(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 523 463**

(51) Int. Cl.:

| | | | |
|---|---|---|---|
| ***A61K 31/568*** | (2006.01) | ***A61P 19/04*** | (2006.01) |
| ***A61K 31/58*** | (2006.01) | ***A61P 27/02*** | (2006.01) |
| ***A61K 31/704*** | (2006.01) | ***A61P 37/00*** | (2006.01) |
| ***A61K 31/7048*** | (2006.01) | ***A61K 45/06*** | (2006.01) |
| ***A61P 1/00*** | (2006.01) | | |
| ***A61P 9/00*** | (2006.01) | | |
| ***A61P 11/00*** | (2006.01) | | |
| ***A61P 17/02*** | (2006.01) | | |
| ***A61P 17/04*** | (2006.01) | | |
| ***A61P 19/02*** | (2006.01) | | |

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2007** **E 07763798 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 2049122**

(54) Título: **Composiciones para inhibir la angiogénesis**

(30) Prioridad:

**03.08.2006 AU 2006904195**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**26.11.2014**

(73) Titular/es:

**ONCOLOGY RESEARCH INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)**
**6 256 ST. GEORGES TERRACE**
**PERTH, WA 6000, AU**

(72) Inventor/es:

**STORY, MICHAEL JOHN y**
**WAYTE, KENNETH MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 523 463 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

Composiciones para inhibir la angiogénesis

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una saponina esteroidea seleccionada a partir del grupo que consiste en deltonina, dioscina y prosapogenina A para uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto humano o animal, en donde la angiogénesis es angiogénesis asociada con una enfermedad mencionada en la reivindicación 1.

**Antecedentes de la invención**

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes mediante el crecimiento y la migración de células endoteliales, en un proceso denominado formación de "brotes".

El crecimiento de las células endoteliales es una etapa decisiva en el proceso angiogénico. Los órganos tienen límites perfectamente marcados, definidos por estructuras circundantes acelulares denominadas membranas basales que se componen de un tejido de proteínas de la matriz extracelular (MEC), predominantemente lamininas, colágeno de tipo IV y proteoglicanos. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal que rodea las células endoteliales que recubren el lumen de los vasos sanguíneos. La erosión de la membrana basal se activa con enzimas liberadas por las células endoteliales y los leucocitos. A continuación, las células endoteliales migran a través de la membrana basal erosionada cuando son inducidas por agentes estimulantes angiogénicos. Las células que migran forman un "brote" fuera del vaso sanguíneo progenitor. Las células endoteliales que migran proliferan, y los brotes se fusionan para formar bucles capilares, formando de este modo un nuevo vaso sanguíneo.

El control de la angiogénesis es un proceso muy regulado que implica las acciones de una variedad de agentes estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se piensa que tanto la angiogénesis controlada como la incontrolada proceden de una manera similar.

En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos y los animales experimentan angiogénesis solo en situaciones restringidas muy específicas. Por ejemplo, la angiogénesis normalmente solo se observa en la cicatrización de heridas, el desarrollo fetal y embrionario, y la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta.

Sin embargo, una angiogénesis incontrolada o no deseada está asociada a muchas enfermedades y afecciones. La inducción de la angiogénesis es un rasgo característico del cáncer, caracterizado por la dispersión de células tumorales por todo el organismo. El proceso por el cual las células tumorales migran desde un sitio primario hasta un sitio secundario se denomina "metástasis", el cual es la diferencia fundamental entre un crecimiento benigno y maligno, y representa el principal problema clínico del cáncer. Desafortunadamente, más del 50% de los tumores sólidos han sufrido metástasis en el momento del diagnóstico.

La evidencia del papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral es amplia y generalmente se acepta que el crecimiento de cualquier tumor sólido depende decisivamente de este proceso. La angiogénesis tiene un papel decisivo en dos estadios del desarrollo tumoral. En primer lugar, la angiogénesis es necesaria para que una masa tumoral crezca más allá de un tamaño de unos pocos milímetros. Sin la formación de una nueva vascularización, las células de la masa tumoral no recibirán suficiente aporte sanguíneo para desarrollarse más allá de ese pequeño tamaño. Sin embargo, una vez que comienza la vascularización del tumor, la masa tumoral se puede expandir posteriormente.

La vascularización del tumor también tiene un papel significativo en el desarrollo de tumores secundarios. La vascularización del tumor permite que las células tumorales entren en el torrente sanguíneo y circulen por todo el organismo. Después de que las células tumorales han abandonado el sitio primario y se han instalado en un sitio secundario (metastásico), una angiogénesis adicional permite entonces que la masa tumoral secundaria crezca y se expanda. Por lo tanto, la prevención de la angiogénesis no solo puede conducir a una reducción del crecimiento de un tumor en su sitio primario, sino que la prevención de la angiogénesis también puede inhibir o reducir la migración de las células tumorales desde el sitio primario a otras partes del organismo (metástasis).

Además de la formación de tumores, también existen diversas enfermedades y afecciones inducidas por la angiogénesis o asociadas con una angiogénesis incontrolada o no deseada. Estas incluyen retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular, glaucoma neovascular, psoriasis, angiofibroma, inflamación inmune y no inmune (incluyendo la artritis reumática), propagación de vasos capilares en placas de arteriosclerosis, angioma y sarcoma de Kaposi. La angiogénesis también puede ocurrir en una articulación reumatoide, acelerando la destrucción de una articulación al permitir una afluencia de leucocitos con la posterior liberación de agentes mediadores inflamatorios.

La angiogénesis también tiene un papel fundamental en la córnea y la retina de pacientes con ciertos trastornos oculares, por ejemplo, la enfermedad neovascular ocular. Esta enfermedad se caracteriza por la invasión de nuevos vasos sanguíneos en las estructuras del ojo, tales como la retina o la córnea. Es la causa más común de ceguera y está asociada con un gran número de enfermedades del ojo. En la degeneración macular relacionada con la edad, los problemas visuales asociados están causados por un crecimiento hacia dentro de los capilares coroidales a

través de defectos en la membrana de Bruch con proliferación del tejido fibrovascular por debajo del epitelio pigmentario de la retina.

Una inflamación crónica también puede implicar una angiogénesis patológica. Enfermedades tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn muestran cambios histológicos con el crecimiento hacia dentro de nuevos vasos sanguíneos en los tejidos inflamados. Otro papel patológico asociado con la angiogénesis se encuentra en la aterosclerosis. Se ha mostrado que las placas formadas dentro del lumen de los vasos sanguíneos tienen actividad estimuladora de la angiogénesis.

La angiogénesis también está implicada en la reproducción y en la cicatrización de heridas. En la reproducción, la angiogénesis es una etapa importante en la ovulación y también en la implantación de la blástula después de la fecundación. La prevención de la angiogénesis se puede utilizar para inducir amenorrea, para bloquear la ovulación o para evitar la implantación de la blástula. En la cicatrización de heridas, una reparación o fibroplasia excesiva puede ser un efecto secundario perjudicial de procesos quirúrgicos y puede estar causada o agravada por la angiogénesis. Las adherencias son una complicación frecuente de la cirugía y conducen a problemas tales como la obstrucción del intestino delgado.

El tratamiento actual de enfermedades que implican una angiogénesis incontrolada o no deseada, es inadecuado. Por consiguiente, existe una necesidad de nuevos métodos y composiciones que inhiban la angiogénesis incontrolada o no deseada.

La presente invención surge de la determinación de que las saponinas esteroideas tienen capacidad antiangiogénica, y se refiere a una saponina esteroidea para uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto humano o animal.

Una referencia en esta memoria a un documento de patente o a otro material que se proporciona como técnica anterior, no se va a tomar como una admisión de que el documento o el material era conocido o que la información que contiene formaba parte del conocimiento general común, en cuanto a la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

El uso de saponinas esteroideas específicas para el tratamiento del cáncer se conoce por los documentos de patente WO 2005/060977 A1, CN 1237583 A, JP 8040914 A y JP 3271224 A y también se describe en Lee Mei-Sze et al.: “Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft”, Cancer Biology & Therapy, vol. 4 nº 11, 2005, páginas 1248-1254, Zhang Hong-Jie et al.: “Bioactive constituents form Asparagus cochinchinensis”, Journal of Natural Products, vol. 67, nº 2, 2004, páginas 194-200, Liu Ming-Jie et al.: “The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of diosgenyl saponins on human leukemia cell lines”, Biological & Pharmaceutical Bulletin, vol. 27, nº 7, 2004, páginas 1059-1065, y Rong-Tsun Wu et al.: “Formosanin-C, an immunomodulator with antitumor activity”, International Journal of Immunopharmacology, vol. 12, nº 7, 1990, páginas 777-786.

El documento WO2005/60977 describe el uso de diversas saponinas esteroideas como inhibidores de Core 2GlcNAc-T para el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, retinopatía diabética, etc. (página 7, líneas 5-13). Los compuestos incluyen saponinas furostanol y espirostanol que se describen en 11 fórmulas de Markush diferentes (pág. 29, l. 15-24, página 8-10, reivindicaciones 1-25). La diosgenina y la deltonina se mencionan en una larga lista y se denominan compuestos “preferidos” (pág. 23, l. 4-16). Sin embargo, no pertenecen a los denominados “compuestos particularmente preferidos”, a saber, trigeonisida IVa, Glicosida F, Shatavarin I, compuesto 3 y pardarinosida C (véase la página 16, línea 14 - página 17, línea 5). Los experimentos solo muestran actividad *in vitro* en la inhibición de GlcNAc-T para los denominados compuestos preferidos trigeonisida IVa, glicosida F y shatavarin (véase la página 41). Se demostrado actividad terapéutica en el tratamiento de la retinopatía diabética solo para el extracto de semillas de fenogreco (página 44, línea 22-24)

**Compendio de la invención**

La presente invención surge de estudios sobre la capacidad de las saponinas esteroideas para inhibir la angiogénesis. En particular, se ha encontrado que las saponinas esteroideas tienen la capacidad de inhibir la angiogénesis en una variedad de sistemas modelos *in vivo* y *ex vivo*. Este hallazgo indica que las saponinas esteroideas tienen capacidad antiangiogénica significativa.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una saponina esteroidea para uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto humano o animal según la reivindicación 1, la cual se selecciona a partir del grupo que consiste en deltonina, dioscina, prosapogenina A.

Varios términos que se utilizarán en toda la memoria descriptiva tienen significados que un destinatario experto entenderá perfectamente. Sin embargo, para facilitar la consulta, algunos de estos términos se definirán ahora.

El término "glucósido" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como un compuesto que contiene un resto sacárido (azúcar) (monosacárido, disacárido o polisacárido), unido a un componente triterpeno o esteroideo o aglicona alcaloide esteroidea (no sacárido). En la mayoría de las circunstancias, el resto sacárido (azú-

car) está unido a la posición C-3 de la aglicona, aunque se contemplan otros enlaces dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los glucósidos furostanol, que contienen un sacárido fijado a la posición C-26, y glucósidos espirostanol son ambas subclases de las saponinas esteroideas.

El término "saponina" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como un glucósido que incluye un sacárido (azúcar) fijado a la aglicona, generalmente a través de la posición C-3 de la aglicona.

La expresión "saponina esteroidea" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como un glucósido que incluye una o varias unidades de sacárido (incluyendo una o varias unidades de monosacárido, disacárido o polisacárido) fijadas a una aglicona que no contiene un átomo de nitrógeno.

Una "aglicona" esteroidea también se denomina una "genina" o sapogenina" y los términos se pueden usar indistintamente en toda la memoria descriptiva y todos deben entenderse como la porción no sacárida de una molécula de saponina.

El término "sacáridoA-(1→n)-sacáridoB" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como que el sacárido A está unido por su C-1 al C-n del sacárido B, siendo n un número entero.

Por ejemplo, el polisacárido de nombre común "chacotriosa" es α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glucopiranósido. Una forma abreviada de la nomenclatura de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC, utilizada en esta memoria, es Rha 2, [Rha 4], Glc.

El término "sujeto", tal y como se usa en toda la memoria descriptiva debe entenderse como cualquier sujeto humano o animal. A este respecto, se entenderá que la presente invención incluye dentro de su alcance aplicaciones veterinarias. Por ejemplo, el sujeto animal puede ser un mamífero, un primate, un animal de granja (por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo o una cabra), un animal de compañía (por ejemplo, un perro, un gato), un animal para ensayo de laboratorio (por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un pájaro), un animal de importancia veterinaria o un animal de importancia económica.

El término "tratar" y variantes del mismo, tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva, debe entenderse como una intervención terapéutica con una cantidad eficaz de una saponina esteroidea. Por ejemplo, el término incluye dentro de su alcance, una intervención terapéutica para obtener uno o varios de los siguientes resultados: (i) inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor primario en un sujeto, incluyendo la reducción del crecimiento del tumor primario después de la extirpación; (ii) inhibir o prevenir el crecimiento y la formación de uno o varios tumores secundarios en un sujeto; (iii) inhibir o prevenir la angiogénesis en un sujeto; (iv) inhibir la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en un sujeto; (v) mejorar la esperanza de vida del sujeto en comparación con el estado sin tratar; y (vi) mejorar la calidad de vida del sujeto en comparación con el estado sin tratar.

El término "inhibir" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como una reducción en el progreso de un proceso, incluyendo uno cualquiera o varios de los términos inicio, tasa, probabilidad, continuación o terminación de un proceso.

El término "angiogénesis", tal como se usa en toda la memoria descriptiva debe entenderse como la generación de nuevos vasos sanguíneos ("neovascularización"), por ejemplo, en un tejido u órgano.

La expresión "sistema biológico" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como cualquier sistema multicelular e incluye desde grupos aislados de células hasta organismos completos. Por ejemplo, el sistema biológico pueden ser células en cultivo tisular, un tejido o un órgano, o un sujeto humano completo, tal como un sujeto humano que padece los efectos de una angiogénesis no deseada o incontrolada, o una enfermedad o afección asociada con la angiogénesis incontrolada o no deseada.

La expresión "agente antiangiogénico" tal como se utiliza en toda la memoria descriptiva debe entenderse como un agente que tiene la capacidad de inhibir la angiogénesis en un sistema biológico.

**Breve descripción de las Figuras**

La Figura 1 muestra el efecto de incrementar la concentración de deltonina sobre el crecimiento de los vasos a partir de explantes aórticos.

La Figura 2 muestra un ejemplo representativo del efecto de DMSO solo sobre explantes aórticos utilizando microscopía luminosa o tinción con lectina Fitc-BS-1.

La Figura 3 muestra un ejemplo representativo del efecto de deltonina 10 μM sobre explantes aórticos utilizando microscopía luminosa o tinción con lectina Fitc-BS-1.

La Figura 4 muestra el efecto de dioscina, deltonina, trilina, prosapogenina A y sorafenib sobre la tinción con CD31 de vasos sanguíneos en angioesponjas, como un indicador del efecto de estos compuestos sobre el número promedio de vasos sanguíneos inducidos.

La Figura 5 muestra el efecto de dioscina, deltonina, trilina, prosapogenina A y sorafenib sobre el porcentaje de inducción de la angiogénesis a través de bFGF en angioesponjas.

La Figura 6 muestra el efecto de dioscina, deltonina, trilina, prosapogenina A y sorafenib sobre el volumen sanguíneo en angiocámaras.

La Figura 7 muestra el efecto de dioscina, deltonina, trilina, prosapogenina A y sorafenib sobre la inducción de la angiogénesis mediante bFGF en angiocámaras.

**Descripción general de la invención**

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona una saponina esteroidea para uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto humano o animal según la reivindicación 1.

De acuerdo con la invención, el sistema biológico es un sujeto humano o animal. En una realización específica, el sistema biológico es un sujeto humano o animal en el que la angiogénesis está asociada con una enfermedad o una afección que es debida a una angiogénesis no deseada o incontrolada.

El sistema biológico es un sujeto humano o animal que padece o es susceptible de padecer angiogénesis asociada con la formación o expansión de angiofibroma, neovascularización corneal, neovascularización retinal/coroidal, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, malformaciones arteriovenosas, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, lupus, trastornos del tejido conectivo, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas, psoriasis, granuloma piógeno, fibroplasias retrolenticulares, esclerodermia, hemangioma; tracoma, articulaciones hemofílicas, adherencias vasculares, cicatrices hipertróficas, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación aguda o crónica, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica del pulmón incluyendo asma, sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

El sujeto en las diversas realizaciones de la presente invención es un sujeto humano o animal. Por ejemplo, el sujeto animal puede ser un mamífero, un primate, un animal de granja (por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo o una cabra), un animal de compañía (por ejemplo, un perro, un gato), un animal para ensayo de laboratorio (por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un pájaro), un animal de importancia veterinaria o un animal de importancia económica.

En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

Las saponinas se dividen convencionalmente en tres clases principales: (i) glucósidos triterpenos; (ii) glucósidos esteroideos; y (iii) glucósidos alcaloides esteroideos. Todos ellos tienen en común la fijación de una o varias unidades de azúcar a la aglicona, en general, en la posición C-3. Las saponinas esteroideas son generalmente tal y como se describen en Hostettmann K y Marston A (2005). *Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins*. Cambridge University Press.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, las saponinas esteroideas no contienen un átomo de nitrógeno en el resto de aglicona.

Se apreciará que las saponinas esteroideas generalmente incluyen saponinas esteroideas de origen natural y saponinas esteroideas de origen no natural (es decir, saponinas esteroideas sintetizadas químicamente). Además, también se apreciará que las saponinas esteroideas generalmente también incluyen profármacos de saponinas esteroideas, derivados de saponinas esteroideas, incluyendo por ejemplo, cualquier éster, cetona, ácido carboxílico, sal, forma sustituida, forma halogenada u otras formas que contienen heteroátomos, formas insaturadas, o cualquier otro derivado funcional.

La porción de sacárido de las saponinas esteroideas generalmente puede incluir una o varias unidades de sacárido, tales como un monosacárido, una unidad de disacárido o una unidad de polisacárido.

También se apreciará que una saponina esteroidea generalmente también puede incluir una aglicona con un sacárido fijado a una o a varias posiciones del resto aglicona.

Una saponina esteroidea puede incluir un sacárido fijado a una sola posición del componente sapogenina de la saponina esteroidea.

Como se ha descrito anteriormente, la unidad de sacárido puede ser un monosacárido, un disacárido o un polisacárido. El sacárido puede estar compuesto por un monosacárido adecuado, tal como D-glucosa (Glc), L-ramnosa (Rha), D-galactosa (Gal), ácido D-glucurónico (GlcA), D-xilosa (Xyl), L-arabinosa (Ara), D-fucosa (Fuc), ácido D-galacturónico (GalA). La unidad de sacárido también puede ser un azúcar sustituido, tal como un amino azúcar, un azúcar sulfatado, un azúcar acilado, un azúcar N-acilado y derivados funcionales de cualquiera de los monosacáridos mencionados anteriormente.

Del mismo modo, un disacárido puede ser generalmente cualquier combinación de dos monosacáridos, como se ha descrito anteriormente.

Los polisacáridos generalmente pueden ser lineales o ramificados, e incluir cualquier combinación de dos o más monosacáridos, incluyendo el monosacárido descrito anteriormente en este documento.

Generalmente, el polisacárido se compone de 1 a 6 unidades de monosacárido.

A este respecto, y como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, los polisacáridos se describen generalmente en el contexto de la disposición de los monosacáridos componentes.

El sacárido de la saponina esteroidea generalmente puede estar compuesto por 1 unidad de monosacárido. Un ejemplo de un monosacárido es glucosa con el nombre químico β-D-glucopiranósido, que cuando está fijado a la diosgenina aglicona través de la posición C-3, tiene el nombre común de "trilina".

En una realización, el sacárido de la saponina esteroidea se compone de 2 unidades de monosacárido, es decir, un disacárido. El disacárido es Rha 2, Glc con el nombre químico α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranósido, que cuando está fijado a la diosgenina aglicona a través de la posición C-3, tiene el nombre común de "prosapogenina A".

En otra realización, el polisacárido se compone de 3 unidades de sacárido, es decir, un trisacárido. De acuerdo con la invención, un chacotriósido es la unidad de trisacárido, en donde el grupo glucosilo de tres sacáridos tiene dos unidades de ramnosa unidas a una unidad de glucosa que a su vez está unida a través de un enlace glicósido a la posición C-3 de una sapogenina. La chacotriosa es α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-β-D-glucopiranósido. Una forma abreviada de nomenclatura de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC utilizada en esta memoria, es Rha 2, [Rha 4], Glc.

En otra realización, la saponina esteroidea es dioscina, en donde la dioscina es la diosgenina sapogenina ligada a través de la posición C-3 a chacotriosa (Rha 2, [Rha 4], Glc).

En otra realización, la saponina esteroidea es deltonina, en donde la deltonina es la diosgenina sapogenina unida a través de la posición C-3 a Rha 2, [Glc 4], Glc.

Del mismo modo, el solatriósido es un grupo glucosilo de tres sacáridos que tiene una unidad de ramnosa y una unidad de sacárido no ramnosa, cada una unida a una tercera unidad de sacárido, que a su vez está unida a través de un enlace glucosídico a la posición C-3 de una sapogenina.

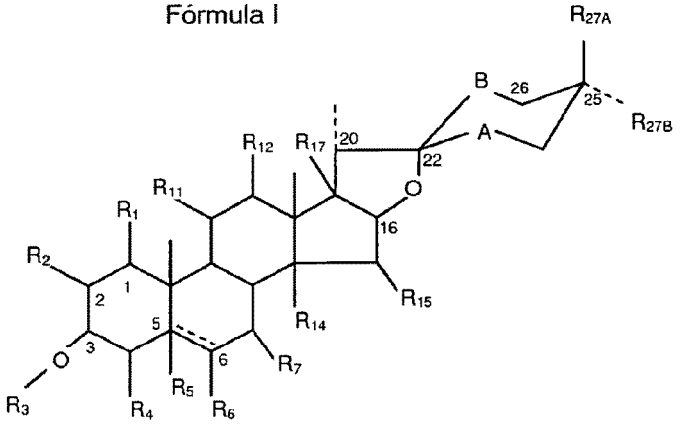
Un ejemplo de un tetrasacárido es [Rha 4, Rha 4], Rha 2, Glc con el nombre químico [α-L-ramnopiranosil(1→4)-α-L-ramnopiranosil(1→4)]-α-L-ramnopiranosil(1→4)-β-D-glucopiranósido, que cuando está fijado a la diosgenina aglicona través de la posición C-3, tiene el nombre común de "asperina".

Otro ejemplo de un tetrasacárido es Glc 4, [Xyl 3], Rha 2, Ara, con el nombre químico β-D-glucopiranosil(1→4)-[β-D-xilopiranosil(1→3)]-α-L-ramnopiranosil(1→2)-α-L-arabinósido.

Como se ha descrito previamente, las saponinas esteroideas no contienen un átomo de nitrógeno en el resto aglicona.

Generalmente, una saponina esteroidea se puede basar en una sapogenina con la Fórmula química I o II como sigue:

Fórmula I




en donde

$R_1$, $R_2$, $R_4$, $R_6$, $R_7$, $R_{11}$, $R_{12}$, $R_{14}$, $R_{15}$ y $R_{17}$ son independientemente H, OH, =O, grupos éster farmacológicamente

aceptables o grupos éter farmacológicamente aceptables;

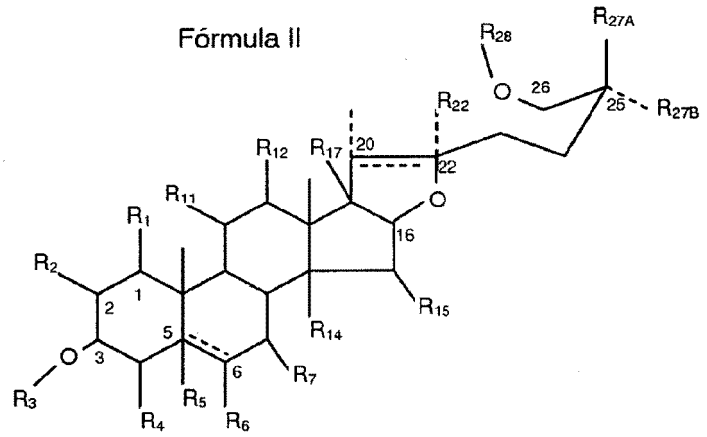
$R_5$ es H cuando C-5,C-6 es un enlace sencillo, y nada cuando C-5,C-6 es un doble enlace;

A es O, siendo B simultáneamente $CH_2$, o B es O siendo A simultáneamente $CH_2$;

$R_{27A}$ es H, siendo $R_{27B}$ simultáneamente $CH_3$, o $R_{27A}$ es $CH_3$ siendo $R_{27B}$ simultáneamente H;

$R_3$ comprende un grupo glucosilo unido a través del átomo de oxígeno a la sapogenina esteroidea en C-3; o una sal farmacéuticamente aceptable, o un derivado del mismo.

Fórmula II




en donde

$R_1$, $R_2$, $R_4$, $R_6$, $R_7$, $R_{11}$, $R_{12}$, $R_{14}$, $R_{15}$ y $R_{17}$ son independientemente H, OH, =O, grupos éster farmacológicamente aceptables o grupos éter farmacológicamente aceptables;

$R_5$ es H cuando C-5,C-6 es un enlace sencillo, y nada cuando C-5,C-6 es un doble enlace;

$R_{22}$ es o bien un hidroxilo o un grupo alcoxilo que cuando C-20, C-22 es un enlace sencillo, o nada cuando C-20, C-22 es un enlace doble;

$R_{27A}$ es H, siendo $R_{27B}$ simultáneamente $CH_3$, o $R_{27A}$ es $CH_3$ siendo $R_{27B}$ simultáneamente H;

$R_{28}$ es H o un sacárido; o una sal farmacéuticamente aceptable, o un derivado del mismo;

$R_3$ comprende un grupo glucosilo unido a través del átomo de oxígeno a la sapogenina esteroidea en C-3; o una sal farmacéuticamente aceptable, o un derivado del mismo.

Ejemplos de sapogeninas esteroideas incluyen agliconas espirostanol tales como diosgenina, yamogenina (neodiosgenina), yucagenina, sarsasapogenina, tigogenina, esmilagenina, hecogenina, gitogenina, convalamarogenina, neoruscogenina y solagenina; y agliconas de furostanol tales como protodiosgenina, seudoprotodiosgenina, metil protodiosgenina, protoyamogenina y metil protoyamogenina.

Ejemplos de saponinas esteroideas de chacotriósido incluyen "dioscina" que consiste en la sapogenina "diosgenina" unida a través de la posición C-3 a chacotriósido, diosgenina unida a través de la posición C-3 a otro chacotriósido, tigogenina unida a través de la posición C-3 a un chacotriósido, sarsasapogenina unida a través de la posición C-3 a un chacotriósido, esmilagenina unida a través de la posición C-3 a un chacotriósido, yucagenina unida a través de la posición C-3 a un chacotriósido, y yamogenina unida a través de la posición C-3 a un chacotriósido.

Ejemplos de saponinas esteroideas de solatriósido incluyen "gracilina", que es diosgenina unida a través de la posición C-3 al solatriósido (Rha 2, [Glc 3], Glc); deltonina (diosgenina unida a través de la posición C-3 al solatriósido Rha 2, [Glc 4], Glc); diosgenina unida a través de la posición C-3 a solatriosa (Rha 2, [Glc 3], Gal) [en este contexto, la diosgenina unida a (Rha 2, [Glc 3], Gal) se denomina 'solatriosa diosgenina']; diosgenina unida a través de la posición C-3 a otro solatriósido; tigogenina unida a través de la posición C-3 a un solatriósido; sarsasapogenina unida a través de la posición C-3 a un solatriósido; esmilagenina unida a través de la posición C-3 a un solatriósido; yucagenina unida a través de la posición C-3 a un solatriósido, y yamogenina unida a través de la posición C-3 a un solatriósido.

Las saponinas esteroideas de monosacáridos simples están muy extendidas en el reino vegetal. El monosacárido está ligado generalmente a la aglicona a través de la posición C-3 y ejemplos incluyen "trilina", que es diosgenina unida a través de la posición C-3 a glucosa. Otros sapogeninas unidas a glucosa a través de la posición C-3 incluyen sarsasapogenina, rodeasapogenina y yamogenina. Algunas sapogeninas están unidas a través de la posición C-3 a

otro monosacárido tal como arabinosa, por ejemplo, yonogenina y convalagenina o unidas a través de la posición C-3 a galactosa y así sucesivamente.

Ejemplos de saponinas esteroideas de disacáridos incluyen sarsasapogenina unida a través de la posición C-3 a, por ejemplo (Xyl 2, Gal 3); (Glc 2, Glc 3); (Glc 3, Glc 3); esmilagenina unida a través de la posición C-3 a (Glc 2, Glc 3); (Glc 2, Gal 3); samogenina, tigogenina, gitogenina, aliogenina, ruscogenina, penogenina, cepagenina y diosgenina unidas a través de la posición C-3 a (Rha 2, Glc 3)

Los glucósidos de diosgenina procedentes de especies de *Dioscorea* tienen gran interés comercial como materiales de partida para hormonas esteroideas. Los glucósidos de diosgenina y su isómero C-25 yamogenina están entre las saponinas de espirostanol documentadas más frecuentemente.

Ejemplos de sapogeninas de espirostanol esteroideas de origen natural con un doble enlace C-5, C-6 en el anillo B se enumeran en la Tabla 1:

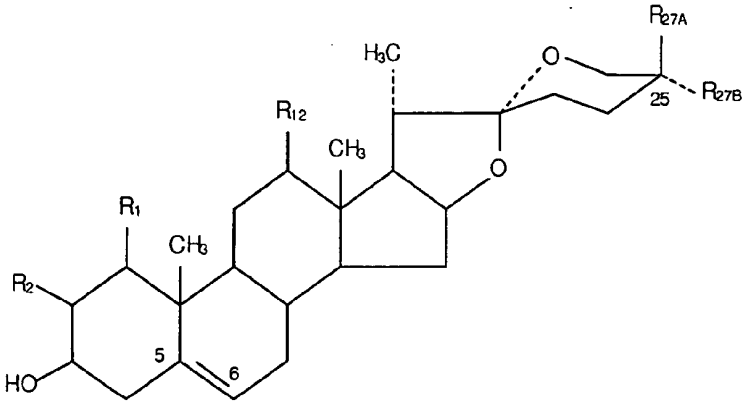



Tabla 1

| | $R_1$ | $R_2$ | $R_{12}$ | $R_{27A}$ | $R_{27B}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Diosgenina | H | H | H | H | $CH_3$ |
| Yamogenina | H | H | H | $CH_3$ | H |
| Yucagenina | H | OH | H | H | $CH_3$ |
| Gentrogenina | H | H | =O | H | $CH_3$ |
| Ruscogenina | OH | H | H | H | $CH_3$ |

Ejemplos de sapogeninas de espirostanol esteroideas de origen natural con un enlace sencillo C-5, C-6 en el anillo B se enumeran en la Tabla 2:

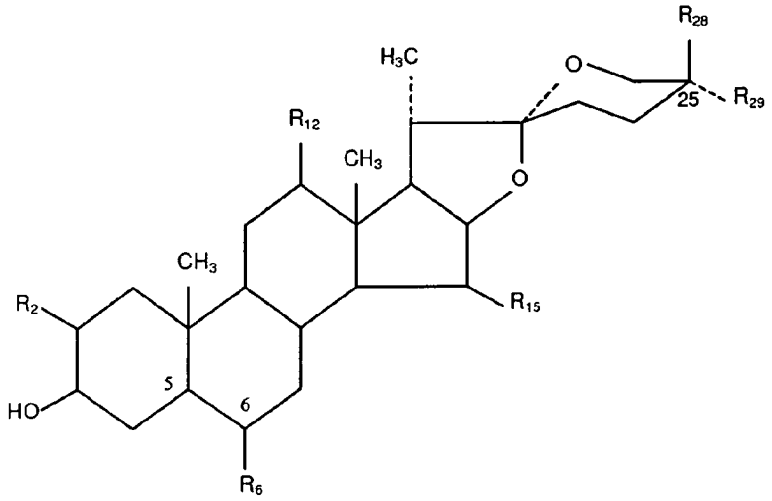



Tabla 2

| | $R_2$ | $H_5$ | $R_6$ | $R_{12}$ | $R_{15}$ | $R_{28}$ | $R_{29}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Esmilagenina | H | β | H | H | H | H | $CH_3$ |
| Tigogenina | H | α | H | H | H | H | $CH_3$ |
| Sarsasapogenina | H | β | H | H | H | $CH_3$ | H |
| Gitogenina | OH | β | H | H | H | H | $CH_3$ |
| Hecogenina | H | α | H | =O | H | H | $CH_3$ |
| Clorogenina | H | α | OH(α) | H | H | H | $CH_3$ |
| Digitogenina | OH(α) | α | H | H | OH(β) | H | $CH_3$ |
| Digalogenina | H | α | H | H | OH(β) | H | $CH_3$ |

Ejemplos de sapogeninas de furostanol esteroideas de origen natural del tipo protospirostano con un doble enlace C-5, C-6 en el anillo B y un enlace sencillo C-20, C-22 en el anillo E, se enumeran en la Tabla 3:

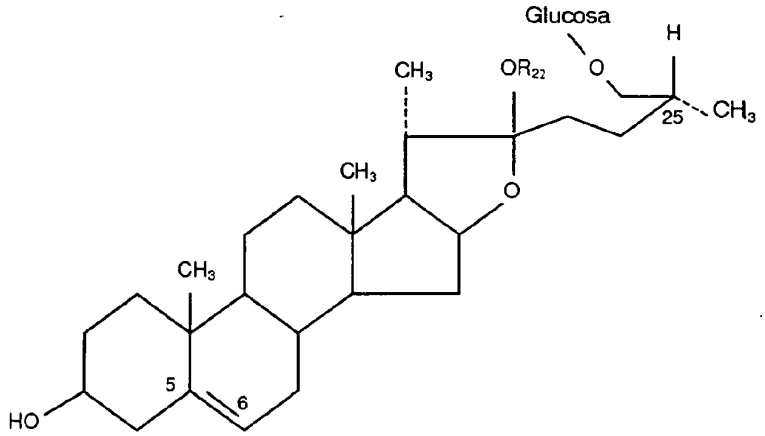


Tabla 3

| | $R_{22}$ |
|---|---|
| Protodiosgenina | H |
| Metilprotodiosgenina | $CH_3$ |

Un ejemplo de sapogenina de furostanol esteroidea de origen natural del tipo protospirostano con un enlace sencillo C-5,C-6 en el anillo B y un enlace sencillo C-20,C-22 en el anillo E, es prototigogenina.

Un ejemplo de sapogenina de furostanol esteroidea de origen natural del tipo seudospirostano con un doble enlace C-5,C-6 en el anillo B y un doble enlace C-20,C-22 en el anillo E, es seudodiosgenina.

Un ejemplo de sapogenina de furostanol esteroidea de origen natural del tipo seudoprotospirostano con un doble enlace C-5,C-6 en el anillo B y un doble enlace C-20,C-22 en el anillo E, es seudoprotodiosgenina.

En una realización, la saponina esteroidea es dioscina, en donde la dioscina es la diosgenina sapogenina unida a través de la posición C-3 a una chacotriosa (Rha 2, [Rha 4], Glc).

En otra realización, la saponina esteroidea es deltonina, en donde la deltonina es la diosgenina sapogenina unida a través de la posición C-3 a Rha 2, [Glc 4], Glc.

En una realización específica, la saponina esteroidea se selecciona a partir del grupo que consiste en deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc) y prosapogenina A (diosgenina Rha2, Glc).

En el caso de deltonina y prosapogenina A, cualquiera de estas saponinas esteroideas se puede preparar en una composición farmacéutica.

Por consiguiente, tales saponinas esteroideas se pueden utilizar en la preparación de un medicamento.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la saponina esteroidea en las diversas realizaciones de la presente invención se puede obtener a partir de fuentes naturales, preparar a partir de procesos de síntesis o como una síntesis o una modificación parcial aplicada a compuestos de origen natural o a productos intermedios.

La extracción, el aislamiento y la identificación de la saponina esteroidea en las diversas realizaciones de la presente invención se pueden lograr por métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, algunas saponinas esteroideas se producen a partir de fuentes vegetales. Otras fuentes de saponinas esteroideas se pueden obtener fácilmente a partir de la bibliografía, por ejemplo, tal y como se describe en Hostettmann K y Marston A (2005). *Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins*. Cambridge University Press, capítulos 1-3 y 6. Los nombres comunes de las saponinas esteroideas se han utilizado de conformidad con el texto anterior y Diccionario de Productos Naturales, Chapman y Hall, CRC, (2004).

La cantidad de saponina esteroidea administrada al sistema biológico en las diversas realizaciones de la presente invención no está particularmente limitada, y generalmente estará en el intervalo de modo que la diana esté expuesta a una concentración desde 0,1 μM a 20 μM de la saponina esteroidea.

La saponina esteroidea se puede administrar en una forma y una concentración adecuada para permitir que el agente llegue al sitio de acción deseado y tenga el efecto deseado, tal como la inhibición de la angiogénesis.

La administración de la saponina esteroidea puede estar dentro de cualquier espacio de tiempo adecuado para producir el efecto deseado. En un sujeto humano o animal, la saponina esteroidea se puede administrar, por ejemplo, por vía oral, parenteral, tópica o por cualquier otro medio adecuado, y por lo tanto se debe tener en cuenta el tiempo de tránsito del agente.

Por ejemplo, la administración de la saponina esteroidea al sujeto en las diversas realizaciones de la presente invención puede ser en una ocasión o varias antes del inicio de la angiogénesis, y/o simultáneamente con la aparición de la angiogénesis. Por ejemplo, en el caso de la inhibición de la angiogénesis asociada con un cáncer sólido, la administración de la saponina esteroidea puede ser antes y/o durante el crecimiento de un tumor (tumores primarios y/o secundarios), y/o antes o después de la resección de un tumor (tumores primarios y/o secundarios).

La saponina esteroidea en las diversas realizaciones de la presente invención se puede administrar al sujeto en una forma adecuada.

En una realización, la saponina esteroidea está en forma de una composición adecuada para uso con el fin de inhibir la angiogénesis.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona una composición cuando se usa para inhibir la angiogénesis en un sistema biológico, en donde la composición incluye una cantidad eficaz de una saponina esteroidea.

La cantidad eficaz de la saponina esteroidea que se va a administrar al sistema biológico (por ejemplo, un sujeto) no está particularmente limitada, siempre y cuando se encuentre dentro de una cantidad tal y en tal forma que muestre generalmente un efecto útil o terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que requiere un tratamiento, mejora el pronóstico y/o el estado del sujeto. La cantidad que se va a administrar a un sujeto dependerá de las características particulares de la angiogénesis que se va a inhibir, el modo de administración y las características del sujeto, tales como el estado de salud general, otras enfermedades, la edad, el sexo, el genotipo y el peso corporal. Una persona experta en la técnica será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas, dependiendo de éstos y otros factores.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis en un sistema biológico.

Como se ha descrito previamente en esta memoria, la administración y la entrega de la saponina esteroidea puede ser, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral o tópica, o mediante inyección directa en el sitio de acción deseado. El modo y la vía de administración en la mayoría de los casos dependerán del tipo de enfermedad o de la afección que se está tratando.

La forma de dosificación, la frecuencia y cantidad de la dosis dependerán del modo y de la vía de administración. Normalmente, una composición inyectable se administrará en una cantidad entre 5 $mg/m^2$ y 500 $mg/m^2$, generalmente entre 10 $mg/m^2$ y 200 $mg/m^2$. Normalmente, una composición administrada por vía oral se administrará en una cantidad entre 5 mg y 5 g, preferentemente entre 50 mg y 1 g.

Por ejemplo, una cantidad eficaz de la saponina esteroidea varía normalmente entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal al día y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal al día, y en una forma entre 1 mg/kg de peso corporal al día y 100 mg/kg de peso corporal al día.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la administración de las composiciones de saponina esteroidea también puede incluir el uso de uno o varios aditivos farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables, aminoácidos, polipéptidos, polímeros, disolventes, tampones, excipientes, agentes conservantes y de relleno, teniendo en cuenta las características físicas, microbiológicas y químicas particulares de la saponina esteroidea que se va a administrar.

Por ejemplo, la saponina esteroidea se puede preparar en una variedad de composiciones farmacéuticas aceptables, en forma, por ejemplo, de una solución acuosa, una preparación oleosa, una emulsión grasa, una emulsión, un polvo liofilizado para reconstitución, etc., y se puede administrar como una inyección intramuscular o subcutánea estéril y exenta de pirógenos, o como una inyección en un órgano, o como una preparación incrustada o como una preparación administrada a través de la mucosa de la cavidad nasal, recto, útero, vagina, pulmón, etc. La composición se puede administrar en forma de preparaciones orales (por ejemplo, preparaciones sólidas tales como comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas, gránulos o polvos; preparaciones líquidas tales como jarabe, emulsiones, dispersiones o suspensiones).

Las composiciones que contienen la saponina esteroidea también pueden contener uno o varios agentes conservantes, tamponadores, diluyentes, estabilizantes, agentes quelantes, agentes potenciadores de la viscosidad, agentes dispersantes, controladores del pH, agentes que modifican la solubilidad o agentes isotónicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos de agentes conservantes adecuados son los ésteres de ácido benzoico del ácido para-hidroxibenzoico, fenoles, alcohol feniletílico o alcohol bencílico. Ejemplos de tampones adecuados son sales de fosfato de sodio, ácido cítrico, ácido tartárico y similares. Ejemplos de estabilizantes adecuados son antioxidantes tales como acetato de alfa-tocoferol, alfa-tioglicerina, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, acetilcisteína, 8-hidroxiquinolina, y agentes quelantes tales como edetato disódico. Ejemplos de agentes potenciadores de la viscosidad, agentes de suspensión, dispersión o solubilizacion adecuados son éteres de celulosa sustituida, ésteres de celulosa sustituida, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polietilenglicoles, carbómero, polioxipropilenglicoles, monooleato de sorbitán, sesquioleato de sorbitán, aceite de ricino hidrogenado y polioxietilenado 60.

Ejemplos de controladores del pH adecuados incluyen ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, tampones y similares. Ejemplos de agentes isotónicos adecuados son glucosa, D-sorbitol o D-manitol, cloruro de sodio.

La administración de la saponina esteroidea también puede ser en forma de una composición que contiene vehículo, diluyente, excipiente, agente de suspensión, agente lubricante, adyuvante, vehículo, sistema de entrega, emulgente, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, deslizante, antiadherente, ligante, saborizante o edulcorante farmacéuticamente aceptable, teniendo en cuenta las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la saponina esteroidea que se va a administrar.

Para estos fines, la composición se puede administrar por vía oral, parenteral, mediante pulverización para inhalación, adsorción, absorción, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, intraventricular, a través de un depósito implantado en formulaciones de dosificación que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, o mediante cualquier otra forma de dosificación conveniente. El término parenteral, tal como se usa en esta memoria, incluye una inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal e intracraneal o técnicas de infusión.

Cuando se administra parenteralmente, la composición estará normalmente en forma inyectable estéril, exenta de pirógenos de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión que se puede haber reconstituido antes del uso) que normalmente es isotónica con la sangre del receptor con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales formas inyectables estériles son suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, utilizando vehículos, agentes dispersantes o agentes humectantes, agentes que forman complejos, polímeros, coadyuvantes de la solubilidad y agentes de suspensión apropiados. Las formas inyectables estériles también pueden ser soluciones o suspensiones estériles inyectables, en disolventes o diluyentes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como soluciones en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes farmacéuticamente aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, etanol, glicerol, solución salina, dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona, dimetilacetamida, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de cloruro sódico isotónica y solución de Hanks. Además, los aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como disolventes o medios de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite no volátil suave que incluye monoglicéridos o diglicéridos sintéticos, maíz, semilla de algodón, cacahuete y aceite de sésamo. Ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo y ácido oleico y sus derivados glicéridos, incluyendo aceite de oliva y aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas, son útiles en la preparación de inyectables. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener diluyentes o dispersantes de alcoholes de cadena larga.

El vehículo puede contener aditivos, tales como sustancias que potencian la solubilidad, la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, antioxidantes, tampones y conservantes.

Además, la composición que contiene la saponina esteroidea puede estar en una forma para ser reconstituida antes de la administración. Los ejemplos incluyen liofilización, secado por pulverización y similares, para producir una forma sólida adecuada para la reconstitución con un disolvente farmacéuticamente aceptable antes de la administración.

Las composiciones pueden incluir uno o varios tampones, agentes de relleno, agentes isotónicos y crioprotectores y lioprotectores. Ejemplos de excipientes incluyen sales de fosfato, ácido cítrico, azúcares no reductores tales como sacarosa o trehalosa, alcoholes polihidroxílicos, aminoácidos, metilaminas y sales liotrópicas que se prefieren frente a los azúcares reductores tales como maltosa o lactosa.

Cuando se administra oralmente, la saponina esteroidea generalmente se formula en formas de dosificación unitaria tales como comprimidos, comprimidos oblongos, sellos, polvo, gránulos, perlas, pastillas masticables, cápsulas, líquidos, suspensiones o soluciones acuosas, o formas de dosificación similares, utilizando equipos y técnicas convencionales, conocidos en la técnica. Tales formulaciones incluyen normalmente un vehículo sólido, semisólido o líquido. Ejemplos de vehículos incluyen excipientes tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao, aceite de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, jarabe, éteres de celulosa sustituida, polioxietileno monolaurato de sorbitán, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y similares.

Un comprimido se puede preparar mediante prensado o moldeo de la saponina esteroidea opcionalmente con uno o varios ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados se pueden preparar mediante prensado, en una máquina adecuada, del ingrediente activo en una forma fluida tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada, una mezcla del ingrediente activo en polvo y un vehículo adecuado humedecido con un diluyente líquido inerte.

La administración de la saponina esteroidea también puede utilizar la tecnología de liberación controlada.

Para la administración tópica, la composición puede estar en forma de una solución, aerosol, loción, crema (por ejemplo, una crema no iónica), gel, pasta o pomada. Alternativamente, la composición se puede administrar a través de un liposoma, nanosoma, ribosoma o un vehículo nutridifusor.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la cantidad eficaz de saponina esteroidea que se va a administrar no está particularmente limitada, siempre y cuando se encuentre dentro de una cantidad tal y en una forma tal que generalmente muestre un efecto farmacológicamente útil o terapéutico.

La administración de la saponina esteroidea puede incluir además la administración de un agente antiangiogénico, que incluye anticuerpos anti-VEGF, que incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos, aptámeros anti-VEGF y oligonucleótidos antisentido, angiostatina, endostatina, interferones, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinoico e inhibidores tisulares de la metaloproteinasa-2 y -9.

La vía de administración, la dosis y los regímenes de tratamiento de los agentes antiangiogénicos pueden ser determinados por una persona experta en la técnica. Los agentes antiangiogénicos y su uso son generalmente como se describen en "Biotherapy: A comprehensive Overview" (2001) segunda edición, compilado por Paula Trahan Rieger, Jones and Bartlett Publishers International.

La inhibición de la angiogénesis en el sistema biológico se puede determinar mediante un método adecuado conocido en la técnica, tal como el retraso en la aparición de estructuras neovasculares, el desarrollo lento de estructuras neovasculares, la menor aparición de estructuras neovasculares, la gravedad ralentizada o disminuida de los efectos de una enfermedad dependiente de la angiogénesis, la detención del crecimiento angiogénico o la regresión del crecimiento angiogénico previo.

La determinación de la capacidad de la saponina esteroidea para inhibir la angiogénesis puede ser mediante cualquier ensayo adecuado para medir la angiogénesis que sea bien conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear un modelo de explante de la aorta de ratón.

Alternativamente, se puede realizar un ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) o un modelo de neovascularización de la córnea. La capacidad de la saponina esteroidea para inhibir la angiogénesis se puede determinar por el grado de inhibición de la angiogénesis en el embrión de pollo o el grado de inhibición de la angiogénesis en un modelo de neovascularización de la córnea.

Por ejemplo, la capacidad de una saponina esteroidea para inhibir la angiogénesis en un ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo, se puede someter a ensayo poniendo en contacto la membrana corioalantoidea con la saponina esteroidea aplicada a un disco de metilcelulosa. Para el modelo de neovascularización de la córnea, la saponina esteroidea se puede aplicar en la córnea como una composición tópica que contiene la saponina esteroidea, la córnea se raspa y se inocula con un agente para inducir la neovascularización.

Otro método para estudiar la angiogénesis es la implantación subcutánea de diversas esponjas artificiales (es decir, poli(alcohol viníllico), gelatina) en animales. La saponina esteroidea que se va a evaluar se puede inyectar directamente en las esponjas que se colocan en el animal. La neovascularización de las esponjas se determina histológicamente, morfométricamente (densidad vascular), bioquímicamente (contenido en hemoglobina) o mediante una medición del caudal sanguíneo en el sistema vascular de la esponja usando un trazador radiactivo.

También se han desarrollado numerosos modelos tumorales en animales para estudiar la actividad antiangiogénica de los compuestos del ensayo. En muchos casos, las células tumorales están implantadas subcutáneamente y el tamaño del tumor se determina a intervalos regulares de tiempo. Las células tumorales usadas habitualmente incluyen glioma de rata C6, melanoma B16BL6, LLC y carcinoma Walker 256.

También se contempla que la saponina esteroidea de la presente invención será adecuada para el uso con el fin de reducir la cantidad de un agente antiangiogénico administrado a un sistema biológico.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención también proporciona un método para reducir la cantidad de agente antiangiogénico administrado a un sistema biológico, para lograr un nivel de inhibición de la angiogénesis deseado, incluyendo el método la etapa de administrar al sistema biológico una cantidad eficaz de una saponina esteroidea.

La cantidad eficaz de la saponina esteroidea que se va a administrar no está particularmente limitada, siempre y cuando esté dentro de una cantidad tal que generalmente muestre un efecto farmacológicamente útil para reducir la cantidad de agente necesario para alcanzar un nivel deseado de inhibición de la angiogénesis en el sistema biológico.

La administración de la saponina esteroidea puede estar dentro de cualquier espacio de tiempo adecuado para producir el efecto deseado de reducir la cantidad de un agente administrado a un sistema biológico, necesaria para alcanzar un nivel deseado de inhibición de la angiogénesis en el sistema biológico. Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la saponina esteroidea se puede administrar en un sujeto humano o animal, por ejemplo, por vía oral, parenteral, tópica o por cualquier otro medio adecuado, y por lo tanto se tiene que tomar en cuenta el tiempo de tránsito del fármaco.

Como se ha descrito previamente en este documento, los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen anticuerpos anti-VEGF, que incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos, aptámeros anti-VEGF y oligonucleótidos antisentido, angiostatina, endostatina, interferones, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinoico e inhibidores tisulares de la metaloproteinasa-2 y -9.

A este respecto, la cantidad de agente antiangiogénico necesaria para lograr un nivel deseado de inhibición de la angiogénesis, se determinará empíricamente por un método conocido en la técnica, y como tal dependerá del nivel deseado de angiogénesis que se va a inhibir, la edad y el peso corporal del sujeto, y la frecuencia de la administración.

La administración del agente antiangiogénico estará en una forma adecuada y dentro de un espacio de tiempo ade-

cuado para producir el efecto inhibidor deseado de la angiogénesis con el nivel deseado. Los métodos para la formulación y la administración de agentes antiangiogénicos son conocidos en la técnica.

La administración de la saponina esteroidea puede tener lugar al mismo tiempo y de la misma manera que la administración del agente antiangiogénico. Alternativamente, la administración de la saponina esteroidea puede estar separada de la administración del agente antiangiogénico, y puede tener lugar en un momento farmacológicamente adecuado antes o después de la administración del agente.

La presente invención también proporciona un producto de combinación para la administración simultánea o separada de una saponina esteroidea y un agente antiangiogénico a un sujeto para inhibir la angiogénesis. En este caso, el producto de combinación incluye la saponina esteroidea para la administración por separado al sujeto en una forma adecuada o, alternativamente, para la coadministración al sujeto en una forma adecuada.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un producto de combinación que incluye una saponina esteroidea y un agente antiangiogénico, la saponina esteroidea y el agente antiangiogénico se proporcionan en una forma para coadministración a un sujeto o en una forma para administración por separado a un sujeto.

Los componentes del producto de combinación se pueden envasar por separado o juntos en recipientes adecuadamente esterilizados tales como ampollas, botellas o viales, ya sea en formas de dosificación de dosis múltiples o unitarias. Los recipientes normalmente están sellados herméticamente. Se conocen métodos en la técnica para el envasado de los componentes.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la coadministración puede ser secuencial o simultánea y generalmente significa que los agentes están presentes en el sujeto durante un intervalo de tiempo especificado. Normalmente, si se administra un segundo agente durante la semivida del primer agente, los dos agentes se consideran que están coadministrados.

La presente invención se puede emplear para inhibir la proliferación y/o la migración de células endoteliales.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un método para inhibir la proliferación y/o la migración de células endoteliales en un sistema biológico, incluyendo el método la etapa de administrar al sistema biológico una cantidad eficaz de una saponina esteroidea.

En este sentido, se apreciará que el sistema biológico sea cualquier sistema biológico en el que se está produciendo una proliferación y/o migración de células endoteliales o en el que se puede producir una angiogénesis.

En una realización, el sistema biológico es un sujeto humano o animal.

En una realización adicional, el sistema biológico es un sujeto humano o animal en el que la proliferación y/o la migración de células endoteliales está asociada con una enfermedad o una afección que es debida a una proliferación y/o una migración no deseada o incontrolada de las células endoteliales.

Por ejemplo, el sistema biológico puede ser un sujeto humano o animal que padece o es susceptible de padecer proliferación y/o migración de las células endoteliales, asociada con la formación o expansión de angiofibroma, neovascularización de la córnea, neovascularización retinal/coroidal, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, malformaciones arteriovenosas, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, lupus, trastornos del tejido conectivo, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas, psoriasis, granuloma piógeno, fibroplasias retrolenticulares, esclerodermia, granulaciones, hemangioma; tracoma, articulaciones hemofílicas, adherencias vasculares, cicatrices hipertróficas, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación aguda o crónica, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica del pulmón incluyendo asma, sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

La cantidad de saponina esteroidea administrada al sistema biológico generalmente está en un intervalo tal que las células endoteliales diana estarán expuestas a una concentración de 0,1 μM a 20 μM de la saponina esteroidea.

La saponina esteroidea se puede administrar en una forma y a una concentración adecuada para permitir que los agentes alcancen el sitio de acción deseado y tengan un efecto inhibidor de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales.

La administración de la saponina esteroidea puede estar dentro de cualquier espacio de tiempo adecuado para producir el efecto inhibidor deseado de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales. En un sujeto humano o animal, la saponina esteroidea se puede administrar por ejemplo por vía oral, parenteral, tópica o por cualquier otro medio adecuado, y por lo tanto se tiene que tener en cuenta el tiempo de tránsito del agente.

Por ejemplo, la administración de la saponina esteroidea al sujeto en las diversas realizaciones de la presente invención puede ser en un momento o más antes del inicio de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales, y/o simultáneamente a la proliferación y/o la migración de las células endoteliales que esté teniendo lugar.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la saponina esteroidea se puede formular y adminis-

trar al sujeto en una forma adecuada y de una manera adecuada.

En una realización, la saponina esteroidea está en forma de una composición adecuada para emplear en la inhibición de la angiogénesis.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona una composición cuando se emplea para inhibir la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en un sistema biológico, en donde la composición incluye una cantidad eficaz de una saponina esteroidea.

La cantidad eficaz de la saponina esteroidea que se va a administrar al sujeto no está particularmente limitada, siempre y cuando esté dentro de una cantidad tal y en una forma tal que generalmente presente un efecto útil o terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que requiere el tratamiento, mejora el pronóstico y/o el estado del sujeto. La cantidad que se va a administrar a un sujeto dependerá de las características particulares de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales que se van a inhibir, el modo de administración y las características del sujeto, tales como el estado de salud general, otras enfermedades, la edad, el sexo, el genotipo y el peso corporal. Una persona experta en la técnica será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y de otros factores.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en un sistema biológico.

Como se ha descrito previamente en esta memoria, la administración y la entrega de la saponina esteroidea se pueden realizar, por ejemplo, a través de la vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral o tópica, o mediante una inyección directa en el sitio de acción deseado. El modo y la vía de administración en la mayoría de los casos dependerá del tipo de enfermedad o la afección que se está tratando, tal y como se ha descrito anteriormente en este documento.

La forma de dosificación, la frecuencia y la cantidad de la dosis dependerá del modo y la vía de administración. Normalmente, una composición inyectable se administrará en una cantidad entre 5 $mg/m^2$ y 500 $mg/m^2$, preferiblemente entre 10 $mg/m^2$ y 200 $mg/m^2$. Normalmente, una composición administrada por vía oral se administrará en una cantidad entre 5 mg y 5 g, preferentemente entre 50 mg y 1 g.

Por ejemplo, una cantidad eficaz de la saponina esteroidea varía normalmente entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal al día y aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal al día, y en una forma entre 1 mg/kg de peso corporal al día y 100 mg/kg de peso corporal al día.

Como se ha descrito previamente en este documento, la administración de las composiciones de la saponina esteroidea también puede incluir el uso de uno o varios aditivos farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables, aminoácidos, polipéptidos, polímeros, disolventes, tampones, excipientes, agentes conservantes y de relleno, teniendo en cuenta las características físicas, microbiológicas y químicas particulares de la saponina esteroidea que se va a administrar.

Como se ha descrito previamente en este documento, las composiciones que contienen la saponina esteroidea también pueden contener uno o varios agentes conservantes, de tamponamiento, diluyentes, estabilizantes, quelantes, potenciadores de la viscosidad, dispersantes, reguladores del pH o isotónicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes son bien conocidos para los expertos en la técnica.

La administración de la saponina esteroidea puede incluir además la administración de un agente antiangiogénico, que incluye anticuerpos anti-VEGF que incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos, aptámeros anti-VEGF y oligonucleótidos antisentido, angiostatina, endostatina, interferones, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinoico e inhibidores tisulares de la metaloproteinasa-2 y -9.

La inhibición de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en el sistema biológico se puede determinar mediante un método adecuado conocido en la técnica.

Por ejemplo, en el caso de proliferación celular, métodos tales como el recuento de células, la incorporación de $^3$[H] timidina, la tinción inmunohistoquímica para estudiar la proliferación celular, la aparición retrasada de estructuras neovasculares, el desarrollo más lento de estructuras neovasculares, la disminución de la aparición de estructuras neovasculares, el retraso o la disminución de la gravedad de los efectos de enfermedades dependientes de la angiogénesis, la detención del crecimiento angiogénico o la regresión del crecimiento angiogénico previo.

La determinación de la capacidad de una saponina esteroidea para inhibir la proliferación de las células endoteliales se puede realizar mediante un ensayo adecuado conocido en la técnica, en el que las células se tratan y se mide la proliferación celular endotelial. Por ejemplo, las células endoteliales del sistema vascular umbilical humano se pueden cultivar *in vitro* en el medio apropiado y la proliferación de las células endoteliales se puede medir, por ejemplo, mediante la captación de timidina tritiada. La capacidad de un agente para inhibir la proliferación en un ensayo de este tipo, se puede someter a ensayo a continuación, poniendo en contacto las células endoteliales con el agente y

determinando el grado de inhibición de la proliferación que se produce a cualquier concentración particular.

En el caso de migración de las células endoteliales, un ensayo adecuado es el sistema de angiogénesis BD Bio-Coat®: Migración de células endoteliales.

También se contempla que la saponina esteroidea de la presente invención será adecuada para emplear en la reducción de la cantidad de agente antiangiogénico administrado a un sistema biológico.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de agente antiangiogénico administrado a un sistema biológico, para lograr un nivel deseado de inhibición de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales, incluyendo el método la etapa de administrar al sistema biológico una cantidad eficaz de una saponina esteroidea.

La cantidad eficaz de la saponina esteroidea que se va a administrar no está particularmente limitada, siempre y cuando esté dentro de una cantidad tal que generalmente muestre un efecto farmacológicamente útil para reducir la cantidad de agente necesario para alcanzar un nivel deseado de inhibición de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en el sistema biológico.

La administración de la saponina esteroidea puede estar dentro de cualquier espacio de tiempo adecuado para producir el efecto deseado de reducción de la cantidad de un agente administrado a un sistema biológico, necesaria para alcanzar un nivel deseado de inhibición de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales en el sistema biológico. Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, en un sujeto humano o animal, la saponina esteroidea se puede administrar, por ejemplo, por vía oral, parenteral, tópica o por cualquier otro medio adecuado, y por lo tanto se tiene que tener en cuenta el tiempo de tránsito del fármaco.

Como se ha descrito previamente en este documento, los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen anticuerpos anti-VEGF, que incluyen anticuerpos humanizados y quiméricos, aptámeros anti-VEGF y oligonucleótidos antisentido, angiostatina, endostatina, interferones, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinoico e inhibidores tisulares de la metaloproteinasa-2 y -9.

En este sentido, la cantidad de agente antiangiogénico necesaria para lograr un nivel deseado de inhibición de la proliferación y/o la migración de las células endoteliales, se determinará empíricamente por un método conocido en la técnica, y como tal dependerá del nivel deseado que se va a inhibir, la edad y el peso corporal del sujeto, y la frecuencia de la administración.

La administración del agente antiangiogénico será en una forma adecuada y dentro de un espacio de tiempo adecuado para producir el efecto inhibidor deseado de la angiogénesis al nivel deseado. Los métodos para la formulación y la administración de agentes antiangiogénicos son conocidos en la técnica.

La administración de la saponina esteroidea puede tener lugar al mismo tiempo y de la misma manera que la administración del agente antiangiogénico. Alternativamente, la administración de la saponina esteroidea puede estar separada de la administración del agente antiangiogénico, y se produce en un momento farmacológicamente adecuado antes o después de la administración del agente.

La presente invención también proporciona un producto de combinación para la administración simultánea o por separado de una saponina esteroidea y un agente antiangiogénico a un sujeto, para inhibir la proliferación y/o la migración de las células endoteliales. En este caso, el producto de combinación incluye la saponina esteroidea para la administración por separado al sujeto en una forma adecuada, o alternativamente, para la coadministración al sujeto en una forma adecuada.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un producto de combinación que incluye una saponina esteroidea y un agente antiangiogénico, la saponina esteroidea y el agente antiangiogénico proporcionados en una forma para coadministrar a un sujeto o en una forma para administrar por separado a un sujeto.

Los componentes del producto de combinación se pueden envasar por separado o juntos en recipientes esterilizados adecuadamente, tales como ampollas, botellas o viales, ya sea en formas de dosificación con dosis múltiples o unitarias. Los recipientes normalmente están sellados herméticamente. Se conocen métodos en la técnica para el envasado de los componentes.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la coadministración puede ser secuencial o simultánea y generalmente significa que los agentes están presentes en el sujeto durante un intervalo de tiempo especificado. Normalmente, si se administra un segundo agente durante la semivida del primer agente, se considera que los dos agentes están coadministrados.

Los métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas son conocidos en la técnica, por ejemplo tal y como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.; U.S. Pharmacopeia: National Formulary, 1984, Mack Publishing Company, Easton, Pa.; y M.E. Aulton, Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design, 2ª ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002.

La administración terapéutica de biomoléculas generalmente es como se describe en Bladon, C. (2002) "Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomolecules", John Wiley & Sons Ltd.

**Descripción de realizaciones específicas**

A continuación se hace referencia a experimentos que incorporan los anteriores principios generales de la presente invención.

Ejemplo 1

*Materiales*

La diosgenina, dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc) y trilina (diosgenina-Glc), se obtuvieron comercialmente a partir de Ningbo Hanpharm Biotech Co Ltd, la gracilina de ChromaDex y la trilina de Aktin Chemicals. La prosapogenina A: diosgenina Rha2, Glc, se sintetizó según el método descrito por Li et al., *Carbohydr. Res*., (2001) 331, 1-7. La dioscina y la prosapogenina A también se aislaron a partir de *Paris polyphylla.* El sorafenib se obtuvo comercialmente.

Ejemplo 2

*Determinación de los efectos de la deltonina sobre el crecimiento de vasos en explantes aórticos*

Tres ratones macho C57BL6/J (9 semanas de edad) fueron sacrificados mediante asfixia con $CO_2$ y la sangre se recogió por punción cardiaca, usando una aguja de calibre 29. A continuación, la aorta se diseccionó (desde el arco aórtico hasta la interfaz pleural/peritoneal) y se colocó en DMEM enfriado con hielo, complementado con Hepes 10 mM y penicilina/estreptomicina.

Los tejidos fibrosos y adiposos alrededor de la aorta se retiraron mediante disección microscópica y la aorta se vació mediante enjuague de la sangre usando DMEM enfriado con frío. La aorta se diseccionó después longitudinalmente y se cortó en cuadrados de aproximadamente 1 mm. Las piezas individuales de aorta se incorporaron en una gota (20 µl) de solución de colágeno en el fondo de un pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. Las placas se colocaron a continuación a 37ºC/5% de $CO_2$ durante 10 minutos para polimerizar el colágeno en un gel. A continuación se añadió medio (0,3 mL) solo, que contenía DMSO o deltonina en DMSO y luego se añadió a cada pocillo para formar un foso alrededor del gel de colágeno.

Solo los 8 pocillos centrales de cada placa de 24 pocillos se utilizaron para cultivos de explantes, para evitar un intercambio gaseoso diferencial y tasas de evaporación entre los pocillos con muestras de explante. Los pocillos externos se llenaron con PBS.

Se sometieron a ensayo nueve grupos con 8 réplicas cada uno:

1. Medio solo (EBM-2 complementado con Hepes 10 mM y 2% de suero de ratón normal (I).

2. Medio más 1 µl/ml de DMSO (diluyente testigo para deltonina) (H).

3. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 10 nM (G).

4. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 30 nM (F).

5. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 100 nM (E).

6. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 300 nM (D).

7. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 1 µM (C).

8. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 3 µM (B).

9. Medio más 1 µl/ml de DMSO, deltonina 10 µM (A).

Los explantes se cultivaron a continuación a 37°C/5% de $CO_2$ en una incubadora húmeda durante 6 días. Los explantes se fijaron a temperatura ambiente durante 20 minutos mediante la adición de un volumen igual (0,3 ml) de 4% de paraformaldehído en PBS a cada pocillo. Después de lavar tres veces con solución salina tamponada con Hepes (HBS, NaCl 150 mM, Hepes 10 mM), los explantes se tiñeron con 10 µg/ml de conjugado de FITC-BS-1 lectina (BS-1 lectina se une específicamente a las células endoteliales de ratón) en HBS, durante una noche a 4ºC. Al día siguiente, los explantes se lavaron tres veces con HBS. Excrecencias vasculares procedentes de los explantes se visualizaron por microscopía de fluorescencia y se tomaron fotografías para el análisis de datos. Se fotografiaron múltiples imágenes fluorescentes con foco a múltiples profundidades para cada explante y las fotografías se procesaron utilizando un programa informático de desconvolución, de modo que se pudo determinar la excrecencia vascular total para cada explante. El crecimiento celular total asociado con cada explante también se visualizó mediante microscopía luminosa, usando un microscopio de disección y se documentó con fotografías. Para facilitar la visuali-

zación y el análisis, se preparó una imagen en blanco y negro invertida, compuesta a partir de las múltiples imágenes fluorescentes de las excrecencias vasculares para cada explante. La cantidad de brotes vasculares y la cantidad de ramas de los vasos para cada explante se contó a continuación, en donde la persona que hacía el recuento ignoraba la identidad de cada muestra. Los resultados se resumen en la Tabla 4, y se muestran gráficamente en la Figura 1.

Tabla 4

| Concentración de Deltonina (μM) | Brotes | | Ramas | |
|---|---|---|---|---|
| | Media | DE | Media | DE |
| sin DMSO | 28 | 10 | 43 | 17 |
| 0 | 17 | 5 | 26 | 9 |
| 0,01 | 11 | 7 | 16 | 10 |
| 0,03 | 18 | 6 | 26 | 9 |
| 0,1 | 18 | 6 | 24 | 9 |
| 0,3 | 16 | 4 | 20 | 5 |
| 1 | 13 | 5 | 16 | 7 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota: los brotes y las ramificaciones de los vasos en explantes cultivados con deltonina 0,01 μM no son estadísticamente diferentes de los cultivos de explantes testigos tratados con DMSO, a pesar de una aparente reducción en el gráfico.

Había un efecto inhibidor significativo solo de DMSO, el vehículo para la deltonina, sobre la respuesta angiogénica tal y como se observó por reducciones significativas en los brotes y las ramificaciones vasculares en explantes aórticos tratados con DMSO, en comparación con explantes aórticos cultivados en ausencia de DMSO.

Sin embargo, concentraciones elevadas de deltonina inhibían significativamente los brotes vasculares (10 y 3 μM) y las ramificaciones vasculares (10, 3 y 1 μM) procedentes de explantes aórticos, en comparación con cultivos de explantes testigos tratados con DMSO.

Ejemplos representativos de las muestras se muestran en las Figuras 2 y 3.

Ejemplo 3

*Determinación de la inhibición de la proliferación y la migración de células endoteliales mediante saponinas esteroideas utilizando el método de ensayo AngioSponge®*

El ensayo AngioSponge® permite la liberación lenta de factor de crecimiento capturado en agarosa, que estimula la proliferación y la migración de células endoteliales, y proporciona una matriz similar a un tejido para la neovascularización. El ensayo se puede utilizar por tanto para medir la eficacia de tratamientos diseñados para inhibir la angiogénesis, determinada por el recuento de vasos sanguíneos después de una tinción inmunohistoquímica con CD31 de las células endoteliales (McCarty et al, *International Journal of Oncology*, 21:5-10, 2002).

Espumas de gel (Pharmacia & Upjohn) se cortaron en piezas de aproximadamente 7x7x7 mm, en condiciones estériles, y se remojaron previamente durante una noche con solución salina tamponada con fosfato estéril. Las espumas de gel hidratadas se secaron parcialmente a continuación. El factor de crecimiento (bFGF) se diluyó a una concentración inicial de 2 μg/ml en agarosa caliente (37°C) al 0,4%. Las espumas de gel parcialmente secas se colocaron en la solución del factor de crecimiento, o en agarosa caliente al 0,4% y sin factor de crecimiento, y después se transfirieron a una placa de Petri que contenía agarosa caliente al 0,4% (dilución 1:1, concentración final de factor de crecimiento 1 μg/mL) para la polimerización y solidificación.

A 70 ratones hembra C3H/Hej se les colocaron microchips, se pesaron y se clasificaron aleatoriamente basándose

en el peso corporal, en 7 grupos con 10 ratones por grupo. Para la implantación, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de halotano. Se forjó un pequeño canal con una aguja de trocar entre la tercera y la cuarta glándula mamaria, la esponja se insertó hasta el fondo completo del canal y la incisión se cerró con un clip para heridas.

Los compuestos se formularon en N-metil-pirrolidona (NMP):PEG300:Agua (1:9:10, v/v). La dosificación se estableció basándose en los datos de la $CI_{50}$ *in vitro* y estudios preliminares de la toxicidad. Los compuestos se administraron diariamente mediante inyección intraperitoneal, con un volumen de dosificación de 10 ml/kg, una vez al día durante el período de estudio, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

| Tratamiento | Dosificación una vez al día |
|---|---|
| Vehículo | NMP:PEG300:Agua (1:9:10, v/v) |
| Vehículo + bFGF | NMP:PEG300:Agua (1:9:10, v/v) |
| Dioscina + bFGF | 10 mg/kg |
| Deltonina + bFGF | 10 mg/kg |
| Trilina + bFGF | 60 mg/kg |
| Prosapogenina A + bFGF | 20 mg/kg |
| Sorafenib + bFGF | 60 mg/kg |

El tratamiento se inició cuando todos los animales se habían recuperado totalmente de la anestesia, y continuó durante 10 días. El Día 11, se extirparon las angioesponjas y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido con OCT para la tinción con CD31 sobre secciones congeladas.

CD31/PECAM-1 es un antígeno presente específicamente en las células endoteliales y por lo tanto se puede utilizar como marcador de los vasos sanguíneos. Las muestras congeladas de la esponja se crioseccionaron (12 µm), se montaron sobre portaobjetos Plus cargados positivamente (Fisher Scientific) y se secaron al aire durante 30 minutos. Las secciones congeladas se fijaron a su vez en acetona fría, acetona/cloroformo (1:1, v/v) y acetona durante 5 min cada una, y después se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Después de bloquear con PBS que contenía 5% de suero de caballo normal y 1% de suero de cabra normal, las secciones se incubaron con anticuerpo monoclonal CD31 de rata anti-ratón PECAM-1 (1:5000 en solución de bloqueo, PharMingen, San Diego, CA) durante 4 horas a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron a continuación tres veces con PBS y se incubaron con anticuerpo anti-rata secundario adecuado. Las reacciones positivas se visualizaron mediante la incubación de los portaobjetos en 3,3'-diaminobencidina estable durante 5-10 min. Las secciones se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Gill durante 1 min y se montaron con Universal Mount (Research Genetics). Las muestras testigo expuestas al anticuerpo secundario solo, no mostraron una tinción específica. La placenta de ratón se utilizó como testigo positivo. Para la cuantificación, se seleccionaron 3 campos visuales independientes y se contaron las manchas o los vasos con lumen teñidos positivos.

Los resultados fueron cotejados con el número promedio de vasos sanguíneos (recuentos de CD31) y se resumen en la Tabla 6:

Tabla 6

| Tratamiento | Número promedio de vasos sanguíneos | Porcentaje de Inducción |
|---|---|---|
| Vehículo | 0 | 0 |
| Vehículo + bFGF | 72 | 100 |
| Dioscina + bFGF | 35 | 49 |
| Deltonina + bFGF | 44 | 61 |
| Trilina + bFGF | 41 | 57 |

| Tratamiento | Número promedio de vasos sanguíneos | Porcentaje de Inducción |
|---|---|---|
| Prosapogenina A + bFGF | 21 | 29 |
| Sorafenib + bFGF | 2 | 3 |

El porcentaje de inducción para un tratamiento es la diferencia en el recuento de CD31 entre el tratamiento (+ bFGF) y el vehículo solo (sin bFGF), dividido por la diferencia en el recuento de CD31 entre el vehículo con bFGF y el vehículo solo (sin bFGF), expresado como un porcentaje.

El número de vasos sanguíneos y el porcentaje de inducción se representan gráficamente frente a los tratamientos en las Figuras 4 y 5. Los resultados muestran que las saponinas esteroideas causan una reducción de la angiogénesis en el sistema modelo de angioesponja.

Ejemplo 3

*Determinación de la inhibición de la proliferación y la migración de células endoteliales mediante saponinas esteroideas utilizando el método de ensayo AngioChamber®.*

El ensayo AngioChamber® utiliza el proceso fisiológico normal de la curación de heridas, que favorece la formación de una cápsula fibrosa alrededor de una cámara implantada (Wood et al., (2000) *Cancer Research*, 60(8):2178-891). La inclusión de bFGF en la cámara induce el desarrollo de vasos sanguíneos en la cápsula fibrosa. Por tanto, el ensayo evalúa la eficacia de los tratamientos midiendo su efecto tanto sobre la formación de la cápsula fibrosa, medida por el peso húmedo de la cápsula al final del estudio, como mediante la determinación del suministro de vasos sanguíneos a la cámara, sometiendo a ensayo el contenido en hemoglobina. El contenido en hemoglobina de la cápsula fibrosa es una medida de la neovascularización, que se analiza mediante el ensayo de Drabkin.

Las angiocámaras eran cámaras de tejido poroso elaboradas con perfluoro-alcoxi-teflón y se rellenadas con 0,8% de agar que contenía 20 UI/ml de heparina, con o sin 1 µg/ml de bFGF humano. Ambos extremos de la cámara se sellaron con tapas extraíbles del mismo material. Las cámaras se llenaron bajo condiciones estériles con 0,8% de agar que contenía 20 UI/ml de heparina, con o sin 1 µg/ml de bFGF humano. La solución de agarosa se mantuvo a 37ºC antes de llenar las cámaras.

A 70 ratones hembra FvB se les colocaron microchips, se pesaron y se clasificaron aleatoriamente basándose en el peso corporal, en 7 grupos con 10 ratones por grupo. Para la implantación, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de halotano. Aproximadamente 150 µl de aire filtrado estéril se inyectó por vía subcutánea en el lomo de cada ratón, entre los omóplatos, dando lugar a una bolsa de aire en la que se efectuó una pequeña incisión y se insertó la cámara. La herida se cerró con dos clips para heridas de 1,4 mm.

Los tratamientos que se formularon todos en NMP:PEG300:Agua (1:9:10, v/v) y se administraron diariamente mediante inyección intraperitoneal, eran tal y como figuran en la Tabla 7:

Tabla 7

| Tratamiento | Dosificación una vez al día |
|---|---|
| Vehículo | NMP:PEG300:Agua (1:9:10, v/v) |
| Vehículo + bFGF | NMP:PEG300:Agua (1:9:10, v/v) |
| Dioscina + bFGF | 10 mg/kg |
| Deltonina + bFGF | 10 mg/kg |
| Trilina + bFGF | 60 mg/kg |
| Prosapogenina A + bFGF | 20 mg/kg |
| Sorafenib + bFGF | 60 mg/kg |

El tratamiento se inició cuando todos los animales se habían recuperado totalmente de la anestesia, y continuó durante 5 días. El día 6, se retiraron las cámaras fibrosas vascularizadas y se registró el peso húmedo de cada implante. La cámara de cada ratón se congeló rápidamente a continuación con nitrógeno líquido y se almacenó a -20ºC hasta que se determinó el contenido en hemoglobina.

Las muestras de cápsula fibrosa se descongelaron y se mantuvieron sobre hielo durante el procedimiento. Se añadió agua estéril a cada muestra descongelada, y la muestra se homogeneizó con un aparato UltraTourax a velocidad elevada. Para evitar la contaminación cruzada, el UltraTourax se lavó abundantemente durante 30 segundos con 5 ml de agua destilada después de homogeneizar cada muestra. El material homogeneizado se transfirió a tubos Eppendorf de 2 ml y se almacenó sobre hielo. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 4°C y velocidad elevada (fuerza centrífuga relativa (FCR) de 14.000) durante 60 min. Se transfirieron 1,0-1,5 ml de la solución acuosa intermedia (homogeneizado), entre el sedimento y la capa de grasa, a tubos Eppendorf de 1,5 ml recién etiquetados y se almacenaron sobre hielo. Se transfirieron 50 µl de cada homogeneizado a pocillos distintos de una placa de 96 pocillos. Se transfirieron 50 µl de agua a 2 pocillos como blancos. A continuación, se añadieron 50 µl de reactivo de Drabkin a cada pocillo y se mezcló. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de cada muestra a 540 nm y el volumen de sangre para cada muestra se calculó a partir de una curva estándar.

Los resultados se presentaron como peso promedio de la cámara, contenido promedio en sangre (a partir del contenido en hemoglobina y el porcentaje de inducción), y se resumen en la Tabla 8:

Tabla 8

| Tratamiento | Peso promedio de la cámara (g) | Contenido promedio en sangre (µL) | Porcentaje de Inducción |
|---|---|---|---|
| Vehículo | 0,066 | 0,44 | 0 |
| Vehículo + bFGF | 0,375 | 2,21 | 100 |
| Dioscina + bFGF | 0,131 | 1,24 | 45 |
| Deltonina + bFGF | 0,126 | 0,79 | 20 |
| Trilina + bFGF | 0,421 | 1,46 | 58 |
| Prosapogenina A + bFGF | 0,389 | 1,92 | 84 |
| Sorafenib + bFGF | 0,322 | 0,92 | 27 |

El porcentaje de inducción para un tratamiento es la diferencia en el contenido en sangre entre el tratamiento (+bFGF) y el vehículo solo (sin bFGF), dividida entre la diferencia en el contenido en sangre entre el vehículo con bFGF y el vehículo solo (sin bFGF), expresada como un porcentaje.

El contenido promedio en sangre de las angiocámaras y el porcentaje de inducción se representan gráficamente frente a los tratamientos en las Figuras 6 y 7. Los resultados muestran que las saponinas esteroideas causan una reducción en la angiogénesis en el sistema modelo de angioesponja.

## REIVINDICACIONES

1. Una saponina esteroidea para uso en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto humano o animal, en donde la saponina esteroidea se selecciona a partir del grupo que consiste en deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc) y prosapogenina A (diosgenina Rha2, Glc), y en donde la angiogénesis es una angiogénesis asociada con angiofibroma, neovascularización de la córnea, neovascularización retinal/coroidal, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, malformaciones arteriovenosas, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, lupus, trastornos del tejido conectivo, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas, psoriasis, granuloma piógeno, fibroplasias retrolenticulares, esclerodermia, hemangioma; tracoma, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación aguda o crónica, enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica del pulmón incluyendo asma, sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

2. Una saponina esteroidea para uso según la reivindicación 1, en donde la saponina esteroidea reduce la cantidad de un agente antiangiogénico necesaria para administrar al sistema biológico para conseguir un nivel deseado de inhibición de la angiogénesis.

3. Una saponina esteroidea para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el agente antiangiogénico es uno o varios agentes seleccionados a partir del grupo que consiste en un anticuerpo anti-VEGF, que incluye un anticuerpo humanizado y/o quimérico, un aptámero anti-VEGF, un oligonucleótido antisentido de VEGF, angiostatina, endostatina, un interferón, interleucina 1, interleucina 12, ácido retinoico y un inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 y -9.

*Fig. 1*

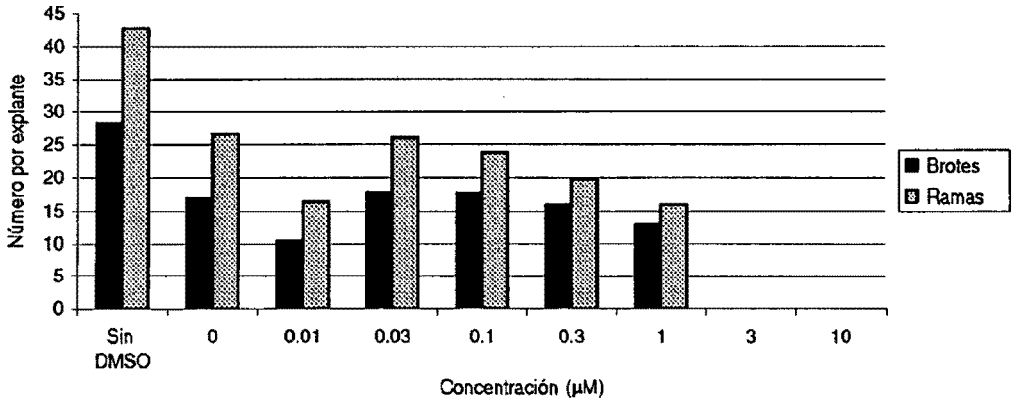
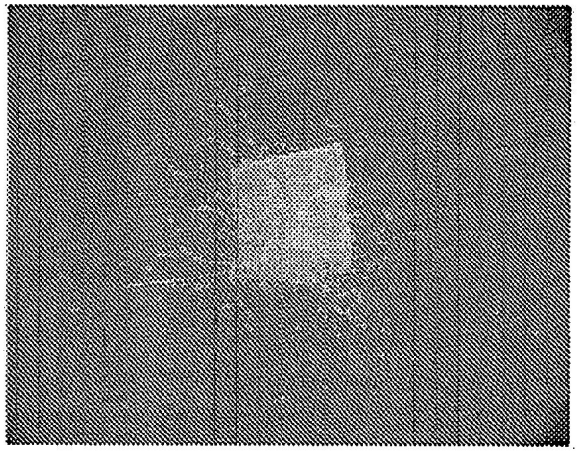

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Número por explante
Sin DMSO
0
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10
Concentración (µM)
Brotes
Ramas

*Fig. 2*

Testigo DMSO - microscopio luminoso



Testigo DMSO - teñido con lectina Fitc-BS-1

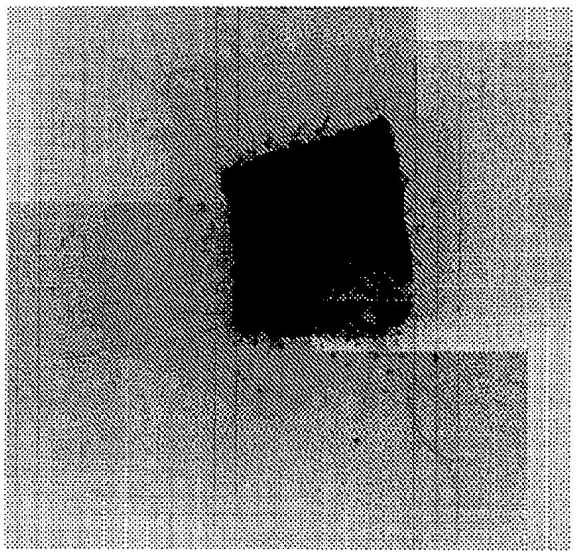
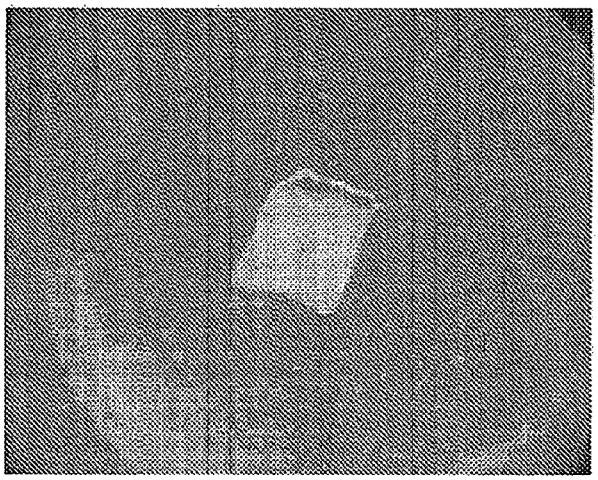


*Fig. 3*

Deltonina 10 µM - microscopio luminoso



Deltonina 10 µM - teñida con lectina Fitc-BS-1

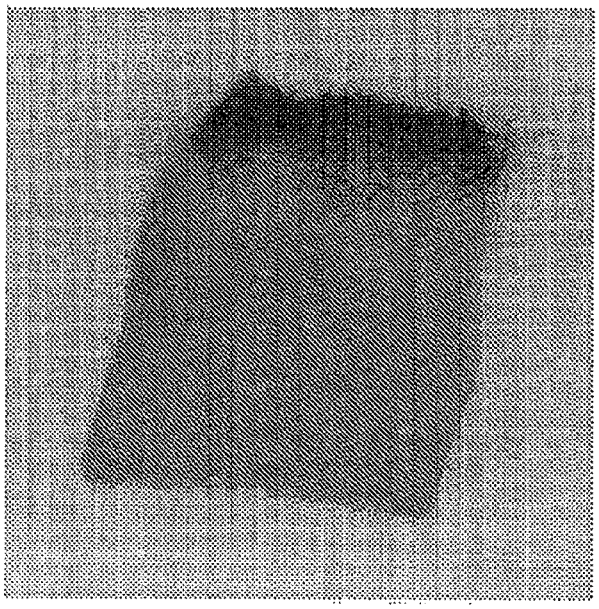


*Fig. 4*

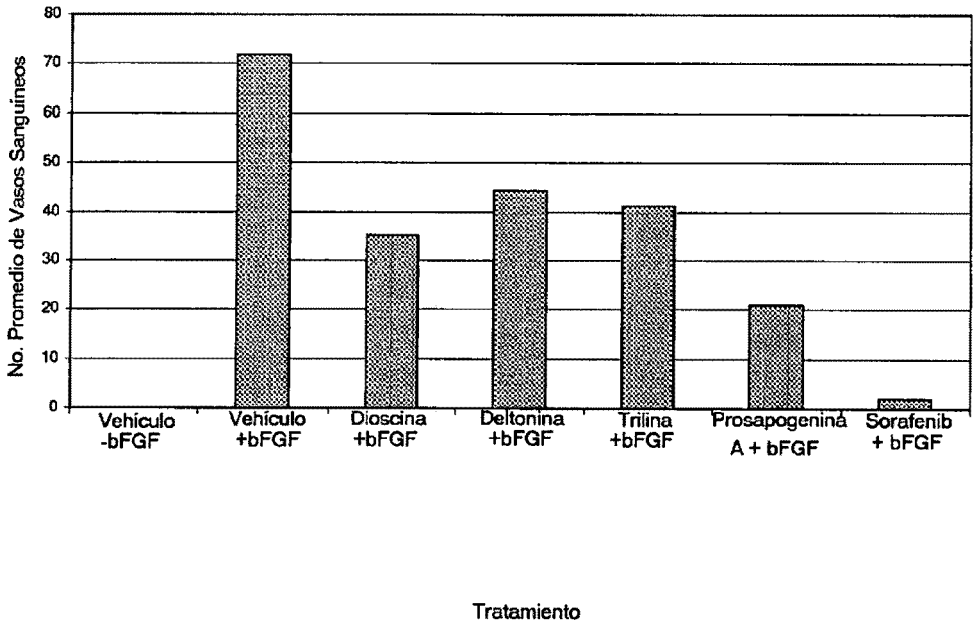

No. Promedio de Vasos Sanguíneos
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Vehículo -bFGF
Vehículo +bFGF
Dioscina +bFGF
Deltonina +bFGF
Trilina +bFGF
Prosapogenina A + bFGF
Sorafenib + bFGF
Tratamiento

*Fig. 5*

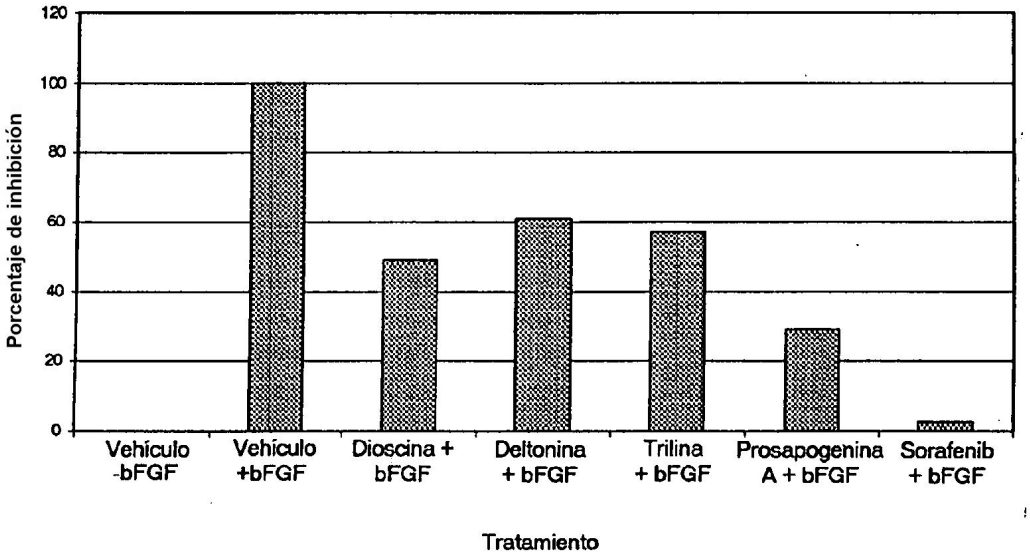

120
100
80
60
40
20
0
Porcentaje de inhibición
Vehículo -bFGF
Vehículo +bFGF
Dioscina + bFGF
Deltonina + bFGF
Trilina + bFGF
Prosapogenina A + bFGF
Sorafenib + bFGF
Tratamiento

*Fig. 6*

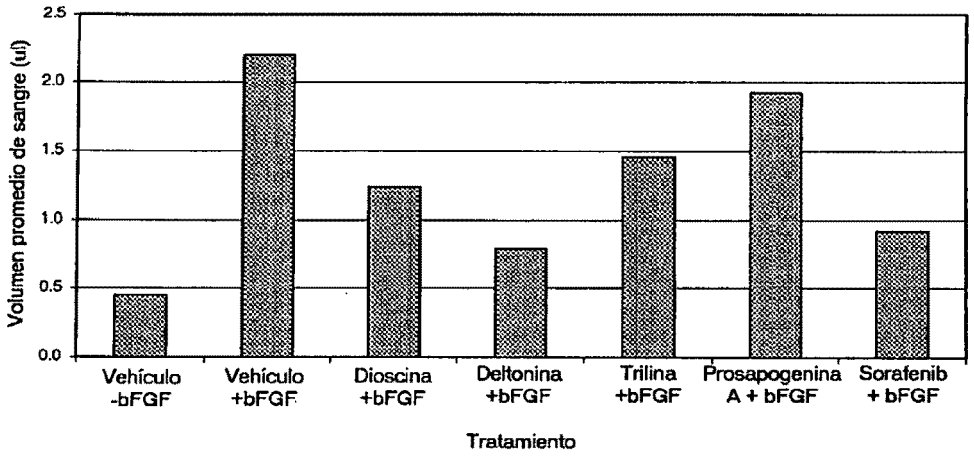
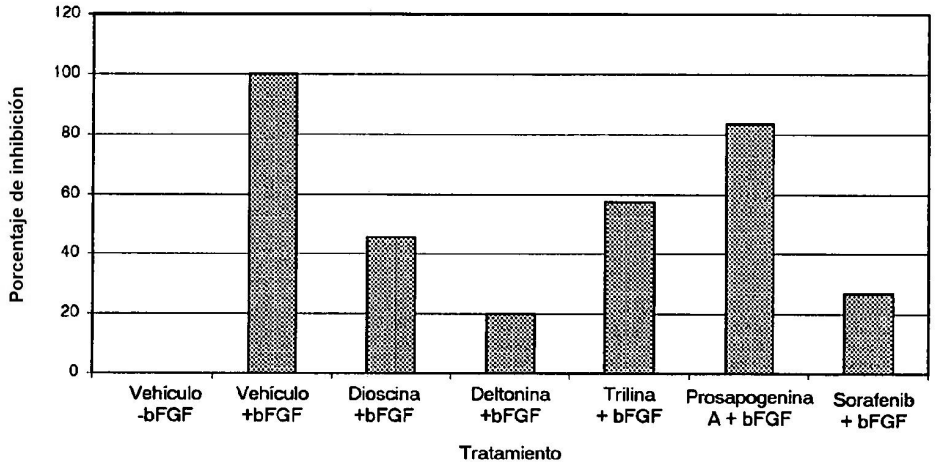

Volumen promedio de sangre (ul)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Vehículo -bFGF
Vehículo +bFGF
Dioscina +bFGF
Deltonina +bFGF
Trilina +bFGF
Prosapogenina A + bFGF
Sorafenib + bFGF
Tratamiento

*Fig. 7*


120
100
80
60
40
20
0
Porcentaje de inhibición
Vehículo -bFGF
Vehículo +bFGF
Dioscina +bFGF
Deltonina +bFGF
Trilina + bFGF
Prosapogenina A + bFGF
Sorafenib + bFGF
Tratamiento