

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 892**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| C07C 233/05 | (2006.01) | A61P 15/08 | (2006.01) |
| C07C 275/00 | (2006.01) | C07C 279/12 | (2006.01) |
| A61K 31/167 | (2006.01) | C07C 279/14 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) | C07C 235/20 | (2006.01) |
| A61P 27/00 | (2006.01) | C07C 235/56 | (2006.01) |
| A61P 31/18 | (2006.01) | C07C 235/60 | (2006.01) |
| A61P 19/02 | (2006.01) | C07C 237/42 | (2006.01) |
| A61P 17/06 | (2006.01) | C07C 237/44 | (2006.01) |
| A61P 9/00 | (2006.01) | C07C 243/38 | (2006.01) |
| A61P 17/02 | (2006.01) | C07C 235/62 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005** **E 11171395 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2380872**

54 Título: **Compuestos policatiónicos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

15.06.2004 US 579282 P

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

17.06.2014

73 Titular/es:

**CELLCEUTIX CORPORATION (100.0%)
100 Cummings Center Suite 151-B
Beverly, Massachusetts 01915, US**

72 Inventor/es:

SHAKER, MOUSA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 468 892 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos policatiónicos y usos de los mismos

Antecedentes de la invención

5 La angiogénesis es el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos sanguíneos ya existentes. Desde el punto de vista fisiológico, la angiogénesis asegura el desarrollo adecuado de los organismos adultos, prepara el útero para la implantación del óvulo fecundado, y desempeña una función clave en la cicatrización de heridas, la reparación de fracturas, y el establecimiento y mantenimiento del embarazo. La angiogénesis también está asociada a afecciones patológicas asociadas a varios estados patológicos tales como cáncer, inflamación, y enfermedades oculares.

10 La angiogénesis o «neovascularización» es un proceso con muchas etapas controlado por el equilibrio entre factores pro- y antiangiogénicos. Las últimas etapas de este proceso implican la proliferación y organización de las células endoteliales (CE) en estructuras tubulares. Se cree que los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) son elementos clave a la hora de estimular el crecimiento y la diferenciación de las células endoteliales. La célula endotelial es el componente fundamental del proceso angiogénico, y responde a muchas citocinas por medio de sus receptores de la superficie celular y los mecanismos de señalización intracelular.

20 El control de la angiogénesis es un proceso complejo que implica la liberación local de factores de crecimiento vascular, moléculas de adhesión de la matriz extracelular, y factores metabólicos. Las fuerzas mecánicas dentro de los vasos sanguíneos también pueden desempeñar su función. Las clases principales de factores de crecimiento endógenos implicados en el crecimiento de los vasos sanguíneos nuevos son la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La cascada de transducción de señales de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK; ERK1/2) interviene tanto en la expresión del gen del VEGF como en el control de la proliferación de las células del endotelio vascular.

25 En el documento WO 02/060488 se describen compuestos de fórmula A-B que, cerca de las células tumorales da, como resultado un resto B cargado positivamente y un resto A sin carga o cargado negativamente, en donde el resto B es capaz de interactuar con sustancias similares a heparina cargadas negativamente e inducir la coagulación de la sangre.

En Dings Ruud P.M. et al. (*Angiogenesis* vol. 6, n.º 2, 1 de enero de 2003, págs. 83-91) se enseña que los péptidos antiangiogénicos son de naturaleza principalmente catiónica.

30 En el documento WO 2004/082634 se enseñan métodos de uso de polímeros y oligómeros anfífilos faciales que incluyen los usos, tales como para agentes antimicrobianos y como antídotos para las complicaciones hemorrágicas asociadas al tratamiento con heparina.

35 Muchas enfermedades y afecciones indeseables se podrían prevenir o aliviar si fuera posible detener el crecimiento y la prolongación de los vasos sanguíneos capilares en ciertas condiciones, en ciertos momentos, o en determinados tejidos. Las enfermedades dependientes de la angiogénesis que se pueden tratar mediante los compuestos descritos en la invención de la presente memoria son las afecciones/enfermedades que requieren o inducen el crecimiento vascular. Por otra parte, la promoción de la angiogénesis es deseable en situaciones en las que se debe establecer o prolongar la vascularización, tales como, pero sin limitarse a ellas, accidente cerebrovascular, cardiopatía, úlceras, esclerodermia e infertilidad.

40 Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis sería un tratamiento útil para limitar que los vasos sanguíneos crezcan sin regulación, por ejemplo, en el crecimiento tumoral. La inhibición de la angiogénesis se puede conseguir mediante la inhibición de la respuesta de las células endoteliales frente a los estímulos angiogénicos tal como se sugirió en Folkman et al., *Cancer Biology* 3:89-96 (1992), en donde se describen ejemplos de inhibidores de la respuesta de las células endoteliales, tales como esteroides angiostáticos, productos procedentes de hongos, tales como fumagilina, factor plaquetario 4, trombospondina, interferón α , análogos de la vitamina D, y D-penicilamina. Se pueden encontrar otras propuestas de inhibidores de la angiogénesis en Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta* 1032:89-118 (1990), Moses et al., *Science* 248:1408-1410 (1990), y las patentes de EE.UU. n.º 5.092.885, 5.112.946, 5.192.744, y 5.202.352.

50 La inhibición de procesos angiogénicos indeseados puede proporcionar un tratamiento terapéutico y/o preventivo contra la angiogénesis inadecuada o indeseada. A la inversa, la estimulación de un proceso angiogénico puede proporcionar un tratamiento terapéutico para los estados patológicos que se beneficiarían de la angiogénesis. Los aspectos de la presente descripción dan a conocer compuestos anfífilos, tales como compuestos policatiónicos, por sus propiedades antiangiogénicas. La capacidad de inhibir la angiogénesis puede proporcionar una herramienta terapéutica eficaz para modular enfermedades y/o afecciones angiogénicas.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a compuestos policatiónicos según se definen en las reivindicaciones y en particular a compuestos policatiónicos según se definen en las reivindicaciones para ser usados en el tratamiento o en la prevención de un enfermedad o trastorno asociado a un exceso de angiogénesis, en donde el compuesto muestra efectos antagonísticos contra la heparina, según se reivindica más adelante. Las realizaciones preferidas de la invención se presentan en las reivindicaciones dependientes.

Descripción de las figuras

La figura 1 representa el efecto de los compuestos policatiónicos en el modelo de angiogénesis de CAM.

La figura 2 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de inhibición que el factor Xa debido a los compuestos policatiónicos de la presente invención, y algunos compuestos policatiónicos de referencia.

La figura 3 es un gráfico que representa el efecto del COMPUESTO 110002, un compuesto policatiónico de referencia, sobre el tiempo de coagulación.

Descripción de la invención

Se debe indicar que, tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno/una", y "el/la" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a una "célula" es una referencia a una o más células, y los equivalentes de la misma conocidos para los expertos en la técnica, etc. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto en la técnica.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor numérico del número con el que se usa. Por lo tanto, aproximadamente el 50% significa en el intervalo de un 45%-55%.

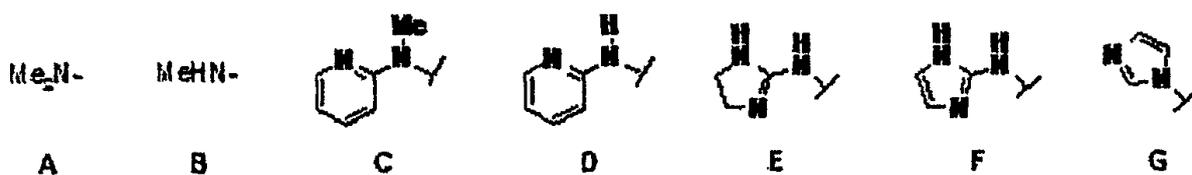
La terminología "angiogénesis" o "neovascularización" se refiere a la generación de un aporte sanguíneo nuevo, p. ej., capilares sanguíneos, vasos, y venas, a partir del tejido de los vasos sanguíneos existentes (p. ej., la vasculatura). El proceso de la angiogénesis puede implicar varios tipos celulares tisulares que incluyen, por ejemplo, las células endoteliales que forman una monocapa de células que tapizan todos los vasos sanguíneos y que intervienen en la regulación de los intercambios entre el torrente sanguíneo y los tejidos circundantes. Se pueden desarrollar vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) a partir de las paredes de los vasos pequeños existentes mediante el crecimiento de las células endoteliales. La angiogénesis también interviene en el crecimiento tumoral, ya que proporciona a los tumores el aporte de sangre necesario para la supervivencia y proliferación (crecimiento) de las células tumorales.

La terminología "paciente" y "sujeto" se refiere todos los animales, lo que incluye a los seres humanos. Los ejemplos de pacientes o sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, y cerdos.

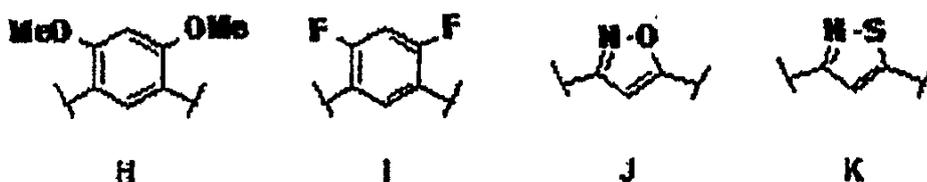
Una "cantidad terapéuticamente eficaz", en referencia a las composiciones farmacéuticas, es una cantidad suficiente para disminuir o prevenir los síntomas asociados a una dolencia o afección médica, para normalizar las funciones corporales en enfermedades o trastornos que dan como resultado el deterioro de determinadas funciones corporales, o que mejoran uno o más de los parámetros de la enfermedad medidos en la práctica clínica. Tal y como se describe en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico es una cantidad suficiente para disminuir o inhibir la angiogénesis.

En la presente memoria se describen procedimientos para modular la angiogénesis de un animal que lo necesita, que comprenden la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico. También se describen en la presente memoria procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un animal que lo necesita, que comprenden la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico.

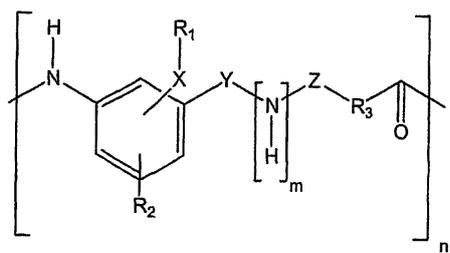
En general, los compuestos policatiónicos presentan preferiblemente un esqueleto rígido o semirrígido, de tal forma que la estructura está limitada torsionalmente, que exhibe grupos laterales cargados positivamente en una cara del esqueleto. Los grupos laterales cargados positivamente están distribuidos de manera óptima a lo largo de la longitud del esqueleto, y están separados de manera óptima del esqueleto por un espaciador carbonado que puede contener opcionalmente uno o más heteroátomos. La libertad torsional a lo largo del esqueleto se puede estabilizar mediante la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, limitaciones estéricas o ciclación. Aunque se describen las fórmulas preferidas de diversos compuestos policatiónicos, tales como arilamidas, hidrazidas, calixarenos y salicilamidas, otros grupos laterales adecuados que se pueden usar para estabilizar la carga positiva incluyen, por ejemplo, (A-G):



Otras aminas que se pueden usar incluyen, por ejemplo, piperidina, 4-aminopiridina, morfolina, y aminotiazol. Opcionalmente, se puede modular la basicidad de un grupo amino mediante la incorporación de 1 o 2 átomos de flúor en uno de los grupos metileno de la cadena. Otros sustituyentes del anillo central que también se pueden usar para hacer más rígido (reducir la libertad torsional) el esqueleto incluyen, por ejemplo, (H-K):



En la presente memoria se describe un compuesto policatiónico que es un compuesto oligomérico de arilamida de fórmula:

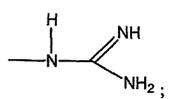


10 en donde

X es O o S;

R_1 es alquilo C_1 - C_9 de cadena lineal o ramificada,

en donde R_1 está sustituido opcionalmente por uno o más $-\text{NH}_2$ o

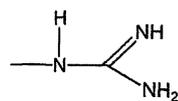


Y es un enlace o $-\text{C}(=\text{O})-$;

15 Z es un enlace o $-\text{C}(=\text{O})-$;

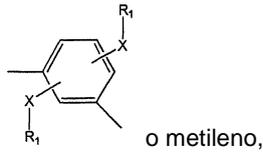
R_2 es hidrógeno o alquilo C_1 - C_9 de cadena lineal o ramificada;

en donde dicho R_2 está sustituido opcionalmente con uno o más $-\text{NH}_2$ o



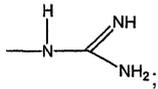
o R_2 es $-\text{X}-\text{R}_1$;

R_3 es



en donde dicho metileno está sustituido con alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada,

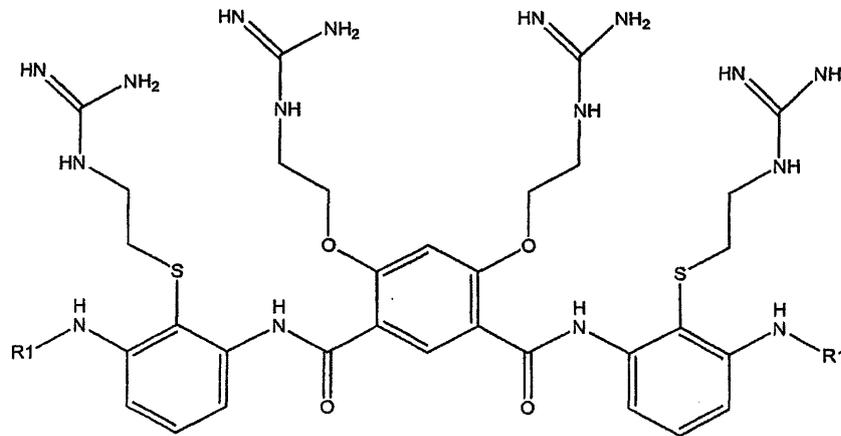
en donde dicho alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂ o



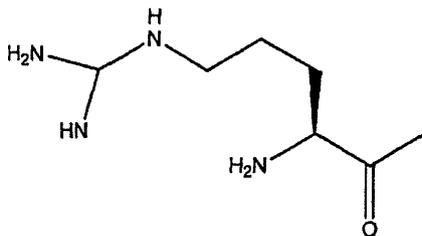
5 n es 2 a 10; y

m es 1 o 2.

También se describe un compuesto oligomérico de arilamida de la fórmula:

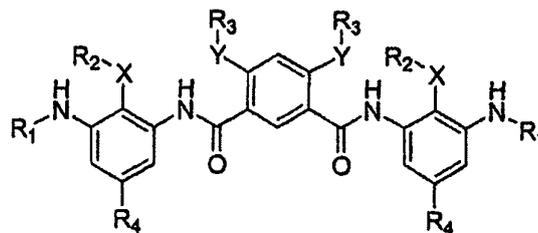


en donde R₁ es



10

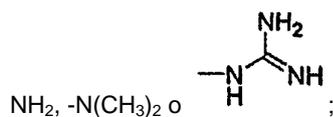
El compuesto puede ser una arilamida de la fórmula:



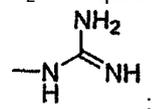
X es O o S;

Y es O o S;

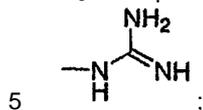
15 R₁ es H o -C(=O)-A, un alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con uno o más -



R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o

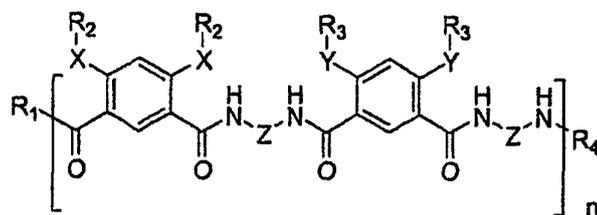


R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



R₄ es H, -B o -C(=O)-O-B, en donde B es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado.

También se describe un compuesto policatiónico, que es una hidrazida de la fórmula:



en donde

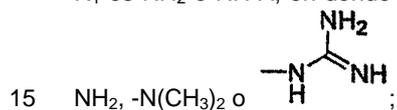
10 n = 1 a 10;

X es O o S;

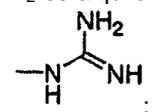
Y es O o S;

Z es un enlace, alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, o un 1,4-ciclohexilo

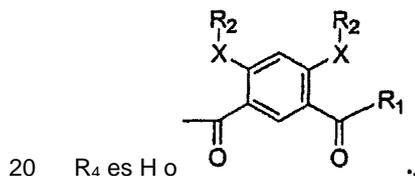
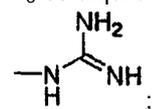
R₁ es NH₂ o NH-A, en donde A es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con -



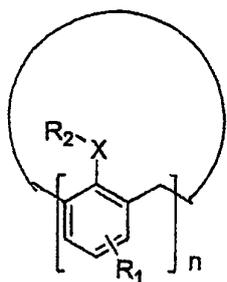
R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



También se describe un compuesto policatiónico que es un calixareno de la fórmula:



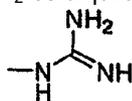
en donde

$n = 2$ a 8 , más preferiblemente 4 a 8 ;

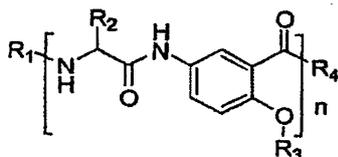
X es un enlace, O o $-O-CH_2-C(=O)-O-$,

5 R_1 es $-A$ o $-O-A$, en donde A es alquilo C_1-C_9 lineal o ramificado;

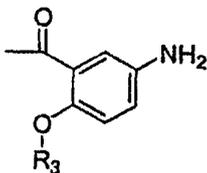
R_2 es alquilo C_1-C_9 lineal o ramificado, en donde R_2 está sustituido opcionalmente con uno o más $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$ o



De acuerdo con un aspecto de la invención, el compuesto policatiónico es una salicilamida de la fórmula:



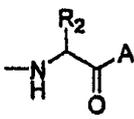
10 n es 2 a 10 ;



R_2 es H o

R_2 es alquilo C_1-C_9 lineal o ramificado, en donde R_2 es tal y como se define en las reivindicaciones;

R_3 es alquilo C_1-C_9 lineal o ramificado, en donde R_3 es tal y como se define en las reivindicaciones;

R_4 es OH, NH_2 o , en donde A es OH o NH_2 .

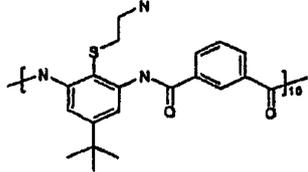
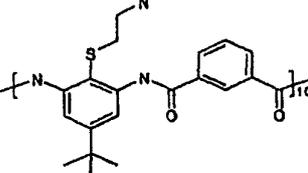
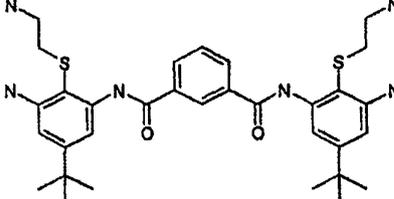
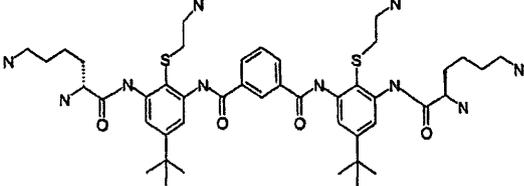
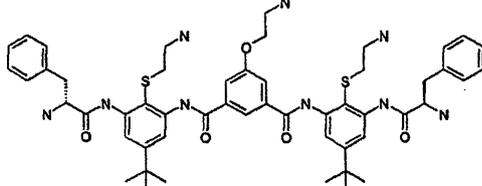
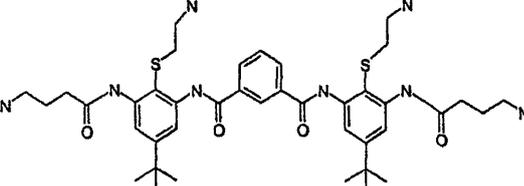
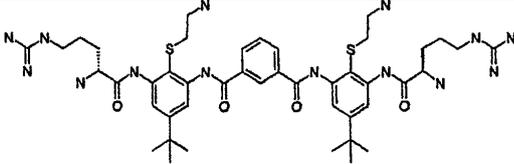
15 El compuesto policatiónico se podría seleccionar del grupo que consiste en compuesto 1, compuesto 2, compuesto 3, compuesto 4, compuesto 5, compuesto 6, compuesto 7, compuesto 8, compuesto 9, compuesto 10, compuesto 11, compuesto 12, compuesto 13, compuesto 14, compuesto 15, compuesto 16, compuesto 17, compuesto 18, compuesto 19, compuesto 20, compuesto 21, compuesto 22, compuesto 23, compuesto 24, compuesto 25, compuesto 26, compuesto 27, compuesto 28, compuesto 29, compuesto 30, compuesto 31, compuesto 32, compuesto 33, compuesto 34, compuesto 35, compuesto 36, compuesto 37, compuesto 38, compuesto 39, compuesto 40, compuesto 41, compuesto 42, compuesto 44, compuesto 45, compuesto 47, compuesto 48, compuesto 49, compuesto 50, compuesto 51, compuesto 52, compuesto 53, compuesto 54 y compuesto 55, tal y como se representa más adelante en la tabla 1.

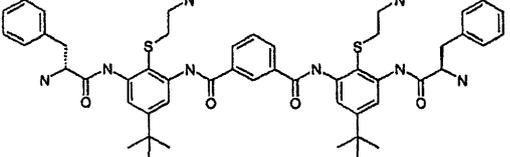
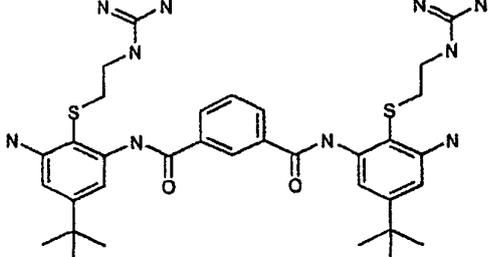
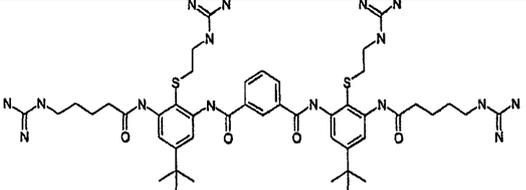
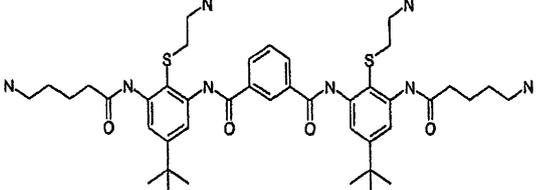
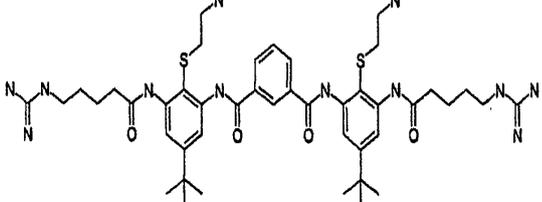
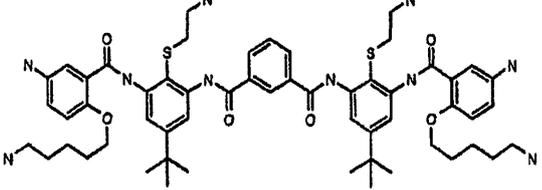
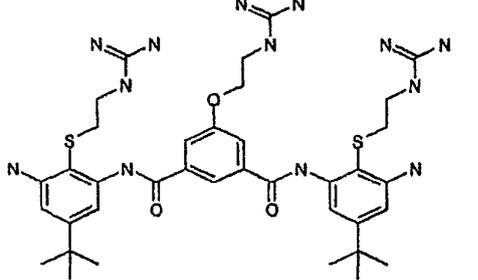
De acuerdo con la invención, el compuesto de selecciona del compuesto 50.

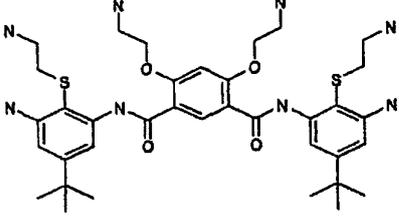
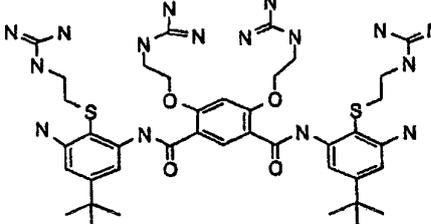
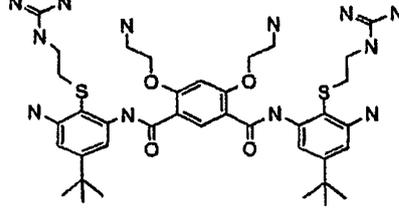
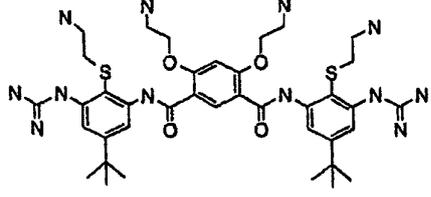
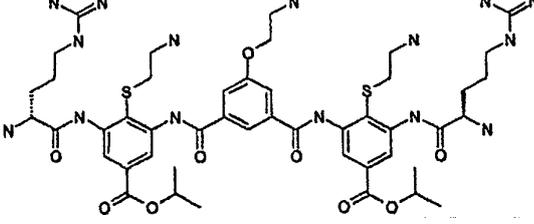
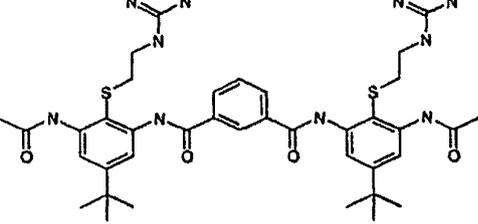
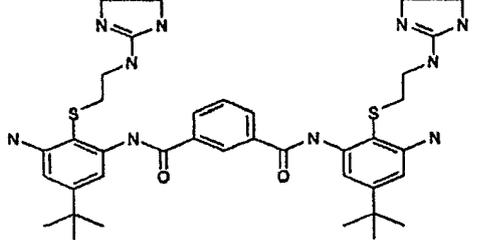
25 Aunque el compuesto 1 y el compuesto 2 comprenden la misma estructura de arilamida, los compuestos 1 y 2 se sintetizan en condiciones diferentes y muestran purezas diferentes. Durante la polimerización se usó el DCM (diclorometano) como disolvente para el compuesto 2 y se usó NMP (1-metil-2-pirrolidiona) para el compuesto 1. La

polimerización es menos eficaz en NMP, por lo tanto el compuesto 1 es $n = 2$ a 10, y $n = 10$ para el compuesto 2.

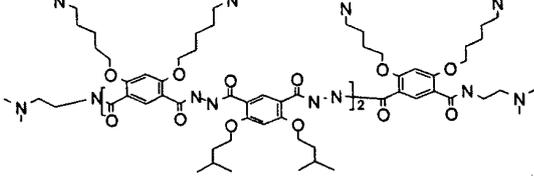
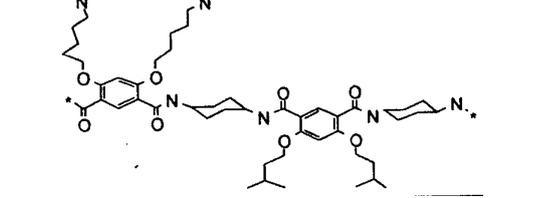
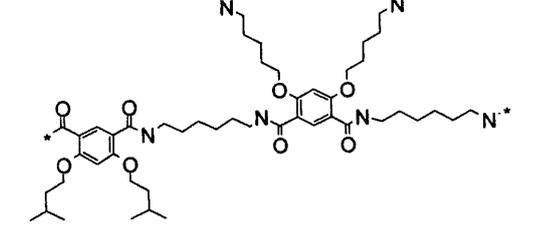
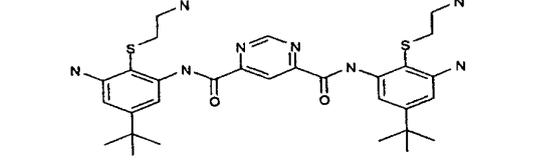
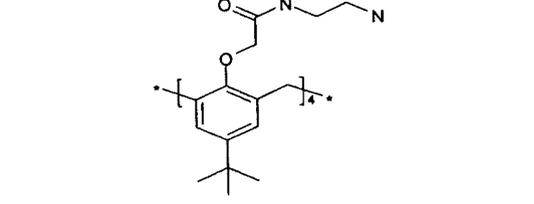
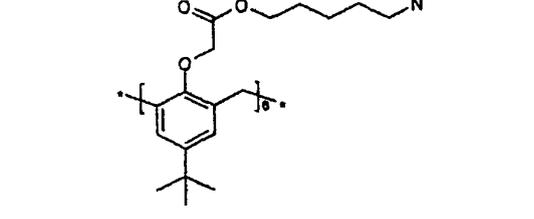
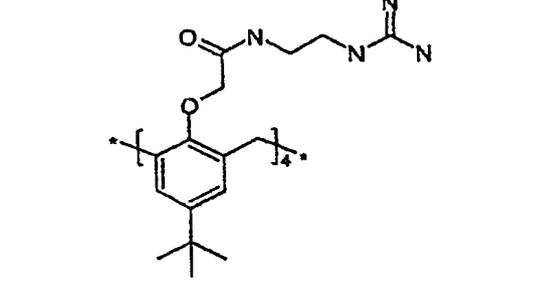
Tabla 1. Compuestos policatiónicos*.

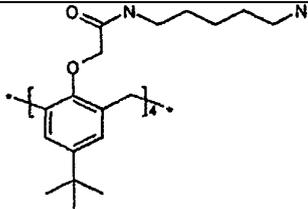
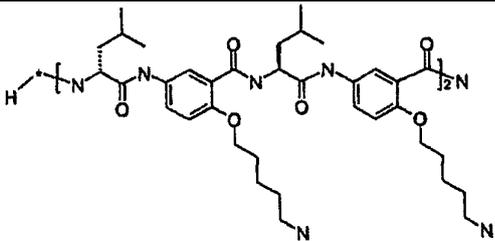
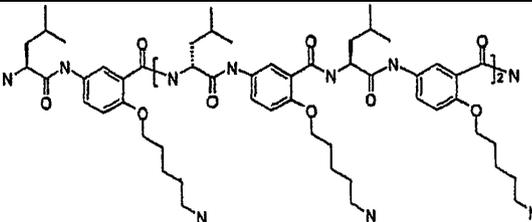
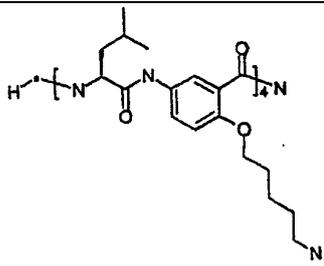
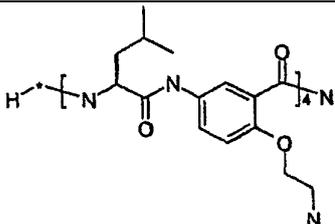
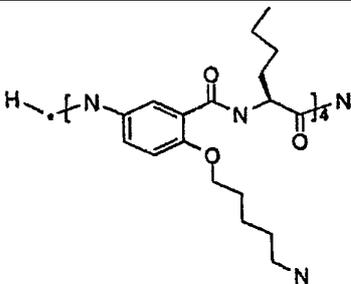
| Compuesto | Estructura |
|-------------|--|
| Compuesto 1 |  |
| Compuesto 2 |  |
| Compuesto 3 |  |
| Compuesto 4 |  |
| Compuesto 5 |  |
| Compuesto 6 |  |
| Compuesto 7 |  |

| Compuesto | Estructura |
|--------------|--|
| Compuesto 8 |  |
| Compuesto 9 |  |
| Compuesto 10 |  |
| Compuesto 11 |  |
| Compuesto 12 |  |
| Compuesto 13 |  |
| Compuesto 14 |  |

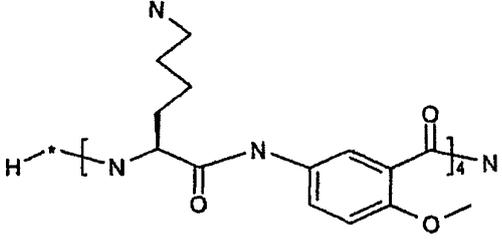
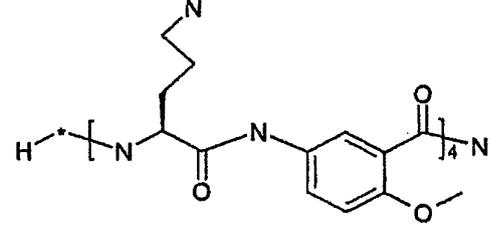
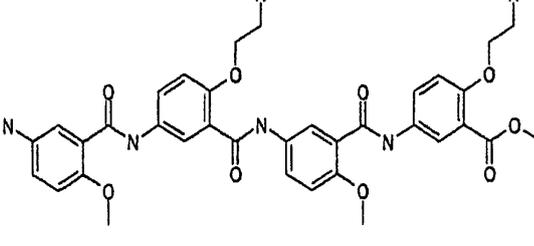
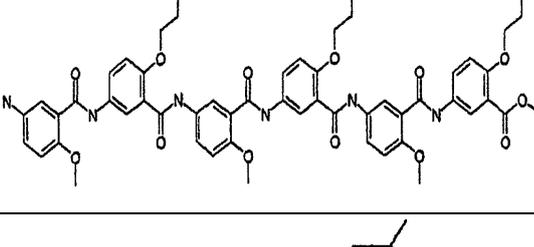
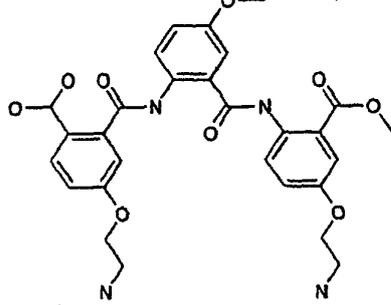
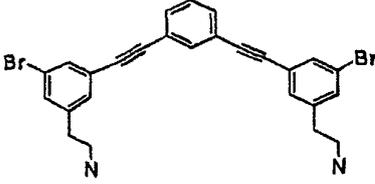
| Compuesto | Estructura |
|--------------|--|
| Compuesto 15 |  |
| Compuesto 16 |  |
| Compuesto 17 |  |
| Compuesto 18 |  |
| Compuesto 19 |  |
| Compuesto 20 |  |
| Compuesto 21 |  |

| Compuesto | Estructura |
|--------------|------------|
| Compuesto 22 | |
| Compuesto 23 | |
| Compuesto 24 | |
| Compuesto 25 | |
| Compuesto 26 | |
| Compuesto 27 | |
| Compuesto 28 | |
| Compuesto 29 | |

| Compuesto | Estructura |
|--------------|--|
| Compuesto 30 |  |
| Compuesto 31 |  |
| Compuesto 32 |  |
| Compuesto 33 |  |
| Compuesto 34 |  |
| Compuesto 35 |  |
| Compuesto 36 |  |

| Compuesto | Estructura |
|--------------|--|
| Compuesto 37 |  |
| Compuesto 38 |  |
| Compuesto 39 |  |
| Compuesto 40 |  |
| Compuesto 41 |  |
| Compuesto 42 |  |
| Compuesto 43 | [Eliminado] |

| Compuesto | Estructura |
|--------------|-------------|
| Compuesto 44 | |
| Compuesto 45 | |
| Compuesto 46 | [Eliminado] |
| Compuesto 47 | |
| Compuesto 48 | |
| Compuesto 49 | |

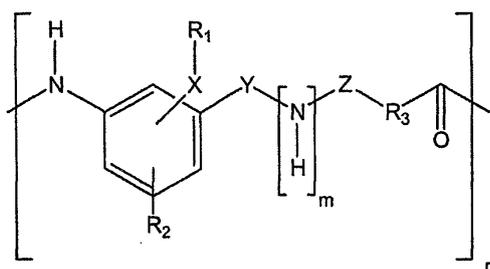
| Compuesto | Estructura |
|--------------|--|
| Compuesto 50 |  |
| Compuesto 51 |  |
| Compuesto 52 |  |
| Compuesto 53 |  |
| Compuesto 54 |  |
| Compuesto 55 |  |

* Sólo los compuestos 42, 44, 45, 47 y 49 a 51 son parte de la invención; los otros compuestos son compuestos de referencia.

Otros compuestos policatiónicos útiles en la presente descripción son los descritos en la patente internacional WO 02/072007 titulada «Facially Amphiphilic Polymers as Anti-Infective Agents» registrada el 7 de marzo de 2002, la patente internacional WO 02/100295 titulada «Facially Amphiphilic Polymers as Anti-Infective Agents» registrada el 7 de marzo de 2002 y la patente internacional WO 94/082634 titulada «Facially Amphiphilic Polymers and Oligomers and Uses Thereof», registrada el 17 de marzo de 2004.

En la presente memoria se describe un compuesto para la modulación de la angiogénesis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico.

En la presente memoria se describe un compuesto policatiónico que es un un compuesto oligomérico de arilamida de la fórmula:

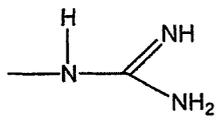


en donde

X es O o S;

R₁ es alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada,

15 en donde R₁ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂ o

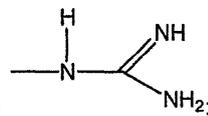


Y es un enlace o

Z es un enlace o

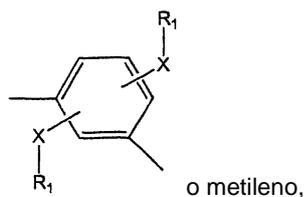
R₂ es hidrógeno o alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada;

20 en donde dicho R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂ o



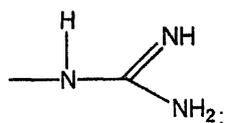
o R₂ es -X-R₁;

R₃ es



en donde dicho metileno está sustituido con alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada,

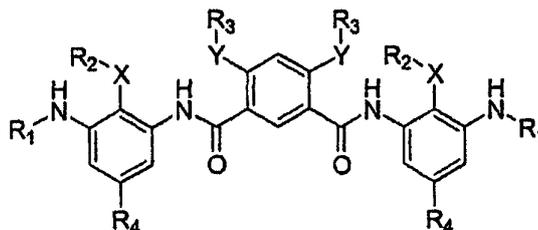
en donde dicho alquilo C₁-C₉ de cadena lineal o ramificada está sustituido opcionalmente con uno o más NH₂ o



n es 2 a 10; y

m es 1 o 2.

El compuesto puede ser una arilamida de la fórmula:

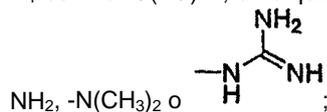


5

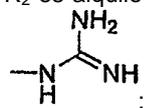
X es O o S;

Y es O o S;

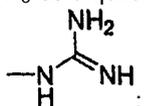
R₁ es H o -C(=O)-A, un alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con uno o más -



10 R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o

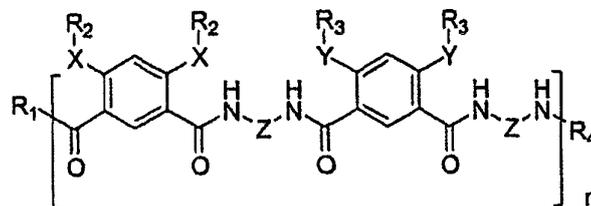


R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



R₄ es H, -B o -C(=O)-O-B, en donde B es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado.

15 También se describe un compuesto policatiónico que es una hidrazida de la fórmula:



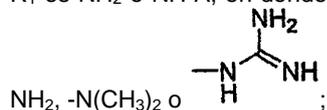
n = 1 a 10;

X es O o S;

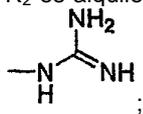
Y es O o S;

20 Z es un enlace, alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, o un 1,4-ciclohexilo

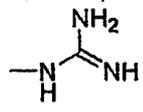
R₁ es NH₂ o NH-A, en donde A es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con -



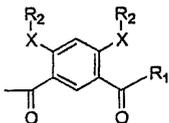
R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



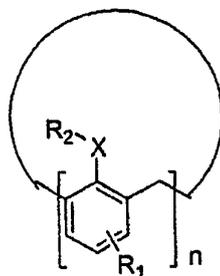
R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



5 R₄ es H o



También se describe un compuesto policatiónico que es un calixareno de la fórmula:

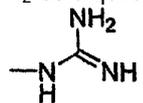


n = 2 a 8, más preferiblemente 4 a 8;

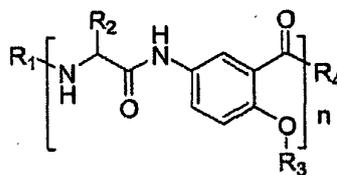
X es un enlace, O o -O-CH₂-C(=O)-O-

10 R₁ es -A o -O-A, en donde A es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado;

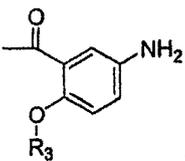
R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



En una realización de la invención, el compuesto policatiónico es una salicilamida de fórmula:



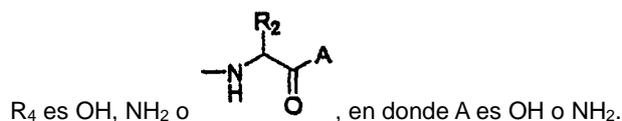
15 n es 2 a 10;



R₁ es H o

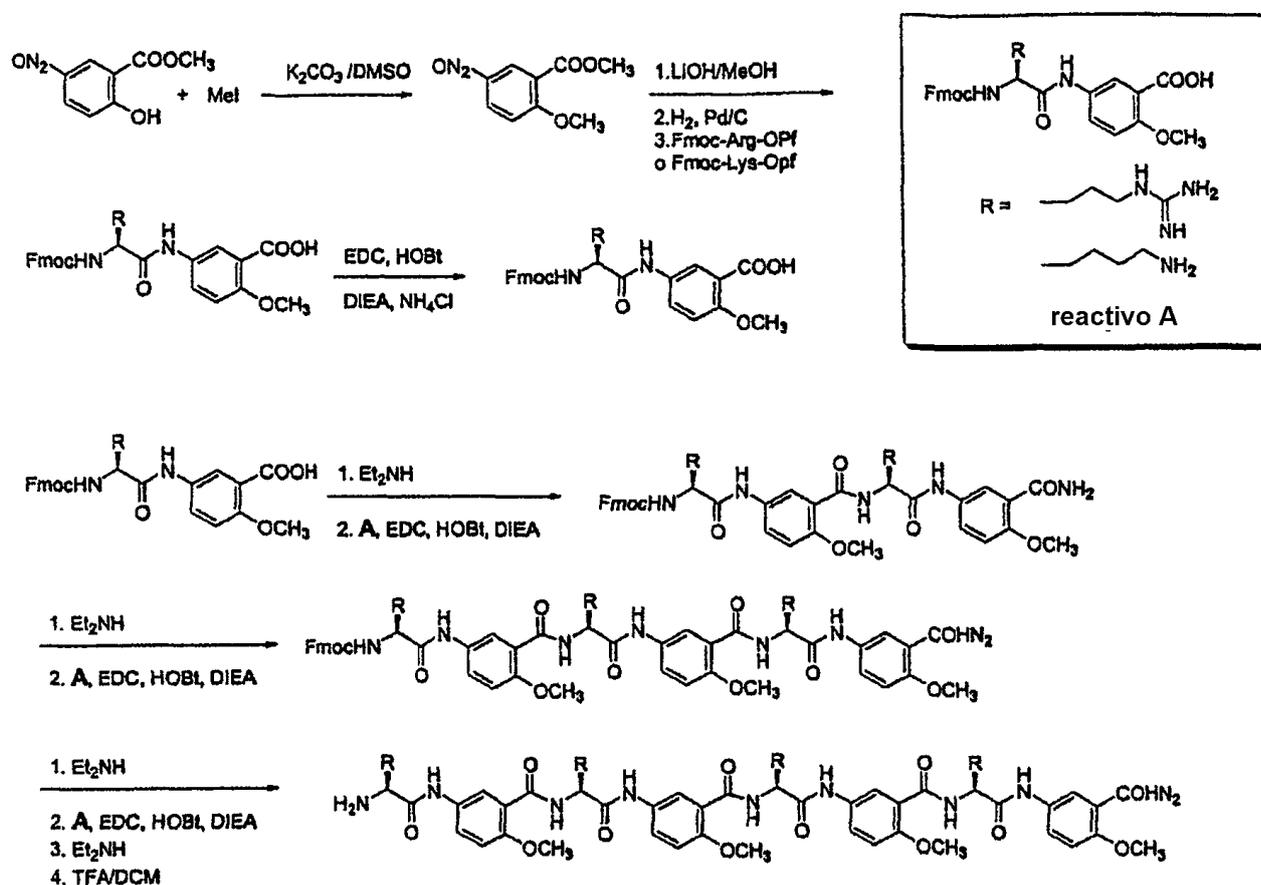
R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ es según se define en las reivindicaciones;

R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ es según se define en las reivindicaciones;



- El compuesto puede comprender compuesto 1, compuesto 2, compuesto 3, compuesto 4, compuesto 5, compuesto 6, compuesto 7, compuesto 8, compuesto 9, compuesto 10, compuesto 11, compuesto 12, compuesto 13, compuesto 14, compuesto 15, compuesto 16, compuesto 17, compuesto 18, compuesto 19, compuesto 20, compuesto 21, compuesto 22, compuesto 23, compuesto 24, compuesto 25, compuesto 26, compuesto 27, compuesto 28, compuesto 29, compuesto 30, compuesto 31, compuesto 32, compuesto 33, compuesto 34, compuesto 35, compuesto 36, compuesto 37, compuesto 38, compuesto 39, compuesto 40, compuesto 41, compuesto 42, compuesto 44, compuesto 45, compuesto 47, compuesto 48, compuesto 49, compuesto 50, compuesto 51, compuesto 52, compuesto 53, compuesto 54, compuesto 55, o una combinación de los mismos.
- 10 De acuerdo con la invención reivindicada, el compuesto comprende compuesto 42, compuesto 44, compuesto 45, compuesto 47, compuesto 49, compuesto 50, compuesto 51 o una combinación de los mismos.

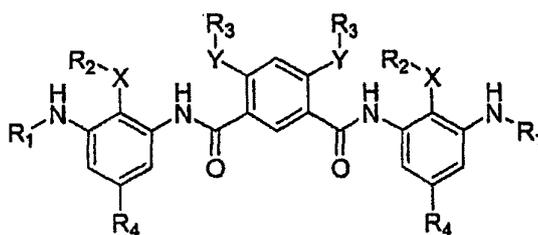
Se pueden sintetizar compuestos policatiónicos de salicilamida como sigue:



- 15 Se da a conocer un compuesto para modular la angiogénesis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico.

El compuesto puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico para favorecer la angiogénesis. De acuerdo con la invención, el compuesto contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto policatiónico tal y como se define en las reivindicaciones para inhibir la angiogénesis.

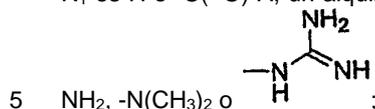
Se describe un compuesto que es una arilamida de la fórmula:



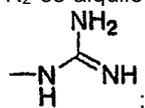
X es O o S;

Y es O o S;

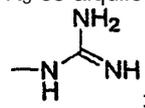
R₁ es H o -C(=O)-A, un alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con uno o más -



R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o

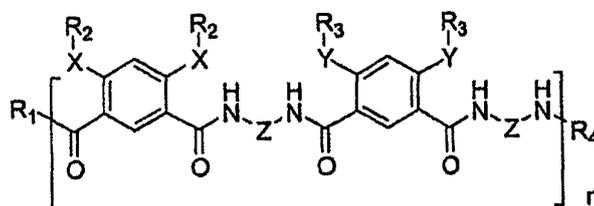


R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o



10 R₄ es H, -B o -C(=O)-O-B, en donde B es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado.

También se describe un compuesto policatiónico que es una hidrazida de la fórmula:



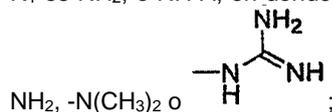
n = 1 a 10;

X es O o S;

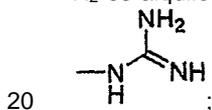
15 Y es O o S;

Z es un enlace, alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, o un 1,4-ciclohexilo;

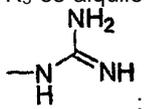
R₁ es NH₂, o NH-A, en donde A es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde A está sustituido opcionalmente con -

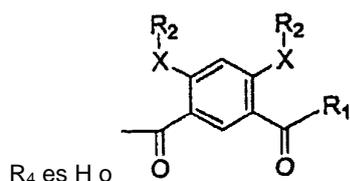


R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o

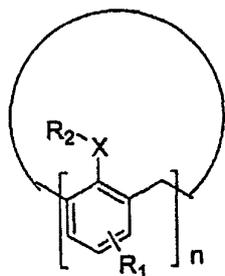


R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o





Se describe un compuesto policatiónico que es un calixareno de la fórmula:

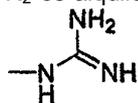


n = 2 a 8, más preferiblemente 4 a 8;

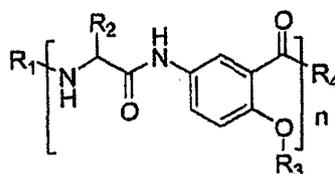
5 X es un enlace, O o -O-CH₂-C(=O)-O-,

R₂ es -A o -O-A, en donde A es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado;

R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado en donde R₂ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, -N(CH₃)₂ o

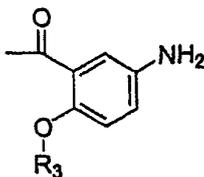


En una realización de la invención, el compuesto policatiónico es una salicilamida de la fórmula:



10

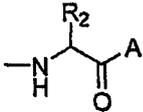
n es 2 a 10;



R₂ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₂ es según se define en las reivindicaciones;

R₃ es alquilo C₁-C₉ lineal o ramificado, en donde R₃ es según se define en las reivindicaciones;

15

R₄ es OH, NH₂, o , en donde A es OH o NH₂.

Los compuestos policatiónicos descritos en la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la angiogénesis.

20

Los compuestos policatiónicos se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado a una angiogénesis insuficiente. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, accidente cerebrovascular, cardiopatía, úlceras, infertilidad y esclerodermia.

Los compuestos policatiónicos de acuerdo con la invención se usan para tratar o prevenir una enfermedad o

trastorno asociado a un exceso de angiogénesis. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, cáncer, artritis reumatoide, psoriasis y ceguera.

5 En general, el cáncer se refiere a cualquier crecimiento o tumor maligno provocado por una división celular anormal y descontrolada; se puede extender a otras partes del organismo por medio del sistema linfático o del torrente sanguíneo. El cáncer incluye tanto los tumores sólidos como los tumores de transmisión hemática. Los tumores sólidos incluyen, por ejemplo, el sarcoma de Kaposi, hemangiomas, tumores sólidos, tumores de transmisión hemática, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de colon, rhabdomyosarcoma, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, y osteosarcoma. La angiogénesis también está asociada a los tumores de transmisión hemática, tales como leucemias, cualquiera de las diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se da una proliferación descontrolada de leucocitos, normalmente acompañada por anemia, alteración de la coagulación sanguínea, y agrandamiento de los nódulos linfáticos, hígado y bazo. Se cree que la angiogénesis interviene en las anomalías de la médula ósea que dan lugar a tumores similares a la leucemia.

15 La enfermedad o trastorno puede ser cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, glioblastoma, neuroblastoma, ceguera, degeneración macular, retinopatía diabética, trasplante de córnea, degeneración miópica, artritis, artritis reumatoide, y psoriasis. Por ejemplo cánceres, artritis inflamatoria (tal como artritis reumatoide), retinopatía diabética, así como otras enfermedades neovasculares del ojo (por ejemplo, neovascularización córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular y degeneración macular), malformaciones arteriovenosas, afecciones de sangrado excesivo (menorragia), síndrome de Osler-Webber, angiogénesis miocárdica, neovascularización de placas, telangiectasia, artropatía hemofílica, angiofibroma, y granulación de heridas. Las composiciones antiangiogénicas dadas a conocer en la presente memoria son útiles también para el tratamiento de enfermedades de una estimulación excesiva o anormal de las células endoteliales. Estas enfermedades incluyen adherencias intestinales, enfermedad de Crohn, aterosclerosis y cicatrices hipertróficas (es decir, queloides).

25 Otros trastornos adecuados debidos a la angiogénesis que se pueden tratar o prevenir con los compuestos policatiónicos que se dan a conocer incluyen tumores y trastornos asociados al cáncer (p. ej., crecimiento tumoral retiniano, tumores benignos (p. ej., hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas, y granulomas piógenos), tumores sólidos, tumores de transmisión hemática (p. ej., leucemias, angiofibromas, y sarcoma de Kaposi), metástasis tumorales, y otros cánceres que requieren la neovascularización para mantener el crecimiento tumoral), trastornos neovasculares oculares (p. ej., retinopatía diabética, degeneración macular, retinopatía de la prematuridad, glaucoma neovascular, rechazo del injerto de córnea, y otros trastornos mediados por la angiogénesis ocular), trastornos inflamatorios (p. ej., inflamación inmunitaria y no inmunitaria, artritis reumatoide, reumatismo articular crónico, enfermedades inflamatorias intestinales, psoriasis, y otros trastornos inflamatorios crónicos), endometriosis, otros trastornos asociados a una invasión inadecuada o inoportuna de vasos (p. ej., fibroplasia retrolenticular, rubeosis, y proliferación de capilares en las placas ateroscleróticas y osteoporosis), síndrome de Osler-Webber, angiogénesis miocárdica, neovascularización de placas, telangiectasia, artropatía hemofílica, y granulación de heridas. Los expertos en la técnica conocen otras enfermedades en las que la angiogénesis interviene en el mantenimiento o la progresión del estado patológico.

40 Los compuestos policatiónicos se pueden usar junto con otros inhibidores de la angiogénesis. Se conocen en la técnica inhibidores angiogénicos, y se pueden preparar mediante procedimientos conocidos. Para una descripción de inhibidores angiogénicos y dianas véase, por ejemplo, Chen et al., *Cancer Res.* 55:4230-4233 (1995), Good et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6629-6628 (1990), O'Reilly et al., *Cell* 79:315-328 (1994), Parangi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2002-2007 (1996), Rastinejad et al., *Cell* 56:345-355 (1989), Gupta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7799-7803 (1995), Maione et al., *Science* 247:77-79 (1990), Angiolillo et al., *J. Exp. Med.* 182:155-162 (1995), Strieter et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210:51-57 (1995); Voest et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 87:581-586 (1995), Cao et al., *J. Exp. Med.* 182:2069-2077 (1995), y Clapp et al., *Endocrinology* 133:1292-1299 (1993). Para una descripción de otros inhibidores angiogénicos véase, por ejemplo, Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta.*, 1032:89-118 (1990), Moses et al., *Science*, 248:1408-1410 (1990), Ingber et al., *Lat Invest.*, 59:44-51 (1988), y las patentes de EE.UU. n.º 5.092.885 y 5.112.946.

50 Los compuestos policatiónicos se pueden usar junto con otros tratamientos, tales como los tratamientos antiinflamatorios normales, oftalmoterapias normales, dermatoterapias normales, radioterapia, cirugía de tumores, y quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para el control del establecimiento de metástasis. La administración del inhibidor de la angiogénesis se lleva a cabo en general durante o después de la quimioterapia en un momento en el que el tejido tumoral debería responder al ataque tóxico mediante la inducción de la angiogénesis para recuperarse mediante la provisión de un suministro de sangre y nutrientes al tejido tumoral. Además, se prefiere administrar tales inhibidores de la angiogénesis tras una cirugía en donde se han eliminado los tumores sólidos para prevenir de la metástasis. Los agentes citotóxicos o quimioterápicos son los conocidos en la técnica, tales como aziridina, tiotepa, sulfonato de alquilo, nitrosoureas, complejos de platino, agentes alquilantes clásicos de NO, análogos de folato, análogos de purinas, análogos de adenosina, análogos de pirimidinas, urea sustituida, antibióticos antitumorales, agentes de microtúbulos, y asparaginasa.

60 El uso de compuestos policatiónicos para la inhibición de procesos mediados por la angiogénesis puede ser en

monoterapia o en combinación con otros tratamientos existentes antiinflamatorios, antiangiogénicos, antineoplásicos, y oculares. Los compuestos policatiónicos representan una estrategia eficaz para la prevención y el tratamiento de trastornos mediados por la angiogénesis en el cáncer, en las enfermedades inflamatorias, y en las oculares.

5 Los compuestos descritos anteriormente se pueden administrar en una formulación que incluye compuestos policatiónicos y derivados junto con un vehículo aceptable para el modo de administración. Se puede usar cualquier formulación o sistema de administración de fármacos que contenga los ingredientes activos, que sea adecuado para el uso deseado, como conocen en general los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración oral, rectal, tópica o parenteral (que incluye subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa). El vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable
10 en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor del mismo.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen por comodidad una preparación acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Así, tales formulaciones pueden contener de manera conveniente agua destilada, 5% de dextrosa en agua destilada o solución salina. Las formulaciones útiles también incluyen disoluciones concentradas o sólidos que contienen el compuesto de fórmula (I), que tras la dilución con un disolvente adecuado proporcionan una disolución adecuada para la administración parenteral anterior.
15

Para la administración enteral se puede incorporar un compuesto en un vehículo inerte en unidades discretas tales como cápsulas, obleas, comprimidos o pastillas, y cada una contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de un polvo o gránulos; o una suspensión o disolución en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso, p. ej., un jarabe, un elixir, una emulsión o una poción. Los vehículos adecuados pueden ser almidones o azúcares, e incluyen lubricantes, aromatizantes, aglutinantes, y otros materiales de la misma naturaleza.
20

Se puede producir un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Se pueden preparar comprimidos en una máquina adecuada por compresión del compuesto activo en una forma de flujo libre, p. ej., un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con ingredientes secundarios, p. ej., aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, tensioactivos o dispersantes. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto activo pulverizado con cualquier vehículo adecuado.
25

Se puede hacer un jarabe o suspensión mediante la adición del compuesto activo a una disolución acuosa concentrada de un azúcar, p. ej., sacarosa, a la que se pueden añadir también otros ingredientes secundarios. Tales ingredientes secundarios pueden incluir aromatizantes, un retardador de la cristalización del azúcar o un agente para incrementar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, p. ej., un polialcohol, por ejemplo, glicerol o sorbitol.
30

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con un vehículo convencional, p. ej., manteca de cacao o Witepsol S55 (marca comercial de Dynamite Nobel Chemical, Alemania), para una base de supositorio.
35

De manera alternativa, el compuesto se puede administrar en liposomas o microesferas (o micropartículas). Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para preparar liposomas y microesferas para la administración a un paciente. La patente de los EE.UU. n.º 4.789.734 describe procedimientos para encapsular materiales biológicos en liposomas. Básicamente, el material se disuelve en una disolución acuosa, se añaden los fosfolípidos y lípidos adecuados, junto con tensioactivos si es necesario, y el material se somete a diálisis o sonicación, según sea necesario. Se proporciona una revisión de los procedimientos conocidos en G. Gregoriadis, capítulo 14, "Liposomes", *Drug Carriers in Biology and Medicine*, págs. 287-341 (Academic Press, 1979).
40

Los expertos en la técnica conocen bien las micro-esferas o nano-esferas formadas de polímeros o proteínas, y se pueden adaptar para que atraviesen el tubo digestivo directamente hasta el torrente sanguíneo. Otra posibilidad es que el compuesto se puede incorporar y las microesferas/nanoesferas, o una mezcla de ambas, e implantarse para una liberación lenta a lo largo de un periodo de tiempo que oscila de días a meses. Véanse, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. n.º 4.906.474, 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, *TIPS* 19:155-157 (1998).
45

Los compuestos policatiónicos descritos en la presente invención exhiben efectos antiangiogénicos *in vitro* e *in vivo*. Además, los compuestos policatiónicos de la presente invención exhiben efectos antagonistas contra la heparina. Aunque no se pretende quedar limitado por esta teoría, los efectos antiangiogénicos de los compuestos policatiónicos se pueden deber, al menos en parte, a la capacidad de los compuestos policatiónicos de antagonizar la función de la heparina a la hora de facilitar la activación de los receptores del FGF y del VEGF.
50

Para los ejemplos siguientes, se obtuvieron diversos materiales como sigue. Todos los reactivos fueron de grado químico y se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) o a través de VWR Scientific (Bridgeport, NJ). Acetato de cortisona, seroalbúmina bovina (SAB), y disolución de gelatina (tipo B de piel bovina al 2%) se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El medio de crecimiento M199 con las sales de Earl, FGF básico, complemento de insulina-transferrina-selenio-G (I-T-Se) a 100X, solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco con y sin Ca⁺² y Mg⁺², y EDTA a 0,5 M se obtuvieron de Gibco BRL (Grand Island, NY). Las células
55

endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), el medio basal para células endoteliales (sin suero, EBM), el medio de crecimiento endotelial (EGM) (complementado con factores de crecimiento, suero bovino fetal), y disolución de tripsina al 0,025%/EDTA al 0,01% se adquirieron a Clonetics Inc. (San Diego, CA). Las células de tumor de próstata humano (TSU-Pr) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). La matriz Matrigel® y el colágeno humano de tipo III se adquirieron de Becton Dickinson (Bedford, MA). Las disoluciones de fijación y tinción HEMA-3 se adquirieron de Biochemical Sciences, Inc. (Swedesboro, NJ). Se adquirieron huevos de gallina fecundados de Charles River Laboratories, SPAFAS Avian Products & Services (North Franklin, CT). La neovascularización *in vivo* se examinó mediante el procedimiento descrito previamente por Auerbach et al. (Auerbach et al., *J. Dev. Biol.*, 41:391-394 (1974)).

10 Ejemplos

Ejemplo 1

El ejemplo siguiente ilustra el efecto antiangiogénico de los compuestos policatiónicos ejemplares de la presente invención. Se adquirieron embriones de diez días de edad a Spafas, Inc. (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con un 55% de humedad relativa. En la oscuridad con la ayuda de una lámpara de ovoscopia, se perforó un pequeño orificio en la cáscara que cubría la cámara de aire con una aguja hipodérmica. Se perforó un segundo orificio en la cáscara sobre el costado del huevo directamente a lo largo de una porción avascular de la membrana embrionaria, como se observó durante la ovoscopia. Se creó una falsa cámara de aire por debajo del segundo orificio mediante la aplicación de una presión negativa en el primer orificio, lo que provocó que la membrana corioalantoidea (CAM) se separase de la cáscara. Se recortó una ventana, de aproximadamente 1,0 cm², en la cáscara a lo largo de la CAM desprendida con el uso de una pequeña muela abrasiva artesanal (Dremel, división de Emerson Electric Company Racine, Wisconsin) que permitió el acceso directo a la CAM subyacente. Se empaparon discos de filtro de papel n.º 1 (Whatman International, Reino Unido) en 3 mg/ml de acetato de cortisona (Sigma, St. Louis, MO) en una disolución de un 95% de etanol y agua, y posteriormente se secaron al aire en condiciones estériles. Se usó el FGF2 (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland) para hacer crecer los vasos sobre la CAM de los embriones de pollo de 10 días de edad. Sobre la CAM en crecimiento se colocaron discos de filtro estériles en los que se adsorbió FGF2 disuelto en PBS a 1 µg/ml. Sobre la CAM en crecimiento se colocaron discos de filtro estériles en los que se adsorbió FGF2 disuelto en PBS a 1 µg/ml. A las 24 h, se añadieron de manera tópica y directamente a la CAM los compuestos problema o el vehículo de control.

El tejido de la CAM directamente por debajo del disco de filtro saturado con FGF2 se extrajo de los embriones tratados 48 horas antes con el compuesto problema o el control. Los tejidos se lavaron tres veces con PBS. Se colocaron cortes en una placa de Petri de 35 mm (Nalgen Nunc, Rochester, Nueva York) y se examinaron en un estereomicroscopio SV6 (Karl Zeiss, Thornwood, Nueva York) a 50X aumentos. Se recogieron imágenes digitales de los cortes de CAM adyacentes a los filtros mediante el uso de un sistema de cámara de video en color 3-CCD (Toshiba America, Nueva York, NY) y se analizaron mediante el uso del paquete informático Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). La tabla 4 contiene el número de puntos de ramificación de vasos contenidos en una región circular igual al área de un disco de filtro contado para cada corte.

El tejido de la CAM directamente por debajo del disco de filtro saturado con FGF2 se extrajo de los embriones tratados 48 h antes con el compuesto o el control. Los tejidos se lavaron tres veces con PBS. Se colocaron cortes en una placa de Petri de 35 mm (Nalgen Nunc, Rochester, Nueva York) y se examinaron en un estereomicroscopio SV6 (Karl Zeiss, Thornwood, Nueva York) a 50X aumentos. Se recogieron imágenes digitales de los cortes de CAM adyacentes a los filtros mediante el uso de un sistema de cámara de video en color 3-CCD (Toshiba America, Nueva York, NY) y se analizaron con el paquete informático Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Los efectos de los compuestos policatiónicos sobre la angiogénesis se muestran en las tablas 2, 3 y 4. Los efectos también se muestran en la figura 1.

Tabla 2: Eficacia antiangiogénica de los compuestos policatiónicos de referencia en el modelo de CAM

| Tratamiento de CAM | Puntos de ramif. ± EEM | % de inhibición ± EEM |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| PBS (control) | 69 ± 16,0 | |
| FgF (1,0 µg/ml) | 155 ± 10 | |
| Compuesto 29 (1,2 µg) + FGF2 (1 µg) | 82 ± 5 | 85 ± 6 |

Los datos representan la media + EEM, n = 8

Tabla 3: Eficacia antiangiogénica de los compuestos policatiónicos de referencia en el modelo de CAM

| | Puntos de ramif. ± EEM | % de inhibición ± EEM |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Tratamiento de CAM | | |
| PBS (control) | 80 ± 7 | |
| FgF2 (1,0 µg/ml) | 177 ± 10 | |
| Compuesto 26 (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 123 ± 7 | 55 ± 8 |
| Compuesto 34 (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 156 ± 9 | 21 ± 9 |
| Compuesto 40 (0,1 µg) + FGF2 (1 µg) | 142 ± 6 | 36 ± 6 |
| Compuesto 36 (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 156 ± 6 | 21 ± 6 |
| Compuesto 33 (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 160 ± 18 | 17 ± 18 |
| Compuesto 27 (0,1 µg) + FGF2 (1 µg) | 144 ± 9 | 34 ± 9 |

Tabla 4. Eficacia antiangiogénica del compuesto policatiónico en el modelo de CAM

| Grupos de tratamiento | % de inhibición medio ± EEM |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| PBS (Control) | |
| FGF2 (1,0 µg/ml) | |
| Compuesto 50 (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 21 ± 9 |
| Compuesto 50 (3,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 42 ± 8 |
| Compuesto 50 (10 µg) + FGF2 (1 µg) | 66 ± 7 |
| Compuesto 48* (1,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 16 ± 6 |
| Compuesto 48* (3,0 µg) + FGF2 (1 µg) | 38 ± 8 |
| Compuesto 48* (10 µg) + FGF2 (1 µg) | 55 ± 7 |

Los datos representan la media ± EEM, n = 8

* Compuesto de referencia

5 Tal y como se describe en las tablas 2, 3 y 4 anteriores, los compuestos policatiónicos bloquearon la angiogénesis inducida por FGF2 en el modelo de CAM de angiogénesis.

Ejemplo 2

El ejemplo siguiente ilustra la inhibición de la formación de tubos de células endoteliales por los compuestos

policatiónicos de referencia. La diferenciación por las células endoteliales se examinó mediante el uso de un método desarrollado por Grant et al. (Grant et al., *In Vitro Cell Dev Biol.*, 27A:327-336 (1991). Se descongeló la matriz Matrigel®, sin rojo fenol (se puede adquirir a Becton Dickinson, Bedford, MA) durante una noche a 4 °C. Mediante el uso de puntas de pipeta frías, se colocaron 3,0 mg/pocillo de la matriz Matrigel® en una placa fría de veinticuatro pocillos. La matriz Matrigel® se dejó polimerizar durante la incubación a 37 °C durante 30 minutos.

Se mantuvieron las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a 37 °C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad en medio de cultivo de células endoteliales con un 2% de suero bovino fetal (EGM). El ensayo en tubo se llevó a cabo en el medio basal de células endoteliales (EBM) complementado con un 0,5% de seroalbúmina bovina (SAB) y complementado con una dilución 1:100 de insulina-transferrina-selenio-G (I-T-Se, 100X). Las HUVEC se trataron con tripsina y se centrifugaron y, posteriormente, se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después del recuento, se ajustó la densidad celular a 35.000 células/ml.

Una concentración final de 35.000 células/ml por pocillo se trató con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) humano recombinante básico a 100 ng/ml, y los compuestos policatiónicos (véase la tabla 1B) disueltos en medio EBM. Las células tratadas se incubaron durante una noche a 37 °C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad para permitir la adhesión celular.

Posteriormente, se aspiró el medio y las células se fijaron y se tiñeron mediante el uso de un equipo de tinción HEMA-3 modificado. Se recogieron imágenes digitales de cortes de los pocillos de microtitulación mediante el uso de un sistema de cámara de video en color 3-CCD DKC5000 (Toshiba America, Nueva York, NY) y se analizaron mediante el uso del paquete informático Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland). El área y la longitud del eje principal de las células teñidas que tenían una morfología tubular se midió en la superficie de la matriz Matrigel® (Becton Dickinson, Bedford, PA), contados de 5 imágenes/pocillo.

Tal y como se ilustra en la tabla 5 que viene a continuación, los compuestos policatiónicos son inhibidores potentes de la formación de tubos de CE *in vitro*.

Tabla 5. Eficacia antiangiogénica del compuesto policatiónico en el ensayo de formación de tubos de células endoteliales humanas

| Grupos de tratamiento | % de inhibición media ± EEM |
|------------------------|-----------------------------|
| Compuesto 29 (0,01 µg) | 25 ± 7 |
| Compuesto 29 (0,1 µg) | 42 ± 5 |
| Compuesto 29 (1,0 µg) | 76 ± 6 |

Los datos representan la media ± EEM, n = 3

Ejemplo 3

Este ejemplo se refiere a ensayos de migración celular. Estos ensayos se llevaron a cabo mediante el uso de una cámara de quimiotaxia desechable de 96 pocillos Neuroprobe con un tamaño de poro de 8 µm. Esta cámara permitió la cuantificación de la migración celular hacia un gradiente de vitronectina o de osteopontina. Se retiraron las células cultivadas siguiendo un método estandarizado mediante el uso de EDTA/Tripsina (0,01%/0,025%). Tras la retirada, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron (2×10^6 /ml) en EBM (medio basal de células endoteliales, Clonetics Inc.). Se añadió vitronectina u osteopontina (33 µl) a 0,0125-100 µg/ml a los pocillos inferiores de una cámara de quimiotaxia desechable, y después se montó mediante el uso del filtro colocado previamente. La suspensión de células (45 µl) se añadió a una placa de polipropileno que contenía 5 µl de agente problema a diferentes concentraciones y se incubó durante 10 minutos a 22 °C. Se añadieron 25 µl de suspensión de células/agente problema a los pocillos del filtro superior y después se incubó durante una noche (22 horas a 37 °C) en un incubador de cultivos celulares humidificado. Tras la incubación durante una noche, se retiraron con cuidado las células que no migraron y el exceso de medio mediante el uso de una pipeta de 12 canales y un raspador de células. Los filtros se lavaron después dos veces en PBS (sin Ca⁺² ni Mg⁺²) y se fijaron con un 1% de formaldehído. Las membranas de las células migradas se permeabilizaron con Triton X-100 (0,2 %) y después se lavaron 2 o 3 veces con PBS. Los filamentos de actina de las células migradas se tiñeron con rodamina-faloidina (12,8 UI/ml) durante 30 minutos (22 °C). La rodamina-faloidina se hizo nueva cada semana y se reutilizó durante hasta 3 días cuando se conservaba protegida de la luz a 4 °C. La quimiotaxia se determinó cuantitativamente mediante la detección de fluorescencia con el uso de un Cytofluor II (530 excitación/590 emisión). Todo el tratamiento y los lavados posteriores de las células se llevaron a cabo mediante el uso de un puesto de tratamiento/lavado diseñado a medida. Este puesto consistió en seis unidades de reactivos independientes cada uno con una capacidad de 30 ml. Las unidades independientes se rellenaron con uno de los reactivos siguientes: PBS, formaldehído, Triton X-100, o rodamina-faloidina. Mediante el uso de esta técnica, los filtros se sumergieron suavemente en la disolución adecuada, con lo que se disminuyó al mínimo la pérdida de células migradas. Esta técnica permitió la cuantificación

máxima de la migración celular y proporcionó resultados reproducibles con una variabilidad mínima entre ensayos e intraensayo (Bozarth et al., *Methods In Cell Science*, 19 (3): 179-187, 1997; Penno et al., *J. Method In Cell Science*, 19 (3): 189-195, 1997).

- 5 Tal y como se ilustra en la tabla 6 que viene a continuación, los compuestos policatiónicos de referencia inhiben la migración de células endoteliales de vena umbilical humana.

Tabla 6. Efecto del compuesto policatiónico sobre el ensayo de migración de células endoteliales humanas

| Grupos de tratamiento | % de inhibición media \pm EEM |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Compuesto 29 (0,01 μ M) | 19 \pm 2 |
| Compuesto 29 (0,1 μ M) | 40 \pm 3 |
| Compuesto 29 (1,0 μ M) | 67 \pm 5 |

Los datos representan la media \pm EEM, n = 3

Ejemplo 4

- 10 El siguiente ejemplo ilustra los efectos antagonistas hacia la heparina que tienen los compuestos policatiónicos de la presente invención. Para determinar la actividad antiheparínica de los compuestos policatiónicos, se llevó a cabo un ensayo que midió el porcentaje de inhibición mediante el uso de una concentración fija de compuesto policatiónico o concentraciones de compuestos policatiónicos que provocan la lisis del 50% de los eritrocitos humanos.

- 15 Se disolvieron 10 UI de antitrombina en 10 ml de tampón, lo que dio como resultado una disolución de reserva de 1 UI/ml (250x) del antitrombínico. La disolución de reserva de 1 IU/ml (250x) de antitrombina y una disolución de reserva a 336 mM de NaCl se diluyeron en un volumen total de 50 μ l de tampón, de forma que la concentración final del antitrombínico fue de 0,004 UI/pocillo de muestra y la de NaCl fue de 150 mM/pocillo de muestra. Se añade 1 μ l del compuesto a ensayar, concentración final de 10 μ g/ml (que corresponde a una dilución logarítmica de antagonista de 0,5) al pocillo de muestra. Las muestras se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añaden 50 μ l de factor Xa disuelto en tampón al pocillo de muestra a una concentración final de 0,14 knat/pocillo (2 μ l de la disolución de reserva de 7,1 knat/ml a un volumen final de tampón en el pocillo de muestra de 100 μ l). Las muestras se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente otros 10 minutos. Se añadieron 10 μ l de una disolución de reserva a 4 mM del sustrato S-2765 a cada pocillo de muestra para dar una concentración final de 0,4 mM en cada pocillo de muestra. Las muestras se mezclaron y se monitorizó a 405 nm la hidrólisis del sustrato cromógeno Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), lo que liberó el grupo cromóforo pNA (p-nitroanilina). Las muestras se mezclaron cada 30 s para mantener una mezcla uniforme. Se usó un espectrofotómetro ThermoLabSystems Multiskan Spectrum para medir los espectros de absorbancia. El incremento de absorbancia fue proporcional a la actividad de la enzima (factor Xa). El % de inhibición del factor Xa se determinó mediante el uso de una curva patrón. Los resultados se representan en la tabla 7. En la figura 2 se presenta un gráfico de barras que también ilustra el porcentaje de inhibición.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del factor Xa: concentración única (10 μ g/ml)

| Compuesto n.º * | % de inhibición | Compuesto n.º | % de inhibición |
|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 9 | 16,24689847 | 25 | 0 |
| 10 | 20,80146834 | 26 | 48,14324 |
| 11 | 1,903402332 | 27 | 8,885942 |
| 12 | 9,381054349 | 28 | 44,29708 |
| 13 | 36,84443085 | 30 | 49,96431121 |
| 24 | 1,835423677 | 31 | 75,45630672 |
| 5 | 39,767513 | 32 | 23,1127426 |
| 19 | 59,82121614 | 33 | 32,01794636 |
| 15 | 5,710206995 | 34 | 99,99660107 |

| Compuesto n.º * | % de inhibición | Compuesto n.º | % de inhibición |
|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 14 | 40,99112879 | 37 | 62,40440502 |
| 17 | 15,02328269 | 35 | 79,60300466 |
| 18 | 13,25583767 | 38 | 65,05557255 |
| 1 | 22,29699874 | 39 | 56,49026206 |
| 2 | 41,05910744 | 41 | 7,817545291 |
| 4 | 0,951701166 | 46 | 59,14142959 |
| 3 | 2,855103498 | 42 | 79,46704735 |
| 6 | 2,583188879 | 43 | 59,68525883 |
| 7 | 5,506271031 | 45 | 77,83555963 |
| 8 | 7,409673363 | 44 | 74,36864824 |
| 9 | 10,87658475 | 52 | 45,47772 |
| 20 | 7,851534618 | 53 | 43,03048843 |
| 21 | 1,495530403 | 54 | 19,98572448 |
| 22 | 1,291594439 | 55 | 46,49739982 |
| 23 | 1,223615785 | Magainina | 4,418612556 |
| 16 | 30,38645865 | Magainina-T | 23,1127426 |

* Todos los compuestos son compuestos de referencia.

Como se ilustra en la figura 2 y la tabla 7 anterior, los compuestos policatiónicos de referencia inhibieron al factor Xa.

Inhibición del factor Xa: CE50. Para determinar la concentración de compuesto policatiónico que provoca aproximadamente un 50% de lisis de eritrocitos humanos, se usaron concentraciones fijas de heparina y se añadieron diferentes cantidades de antagonistas de la heparina. Los resultados se representan en la tabla 8.

5 Tabla 8. Inhibición del factor Xa: CE50

| Compuesto * | PM | CE ₅₀ (µM) | CH ₅₀ (µg/ml) | CH ₅₀ (µM) |
|--------------|------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Compuesto 27 | 783 | 9,7 | >2.000 | |
| Compuesto 25 | 615 | 5,3 | >2.000 | |
| Compuesto 26 | 927 | 2,0 | >2.000 | |
| Compuesto 7 | 921 | 3,7 | 715 | 519 |
| Compuesto 50 | 1126 | 0,36 | 637 | 377 |
| Compuesto 48 | 1238 | 0,077 | 261 | 144 |

| | | | | |
|--------------|------|------|--|--|
| Compuesto 47 | 933 | 5,54 | | |
| Compuesto 51 | 1070 | 16,7 | | |
| Compuesto 49 | 849 | 22 | | |

* Los compuestos 47, 49-51 son parte de la invención.

Como se ilustra en la tabla 7 anterior, los compuestos policatiónicos de la presente invención exhiben grados variables de inhibición del factor Xa.

Ejemplo 5

5 El ejemplo siguiente ilustra el efecto de un compuesto policatiónico de referencia sobre el tiempo de coagulación. Se usó el ensayo antiheparina según se describe en la presente memoria. El ensayo contuvo 1 mg/l, 2 mg/l o 4 mg/l de heparina, y se añadieron cantidades crecientes del compuesto 26. La tabla 9 y la figura 3 representan el efecto del compuesto 26 sobre el tiempo de coagulación.

Tabla 9. Efecto del compuesto 26 sobre el tiempo de coagulación y la eficacia de la heparina

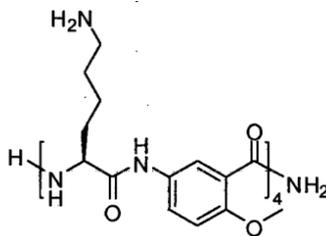
| Heparina (mg/l) | Compuesto 26 (mg/l) | Tiempo de coagulación (s) | Eficacia de la heparina |
|-----------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1 | 0 | 50,8 | 1 |
| 1 | 1,25 | 42,8 | 0,65065 |
| 1 | 2 | 33,4 | 0,24017 |
| 1 | 2,5 | 31,3 | 0,14847 |
| 1 | 4 | 27,9 | -1,67E-08 |
| 2 | 0 | 110,8 | 1 |
| 2 | 2,5 | 40,2 | 0,11083 |
| 2 | 4 | 33,9 | 0,031486 |
| 2 | 5 | 31,9 | 0,0062972 |
| 2 | 6 | 31,8 | 0,0050378 |
| 2 | 10 | 34,4 | 0,037783 |
| 4 | 0 | 214,9 | 1 |
| 4 | 2,5 | 124,8 | 0,51297 |
| 4 | 4 | 87,4 | 0,31081 |
| 4 | 5 | 55,8 | 0,14 |
| 4 | 6 | 35,4 | 0,02973 |
| | 10 | 29,9 | -2,06E-09 |

10 Como se ilustra en la figura 3 y en la tabla 9, anteriormente, el compuesto 26, un compuesto policatiónico de

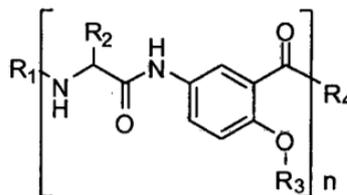
referencia, disminuyó el tiempo de coagulación a concentraciones variables de heparina, lo que pone de manifiesto la capacidad que tiene el compuesto para antagonizar la actividad de la heparina.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula:

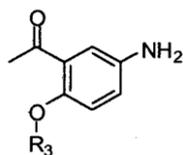


2. Composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, que se encuentra en forma de una cápsula, oblea, comprimido o pastilla.
4. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que está en forma de un polvo o gránulo.
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, que está en forma de una suspensión o solución en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso.
6. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para ser usado como un medicamento.
7. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado al exceso de angiogénesis, en donde el compuesto presenta efectos antagonistas contra la heparina.
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, para ser usada en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado al exceso de angiogénesis, en donde el compuesto presenta efectos antagonistas contra la heparina.
9. Compuesto de fórmula:



en donde:

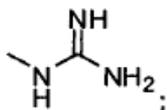
n es 2 a 10;

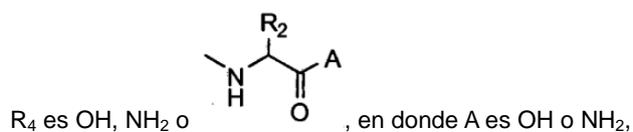


R₁ es H o

R₂ es alquilo C₁-C₉ ramificado o lineal, en donde R₂ está sustituido con uno o más N(CH₃)₂;

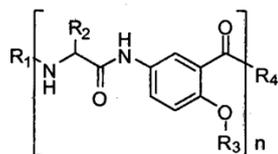
R₃ es alquilo C₁-C₉ ramificado o lineal, en donde R₃ está sustituido opcionalmente con uno o más -NH₂, N(CH₃)₂, o





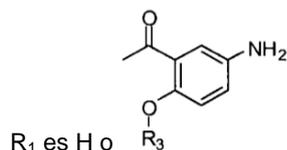
para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado al exceso de angiogénesis, en donde el compuesto presenta efectos antagonistas contra la heparina.

10. Compuesto de fórmula:

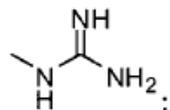


en donde:

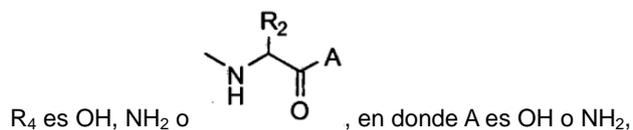
n es 2 a 10;



R₂ es alquilo C₁-C₉ ramificado o lineal, en donde R₂ está opcionalmente sustituido con uno o más -NH₂, N(CH₃)₂ o

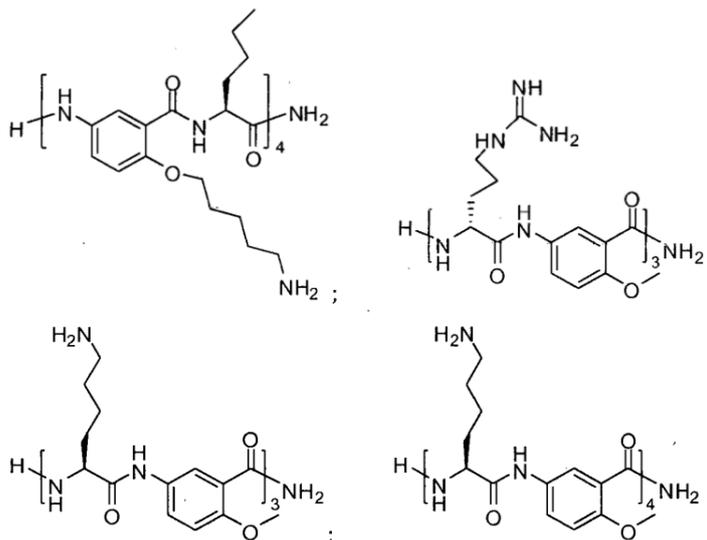


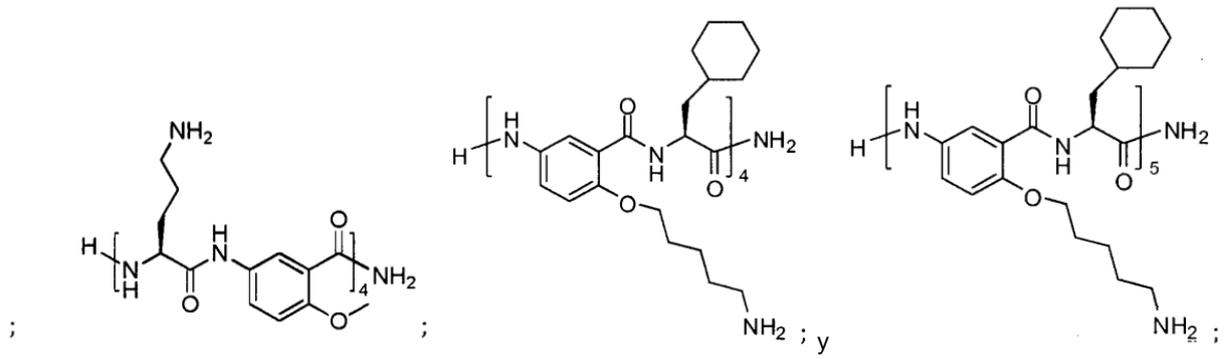
R₃ es alquilo C₁-C₉ ramificado o lineal, en donde R₃ está sustituido con uno o más N(CH₃)₂;



para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado al exceso de angiogénesis, en donde el compuesto presenta efectos antagonistas contra la heparina.

11. Compuesto de la fórmula seleccionada entre:





para ser usado en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado al exceso de angiogénesis.

*Efecto antiangiogénico de PMX en el modelo de CAM
inducida por FGF₂*

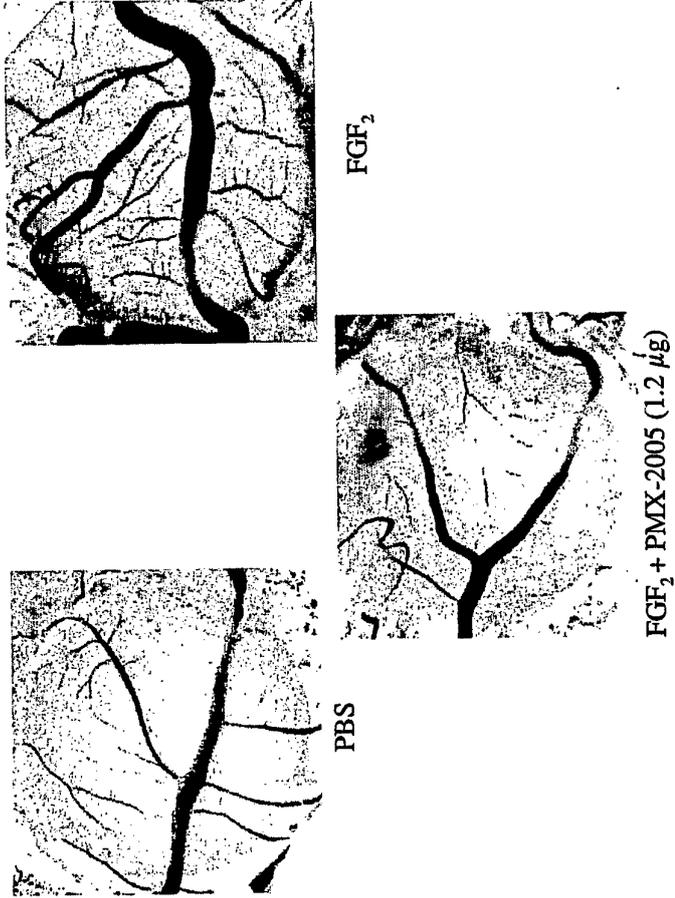


Fig. 1

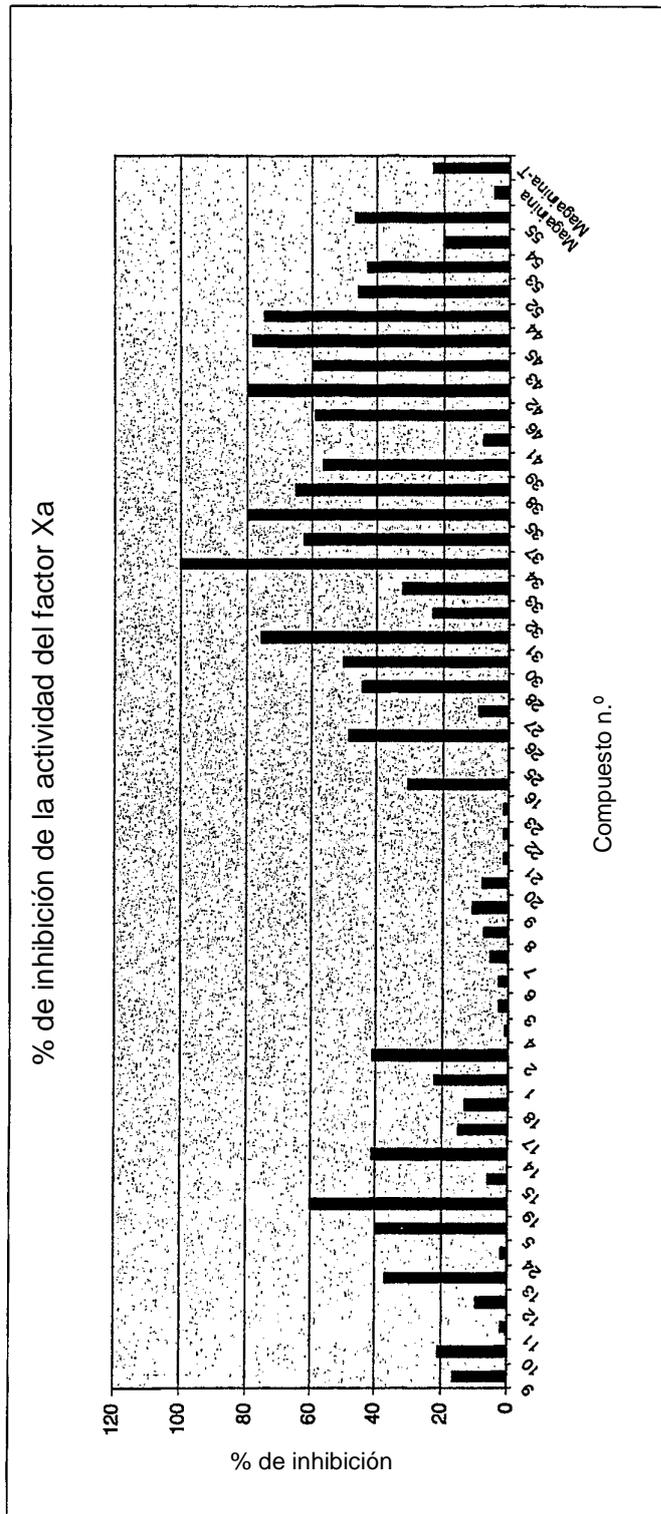


Fig. 2

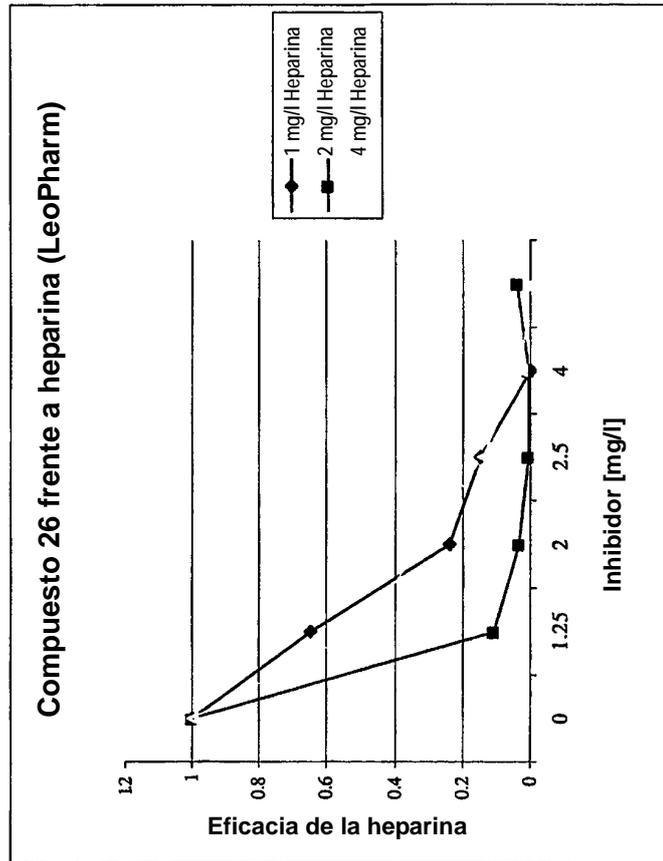


Fig. 3