCT**
Agua	19	1	106%	35%
TM	17	0,59	93%*	35%
CHTM	17	0,54	103%	35%
Ciclofosfamida	5	0,74	105%	40%

*significativo; ** normal es 45%

Ejemplo 29: El tetratiomolibdato de bis(colina) inhibe la proliferación de células endoteliales

El tetratiomolibdato de bis(colina) inhibe la proliferación de HUVEC de una manera dependiente de la dosis, según se ilustra en la figura 1, y no parece ser citotóxico. Aunque no se añade cobre exógeno, el ensayo se realiza en presencia de suero al 10%. El suero contiene proteínas que se unen al cobre, y el suero es aproximadamente 1-2 µM con respecto al contenido en cobre. El cobre desempeña un papel en la unión de bFGF a su receptor (Patstone et al., J Biol. Chem., 1996, 271(7):3343-3346); por consiguiente, el tetratiomolibdato de bis(colina) también puede tener un impacto directo sobre el mecanismo de inducción de la proliferación. La incubación de tetratiomolibdato de bis(colina) con HUVEC confluentes (en un T-75) durante 72 horas, y el recuento de las células directamente al final del ensayo indica que el tetratiomolibdato de bis(colina) tiene poco o ningún efecto sobre las células endoteliales estables confluentes, tal como puede observarse en la tabla 1.

Tabla 1: Efecto del tetratiomolibdato de bis(colina) sobre la viabilidad de HUVEC confluentes después de una incubación de 72 horas a 37 °C

Condiciones	número de células	número de células viables
1. control	390.000	335.000
2. control + ATN-224 1 uM	400.000	460.000
3. control + ATN-224 10 uM	535.000	555.000
4. control + ATN-224 50 uM	487.500	475.000

40

Ejemplo 30: El tetratiomolibdato de bis(colina) no induce la apoptosis en células endoteliales

Se incubaron células endoteliales con dosis variables de tetratiomolibdato de bis(colina) durante 72 horas (el tiempo de un ensayo de proliferación típico) y se midió el nivel de caspasa-3 activada. Como puede observarse en la figura 2, la incubación con tetratiomolibdato de bis(colina) no conduce a niveles mensurables de caspasa-3 activada en células endoteliales. Como control, los inventores incubaron la misma densidad de HUVEC con camptotecina 10 μ M, un inductor de la apoptosis conocido. Por consiguiente, las HUVEC incubadas con tetratiomolibdato de bis(colina) muestran unos niveles similares de caspasa-3 activada que las células cultivadas bajo condiciones proliferativas normales.

Ejemplo 31: El tetratiomolibdato de bis(colina) como antiangiogénico en un ensayo de lecho corto de Matrigel

El ensayo de Matrigel in vivo descrito en el ejemplo 35 se emplea habitualmente para medir la angiogénesis. El tetratiomolibdato de bis(colina), administrado por vía oral mediante sonda, inhibe la angiogénesis inducida por bFGF en el ensayo de Matrigel in vivo, según se ilustra en la figura 3.

Ejemplo 32: El tetratiomolibdato de bis(colina) infrarregula la secreción de IL-8 desde células endoteliales confluentes

Tal como se ilustra en la figura 4, el tetratiomolibdato de bis(colina) disminuye la cantidad de IL-8 segregada desde células endoteliales confluentes. La IL-8, además de ser una citoquina proangiogénica, es quimiotáctica para todos los tipos conocidos de células inmunológicas migratorias.

Ejemplo 33: El tetratiomolibdato de bis(colina) infrarregula la expresión de IL-8 desde monocitos activados

Los monocitos no activados no expresan IL-8, pero la activación por PMA de células Thp-1 induce la transcripción y la traducción de IL-8. La figura 5 demuestra que el tetratiomolibdato de bis(colina) es capaz de infrarregular la expresión/secreción de IL-8 mensurable desde monocitos activados.

Ejemplo 34: El tetratiomolibdato de bis(colina) provoca una disminución en los niveles plasmáticos de KC murino

Los ratones no expresan IL-8, pero sí expresan homólogos, tales como KC murino. El KC murino realmente tiene una mayor homología con GRO-alfa humano que la IL-8 humana, pero su receptor tiene una alta homología con el receptor de IL-8 humano. La expresión de KC murino es inducida por TNF-alfa. El tetratiomolibdato de bis(colina) se administra a ratones C57/B16 que portan tumores (ratones que portan tumores que tienen KC murino mensurable en su plasma) (50 mg/kg diarios) mediante sonda oral. Se extrajeron muestras de plasma de los animales en el día 21 de la terapia y se ensayaron para el KC murino. Los análisis estadísticos de estos datos indican que existen diferencias significativas ($p < 0,1$) entre la media de los valores de KC murino de los dos grupos, según se ilustra en la figura 6.

Ejemplo 35: Ensayo de lecho corto de Matrigel

Este ensayo se realiza fundamentalmente como se describe en Passaniti *et al.*, *Lab Invest.*, 1992, 67:519-528. Se mezcla Matrigel® enfriado en hielo (por ejemplo, 500 μ l) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) con heparina (por ejemplo, 50 μ g/ml), FGF-2 (por ejemplo, 400 ng/ml) y el compuesto que se va a ensayar. En algunos ensayos, el bFGF puede sustituirse por células tumorales como estímulo angiogénico. La mezcla de Matrigel® se inyecta por vía subcutánea en ratones atímicos "nude" de 4-8 semanas de edad en sitios cercanos a la línea media abdominal, preferiblemente 3 inyecciones por ratón.

El Matrigel® inyectado forma un gel sólido palpable. Los sitios de la inyección se eligen de modo que cada animal recibe un lecho corto de control positivo (tal como FGF-2 + heparina), un lecho corto de control negativo (por ejemplo, tampón + heparina) y un lecho corto que incluye el compuesto que se va a ensayar para su efecto sobre la angiogénesis (por ejemplo, FGF-2 + heparina + compuesto). Todos los tratamientos se realizan preferiblemente por triplicado. Los animales se sacrifican mediante dislocación cervical aproximadamente 7 días después de la inyección o en otro momento que pueda ser óptimo para observar la angiogénesis. La piel del ratón se desprende a lo largo de la línea media abdominal, y los lechos cortos de Matrigel® se recuperan y se escanean inmediatamente a alta resolución. Después los lechos cortos se dispersan en agua y se incuban a 37 °C durante la noche. Se determinan los niveles de hemoglobina utilizando una disolución de Drabkin (por ejemplo, obtenida en Sigma) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de Hb en el lecho corto es una medición indirecta de la angiogénesis, puesto que refleja la cantidad de sangre en la muestra. Además, o como alternativa, a los animales se les puede inyectar antes del sacrificio 0,1 ml de tampón (preferiblemente PBS) que contenga un dextrano de alto peso molecular con el que está conjugado un fluoróforo. La cantidad de fluorescencia en el lecho corto dispersado, determinada de modo fluorométrico, también sirve como una medición de la angiogénesis en el lecho corto. También puede utilizarse una tinción con un mAAb anti-CD31 (CD31 es una molécula de adhesión de células endoteliales-plaquetas o PECAM) para confirmar la formación de neovasos y la densidad de los microvasos en los lechos cortos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto de tetratiomolibdato, o uno de sus solvatos o hidratos, seleccionado del grupo que consiste en tetratiomolibdato de propan-1,3-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(1-etil-3-metil-1H-imidazolio); tetratiomolibdato de bis(trimetilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(tetrapropilamonio); tetratiomolibdato de bis(colina); tetratiomolibdato de bis(trietilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(metiltriethylamonio); tetratiomolibdato de bis(1,1-dimetilpirrolidinio); tetratiomolibdato de bis(trimetilbencilamonio); tetratiomolibdato de pentan-1,5-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(viniltrimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(ciclopropilmetiltrimetilamonio); tetratiomolibdato de hexan-1,6-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(acetilcolina); tetratiomolibdato de bis(1,4-dimetilpiridinio); tetratiomolibdato de etilen-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de butan-1,4-bis(trimetilamonio).
- 2.- Un compuesto de tetratiomolibdato, o uno de sus solvatos o hidratos, según la reivindicación 1, que tiene mayor estabilidad bajo condiciones atmosféricas comparado con el tetratiomolibdato de bis(amonio), seleccionado del grupo que consiste en tetratiomolibdato de propan-1,3-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(1-etil-3-metil-1H-imidazolio); tetratiomolibdato de bis(trimetilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(tetrapropilamonio); tetratiomolibdato de bis(colina); tetratiomolibdato de bis(trietilfenilamonio); tetratiomolibdato de bis(metiltriethylamonio); tetratiomolibdato de bis(1,1-dimetilpirrolidinio); tetratiomolibdato de bis(trimetilbencilamonio); tetratiomolibdato de pentan-1,5-bis(trimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(viniltrimetilamonio); tetratiomolibdato de bis(ciclopropilmetiltrimetilamonio); tetratiomolibdato de hexan-1,6-bis(trimetilamonio).
- 3.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 1 o 2, para su uso como un medicamento.
- 4.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 1 o 2, para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cáncer, degeneración macular de tipo húmedo, artritis reumatoide, vascularización aberrante, exceso de niveles de cobre, trastornos del metabolismo del cobre, y obesidad.
- 5.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 4, para su uso en un método para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de próstata, condrosarcoma, angiosarcoma, y carcinoma pulmonar.
- 6.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 4, para su uso en un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedad por priones.
- 7.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 1 o 2, para su uso en un método para tratar la enfermedad de Wilson.
- 8.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 1 o 2, para su uso como un medicamento en combinación con al menos otro agente terapéutico.
- 9.- El compuesto de tetratiomolibdato según la reivindicación 8, en el que dicho otro agente terapéutico se selecciona de agentes quimioterapéuticos, antimetabolitos, análogos de purina, productos naturales, complejos de coordinación de platino, mitoxantrona, hidroxurea, procarbazona, hormonas, antagonistas, agentes antiangiogénesis, inhibidores antiangiogénesis, agentes inductores de la apoptosis, y agentes antiobesidad.
- 10.- El compuesto de tetratiomolibdato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el compuesto de tetratiomolibdato es tetratiomolibdato de bis(colina).
- 11.- El tetratiomolibdato de bis(colina) para su uso en un método para tratar la enfermedad de Wilson.
- 12.- Un compuesto de tetratiomolibdato seleccionado del grupo que consiste en los compuestos de tetratiomolibdato según la reivindicación 1 o 2, para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal, en el que dicho compuesto se administra una o dos veces diarias mediante administración de liberación sostenida oral.

Efecto del tetramolibdato de bis(colina) sobre la proliferación de células endoteliales

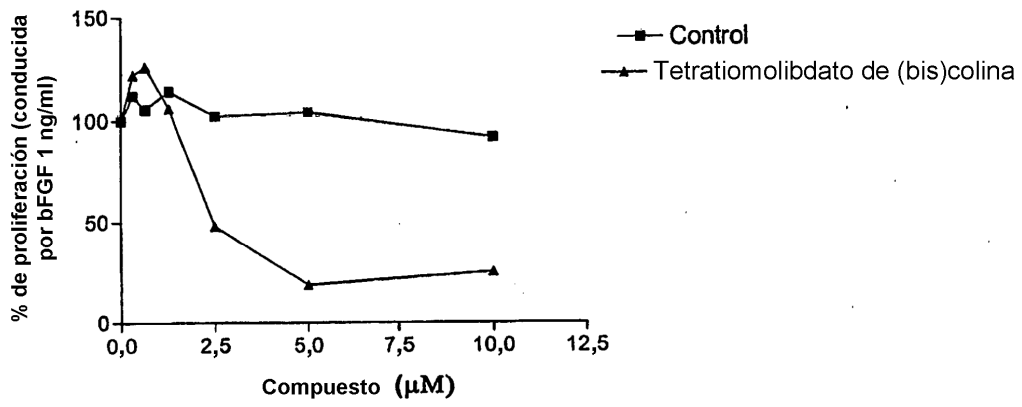


Figura 1

Actividad caspasa-3 en HUVEC incubadas con tetratiomolibdato de bis(colina) durante 72 horas en medio sin suero con bFGF 1 ng/ml

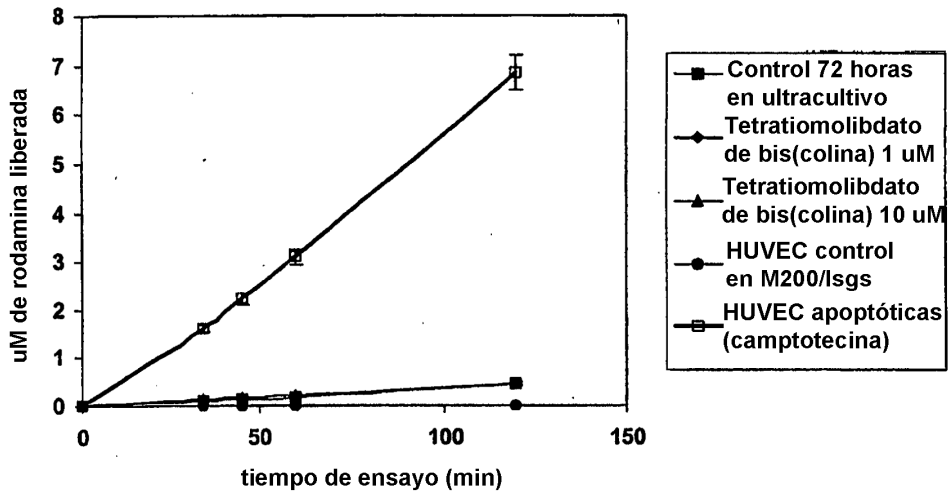


Figura 2

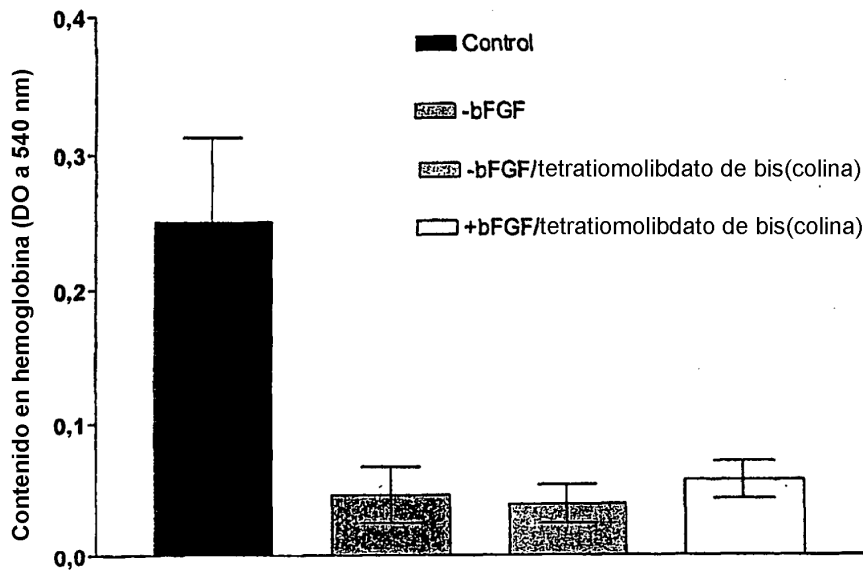


Figura 3

Efecto del cobre o tetratiomolibdato de bis(colina) sobre la expresión de IL-8 de HUVEC en cascada en ultracultivo

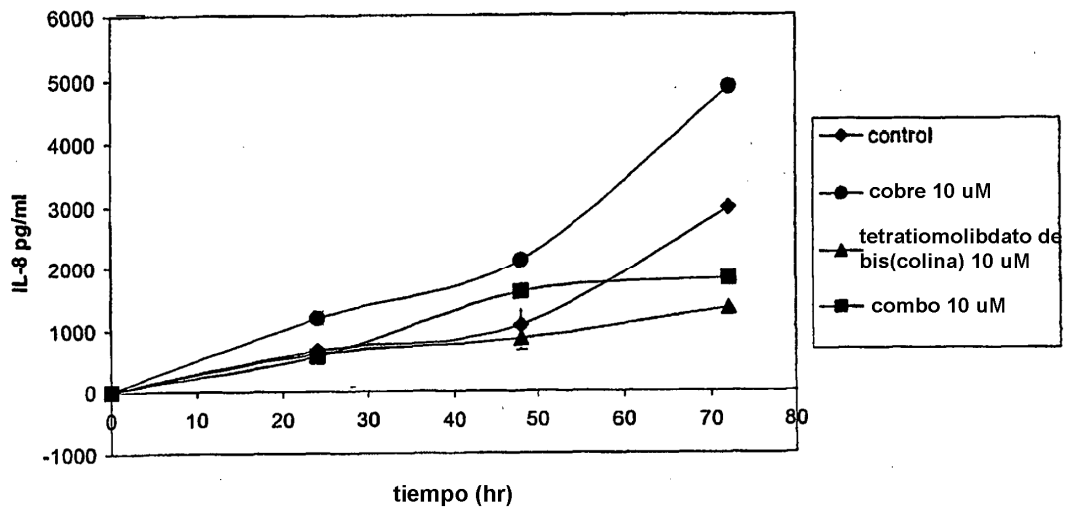


Figura 4

Efecto del cobre o tetratiomolibdato de bis(colina) sobre la expresión de IL-8 por células Thp-1 activadas

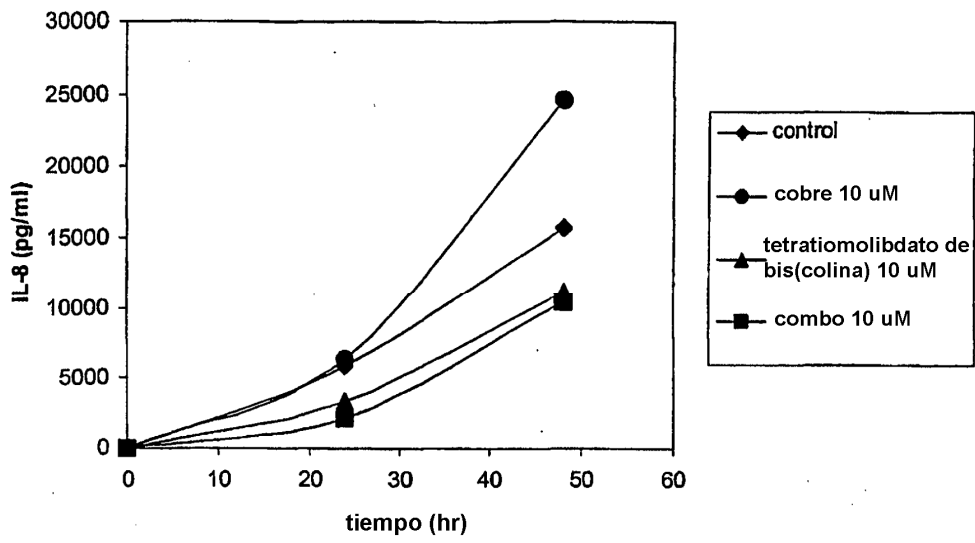


Figura 5

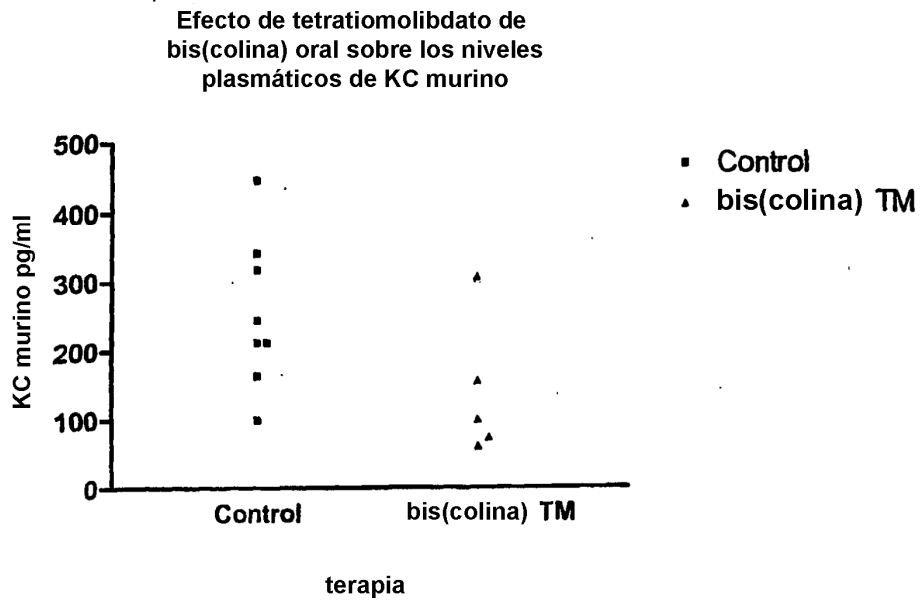


Figura 6