(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 345**

(51) Int. Cl.:

A01N 43/54	(2006.01)
C07D 239/42	(2006.01)
C07D 471/04	(2006.01)
A61K 31/095	(2006.01)
A61K 31/10	(2006.01)
A61K 31/09	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2008** **E 08827229 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015** **EP 2139325**

(54) Título: **Bitionol como agente antiangiogénico**

(30) Prioridad:

13.04.2007 US 911645 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2015

(73) Titular/es:

SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
OFFICE OF COMMERCIALIZATION AND INTELLECTUAL PROPERTY 2000 9TH AVENUE SOUTH P.O. BOX 55305
BIRMINGHAM, ALABAMA 35205, US

(72) Inventor/es:

QU, ZHICAN;
ROY, ANSHU, MITTAL y
ANANTHAN, SUBRAMANIAM

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 534 345 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

Bitionol como agente antiangiogénico.

Campo técnico

La presente divulgación se refiere de manera general al tratamiento o a la prevención de enfermedades asociadas a la angiogénesis mediante la administración en el paciente de determinados compuestos que se ha descubierto que inhiben o reducen sustancialmente la angiogénesis. Los compuestos utilizados según la presente divulgación presentan una buena actividad antiangiogénica, demostrando además un efecto profiláctico en la prevención y la reducción sustancial de la angiogénesis. Los ejemplos de estos compuestos incluyen ritanserina, amiodarona, terfenadina, perfenazina, bitionol y clomipramida.

Antecedentes

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes y es una secuencia de sucesos que resulta de importancia clave en muchos procesos fisiológicos y patológicos. El crecimiento normal de los tejidos, tal como en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual, se caracteriza por la dependencia de la formación de nuevos vasos para el suministro de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de productos de desecho. Un gran número de diferentes enfermedades no relacionadas también están asociadas a la formación de nueva vasculatura. Entre determinadas patologías se encuentran condiciones en las que la angiogénesis es reducida y debe ser incrementada con el fin de mejorar las condiciones de la enfermedad. Entre las patologías que implican una formación inadecuada de vasos sanguíneos se incluyen la isquemia e infarto periféricos y coronarios, el fallo crónico de la cicatrización de heridas y las úlceras. Sin embargo, más frecuentemente la angiogénesis excesiva es una característica importante de diversas patologías, incluyendo las patologías caracterizadas o asociadas a una proliferación anormal o incontrolada de las células. Entre las patologías que implican una angiogénesis excesiva se incluyen, por ejemplo, el cáncer (tumores tanto sólidos como hematológicos), las enfermedades cardiovasculares (tales como la ateroesclerosis y la restenosis), la inflamación crónica (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn), la diabetes (retinopatía diabética), la soriasis, la endometriosis, el glaucoma neovascular y la adiposidad. Ver Griffioen y Molema, Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation, Pharmacol. Rev. 52:237-268, 2000.

En términos generales, el proceso de angiogénesis comporta la proliferación y migración de un endotelio normalmente inactivo, la proteólisis controlada de la matriz pericelular y la síntesis de componentes de la nueva matriz extracelular por capilares en desarrollo. El establecimiento de nuevos contactos intracelulares e intercelulares y la diferenciación morfológica de las células endoteliales en redes tubulares de tipo capilar proporciona el soporte a su posterior maduración, ramificación, remodelado y regresión selectiva, formando una red microvascular funcional altamente organizada. Las interacciones autocrina, paracrina y anficrina del endotelio vascular con sus componentes estromales circundantes, así como con las citocinas proangiogénicas y angiostáticas y factores de crecimiento que controlan la angiogénesis fisiológica, normalmente se encuentran estrechamente reguladas tanto espacial como temporalmente. Ver Gasparini, The Rationale and Future Potential of Angiogenesis Inhibitors in Neoplasia, Drugs 58(1):17-38, 1999.

Los agentes antiangiogénsis mejor conocidos con diana en la proliferación de las células endoteliales son los inhibidoresa del factor de crecimiento endotelial vascular ("FCEV"). El FCEV, un potente factor de crecimiento angiogénico, se sobreexpresa en la mayoría de tumores sólidos humanos y en los trastornos oftalmológicos asociados a la retina. Los receptores del FCEV se encuentran enriquecidos principalmente en células endoteliales que transducen la señalización del FCEV en muchas condiciones patológicas de la angiogénesis. Las células endoteliales estimuladas por el crecimiento también son sensibles a inhibidores de tirosina cinasa con diana en receptores de FCEV, tales como los recientes fármacos anticáncer aprobados por la FDA Sunitinib (SU11248) y Srafenib (BAY 43-9006). Los agentes anti- FCEV y receptores de FCEV pueden detener la proliferación de la células endoteliales y bloquear el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Además del FCEV, muchos otros factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento fibroblástico (FCF) y los factores de crecimiento derivados de plaquetas (FCDP) también desempeñan funciones importantes en la activación endotelial. Recientemente están surgiendo resistencias a los agentes antiangiogénicos con diana únicamente en la señalización del FCEV, presumiblemente debido a la existencia de otras rutas de señalización alternativas mediadas por otros factores de crecimiento.

La angiogénesis resulta crucial para el crecimiento de los tejidos neoplásicos. Desde hace más de 100 años se ha observado que los tumores son más vasculares que los tejidos normales. Algunos estudios experimentales han sugerido que tanto el crecimiento del tumor primario como la metástasis requieren la neovascularización. En contraste con el bien organizado proceso descrito anteriormente para el crecimiento normal de los tejidos, la angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento tumoral activo generalmente es sostenida y persistente, siendo la adquisición inicial del fenotipo angiogénico un mecanismo común en el desarrollo de una diversidad de tipos de tumor sólido y hematopoyético. Ver Folkman J., Cancer Medicine 132-152 (5ª ed., B.C. Decker Inc., 2000).

Los tumores que no pueden reclutar y sostener una red vascular típicamente permanecen latentes en forma de lesiones asintomáticas *in situ*. La metástasis también es dependiente de la angiogénesis: para que una célula tumoral metastatice con éxito, generalmente debe acceder a la vasculatura en el tumor primario, sobrevivir a la circulación, detenerse en la microvasculatura del órgano diana, salir de esta vasculatura, crecer en el órgano diana e inducir angiogénesis en el sitio diana. De esta manera, la angiogénesis aparentemente resulta necesaria tanto al inicio como al final de la cascada metastásica.

El carácter crítico de la angiogénesis para el crecimiento y la metástasis de los neoplasmas proporciona, de esta manera, una diana potencial óptima para los esfuerzos quimioterapéuticos. Los agentes antiangiogénicos adecuados pueden actuar directa o indirectamente influyendo sobre la angiogénesis asociada a tumor mediante el retraso de la aparición (es decir, bloqueando un "interruptor angiogénico") o mediante el bloqueo de la neovascularización sostenida y focal que es característica de muchos tipos de tumor. Las terapias antiangiogénesis dirigidas contra el endotelio asociado a tumor y los múltiples procesos y dianas moleculares y celulares implicadas en la angiogénesis patológica sostenida se están evaluando activamente para su seguridad y eficacia en múltiples ensayos clínicos. Ver Deplanque y Harris, Anti-angiogenic Agents: Clinical Trial Design and Therapies in Develoment, Eur. J. Cancer 36:1713-1724, 2000. Sin embargo, hasta hoy se ha experimentado escaso éxito en el descubrimiento y/o identificación de agentes antiangiogénicos seguros y/o eficaces.

El documento WO 00/45165 describe la utilización de bitionolato sódico en el tratamiento de trastornos neoplásicos. El bitionalato sódico es un compuesto de entre un enorme listado de otros compuestos no relacionados que se han analizado en ensayo celular *in vitro*. El ensayo mide el efecto de estos compuestos sobre la viabilidad de las células de leucemia (HL-60) y sólo muestra si el compuesto muestra actividad citotóxica y no si los compuestos de hecho presentan alguna selectividad para las células de cáncer, incluyendo las células de leucemia contra las que se ha analizado.

El documento US 2005/0250709 da a conocer que la niclosamida y los compuestos de la clase de la niclosamida pueden utilizarse para tratar el cáncer. El bitionol no es un compuesto de la clase de la niclosamida ya que no presenta un grupo amida. El bitionol se describe como un antiinfeccioso.

El documento WO 207/005670 da a conocer compuestos hidrocarburo que contienen azufre y selenio para la utilización en la modulación de la angiogénesis. No describe ni sugiere la utilización de bitionol en la inhibición del crecimiento de un tumor.

Xu *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 13:657-659, 2005, describen éteres difenílicos polibromados como inhibidores de la quinasa Tie2 y explican que los inhibidores de la cinasa Tie2 evitan la angiogénesis. No describe ni sugiere la utilización del bitionol en la inhibición del crecimiento de un tumor.

Sumario

La presente invención se refiere al tratamiento o a la prevención de tumores asociados a la angiogénesis, y más particularmente a la utilización de bitionol en la preparación de un medicamento destinado a la inhibición del crecimiento o metástasis de un tumor en un paciente necesitado del mismo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayos de proliferación celular utilizando ritanserina.

La figura 2 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando ritanserina y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 3 representa los resultados de un ensayo de formación de tubo endotelial utilizando ritanserina y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulos respecto a un control.

La figura 4 representa los resultados de un ensayo *ex vivo* de angiogénesis de MCA utilizando ritanserina y el gráfico representa el índice de densidad vascular.

La figura 5 representa los resultados de densidad de microvasos de un ensayo *in vivo* en ratón de matriz tridimensional de Matrigel utilizando ritanserina.

La figura 6 representa los resultados de un ensayo de modelo de xenoinjerto de ratón utilizando ritanserina y el gráfico representa el cambio de volumen tumoral durante el tiempo.

La figura 7 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayos de proliferación celular en los que se utiliza hidrocloruro de amiodarona.

La figura 8 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando hidrocloruro de amiodarona y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 9 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando hidrocloruro de amiodarona y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulos respecto a un control.

La figura 10 representa los resultados de un ensayo *ex vivo* de angiogénesis en MCA utilizando amiodarona y el gráfico representa el índice de densidad vascular.

La figura 11 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayos de proliferación celular utilizando terfenadina.

La figura 12 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando terfenadina y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 13 representa los resultados de un ensayo de formación de tubo endotelial utilizando terfenadina y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulo respecto a un control.

La figura 14 representa los resultados de un ensayo *ex vivo* de angiogénesis en MCA utilizando terfenadina y el gráfico representa el índice de densidad vascular.

La figura 15 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayos de proliferación celular utilizando perfenazina.

La figura 16 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando perfenazina y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 17 representa los resultados de un ensayo de formación de tubo endotelial utilizando perfenazina y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulos respecto a un control.

La figura 18 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayo de proliferación celular utilizando bitionol.

La figura 19 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando bitionol y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 20 representa los resultados de un ensayo de formación de tubo endotelial utilizando bitionol y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulos respecto a un control.

La figura 21 representa los resultados de un ensayo *ex vivo* de angiogénesis de MCA utilizando bitionol y el gráfico representa el índice de densidad vascular.

La figura 22 representa la curva de dosis-respuesta dibujada frente a la concentración para ensayos de proliferación celular utilizando clomipramina.

La figura 23 representa los resultados de un ensayo de migración de células endoteliales utilizando clomipramina y el gráfico representa el porcentaje de células que han migrado respecto a un control.

La figura 24 representa los resultados de un ensayo de formación de tubo endotelial utilizando clomipramina y el gráfico representa el porcentaje de formación de túbulos respecto a un control.

La figura 25 representa los resultados de un ensayo *ex vivo* de angiogénesis en MCA utilizando clomipramina y el gráfico representa el índice de densidad vascular.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere de manera general al tratamiento o a la prevención de enfermedades asociadas a la angiogénesis en un paciente que lo requiere, mediante la administración en el paciente de determinados compuestos que se ha encontrado que inhiben o reducen sustancialmente la angiogénesis. Sin embargo, los objetos que no se encuentran comprendidos en el alcance según las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Tal como se ha utilizado anteriormente y a lo largo de la divulgación, los términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, debe apreciarse que presentan los significados siguientes.

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático que puede ser lineal, ramificado o cíclico y presenta entre 1 y aproximadamente 10 átomos de carbonos en la cadena, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los intervalos en dicho intervalo. El término "ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, se encuentra unido a un cadena de alquilo lineal. En determinadas formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C_1-C_4, es decir, un grupo alquilo ramificado o lineal que presenta entre 1 y aproximadamente 4 carbonos. En otras formas de realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo C_1-C_3, es decir, un grupo alquilo ramificado o lineal que presenta entre 1 y aproximadamente 3 carbonos. Entre los grupos alquilo ejemplificativos se incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo.

El término "arilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático que contiene entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 carbonos, y todas las combinaciones y subcombinaciones de los intervalos dentro de dicho intervalo. El grupo arilo puede sustituirse opcionalmente con uno o dos o más sustituyentes. Entre los grupos arilo ejemplificativos se incluyen grupo monocíclicos, tales como fenilo, y grupos bicíclicos, tales como naftilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático que contiene entre aproximadamente 4 y aproximadmaente 10 elementos, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de dicho intervalo, en el que uno o más de los elementos es un elemento diferente del carbono, por ejemplo nitrógeno, oxígeno o azufre. Entre los grupos heteroarilo ejemplificativos se incluyen grupos monocíclicos, tales como piridilo, y grupos bicíclicos, tales como indolilo.

El término "arilalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un grupo arilo. Un "grupo arilalquilo C_1-C_4", por ejemplo, presenta un grupo alquilo C_1-C_4 sustituido con un grupo arilo.

El término "heteroarilalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un grupo heteroarilo. Un "grupo heteroarilalquilo C_1-C_4", por ejemplo, presenta un grupo alquilo C_1-C_4 sustituido con un grupo heteroarilo.

El término "cicloalquilo" utilizado solo o como parte de una fracción de mayor tamaño incluirá hidrocarburos C_3-C_{10} cíclicos que están completamente saturados o que contienen una o más unidades de insaturación, pero que no son aromáticos. Los grupos cicloalifáticos típicamente son C_3-C_{10}, más típicamente C_3-C_7.

La expresión "heterociclo no aromático", utilizado solo o como parte de una fracción de mayor tamaño, tal como en "heterocicloalquilo", se refiere a sistemas de anillos no aromáticos que típicamente presentan cinco a catorce elementos, preferentemente cinco a diez, en los que uno o más carbonos anulares, preferentemente uno a cuatro, son sustituidos, cada uno de ellos, por un heteroátomo, tal como N, O o S.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto tal como se indica en la presente memoria que puede resultar terapéuticamente eficaz para tratar una enfermedad o trastorno asociado a angiogénesis. La cantidad exacta de estos compuestos que se requiere variará con los compuestos particulares o utilizados, la edad y la condición del sujeto que debe tratarse, y la naturaleza y gravedad de la condición. Sin embargo, la cantidad eficaz puede ser determinada por un experto ordinario en la materia mediante sólo experimentación rutinaria.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de administración que resultan, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas en la medida de una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos dados a conocer en los que el compuesto parental es modificado mediante la preparación de sales de ácido o base del mismo. Los compuestos de la presente exposición forman bases de adición de ácido y base con una amplia diversidad de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos e incluye las sales fisiológicamente aceptables que con frecuencia se utilizan en la química farmacéutica. Dichas sales también son parte de la presente exposición. Entre los ácidos inorgánicos típicos utilizados para formar dichas sales se incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, hipofosfórico y similares. También pueden utilizarse sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcónicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoico e hidroxialcanodioico, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. De esta manera, entre dichas sales farmacéuticamente aceptables se incluyen acetato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, benzoato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalén-2-benzoato, bromuro, isobutirato, fenilbutirato, β-hidroxibutirato, butín-1,4-dioato, hexín-1,4-dioato, caprato, caprilato, cloruro, cinamato, citrato, formato, fumarato, glicolato, heptanoato, hipurato, lactato, malato, maleato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, isonicotinato, nitrato, oxalato, ftalato, teraftalato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, propiolato, propionato, fenilpropionato, salicilato, sebacato, succinato, suberato, sulfato, bisulfato, pirosulfato, sulfito, bisulfito, sulfonato, benceno-sulfonato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, metanosulfonato, naftalén-1-sulfonato, naftalén-2-sulfonato, p-toluenosulfonato, xilenosulfonato, tartrato y similares.

Entre las bases comúnmente utilizadas para la formación de sales se incluyen hidróxido amónico e hidróxidos de metal alcalino y alcalino-térreo, carbonatos, así como aminas alifáticas primarias, secundarias y terciarias, y diaminas alifáticas. Entre las bases especialmente útiles en la preparación de sales de adición se incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico, metilamina, dietilamina y etilendiamina.

El término "paciente" se refiere a animales, incluyendo mamífero, preferentemente seres humanos.

El término "metabolito" se refiere a cualquier sustancia resultante de cambios químicos implicados en los procesos de crecimiento y reparación en un organismo vivo, incluyendo los procesos anabólicos y catabólicos.

Un "profármaco" es un compuesto que es convertido dentro del cuerpo en su forma activa, que presenta un efecto médico. Los profármacos pueden resultar útiles ene l caso de que el fármaco activo resulte excesivamente tóxico para su administración sistémica, el fármaco sea pobremente absorbido en el tracto digestivo, o el cuerpo degrade el fármaco activo antes de que alcance su diana. Los métodos de preparación de profármacos se dan a conocer en Hans Bundgaard, Design of Prodrugs (Elsevier Science Publishers B.V., 1985).

El término "solvatos" se refiere al compuesto formado por la interacción de un solvente y un soluto e incluye los hidratos. Los solventes habitualmente son aductos sólidos cristalinos que contienen moléculas de solvente dentro de la estructura cristalina, en proporciones estequiométricos o no estequiométricos.

La expresión "que comprende" (y sus variaciones gramaticales) tal como se utiliza en la presente memoria se utiliza en el sentido inclusivo de "que presenta" o "que incluye" y no en el sentido excluyente de "que consiste únicamente en". La expresión "que consiste esencialmente en" tal como se utiliza en la presente memoria pretende referirse a que incluye a lo que se indica explícitamente conjuntamente con lo que no afecta materialmente a las características básicas y nuevas de lo indicado o especificado.

Los términos "un", "una y "el o "la" tal como se utilizan en la presente memoria se entiende que comprenden el plural, así como el singular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Determinados compuestos ácidos o básicos de la presente exposición pueden encontrarse presentes en forma de zwiteriones. Todas las formas del compuesto, incluyendo el ácido libre, la base libre y los zwiteriones, se encuentra contemplado que se encuentren dentro del alcance de la presente exposición.

Los métodos de síntesis de compuestos, incluyendo el bitionol, son bien conocidos de la técnica y se dan a conocer en la patente US nº 3.506.720 de Basel *et al.* y en la patente US nº 2.849.494 de Cooper *et al.*

En determinadas formas de realización, la presente exposición se refiere a métodos para inhibir la angiogénesis y/o para inhibir el crecimiento o la metástasis de un tumor. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inhibe" se refiere a que el nivel de crecimiento o metástasis tumoral y/o la incidencia de angiogénesis en los pacientes que han recibido un compuesto, tal como se describe en la presente memoria, puede encontrarse deseablemente reducida en comparación con pacientes que no han recibido dicho compuesto. De esta manera, en una forma, los métodos de inhibición de la presente exposición comprenden administrar en un paciente una cantidad eficaz de un agente antiangiogénico. La expresión "agente antiangiogénico", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a compuestos que pueden inhibir la angiogénesis.

En otras formas de realización, la exposición se refiere a métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado a angiogénesis. Entre estos métodos puede incluirse la etapa de identificar un paciente que presenta dicha enfermedad, incluyendo pacientes que se beneficiarían de los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria. Entre las enfermedades o trastornos asociados a la angiogénesis se incluyen, por ejemplo, condiciones en las que la angiogénesis desempeña un papel en la patología o la progresión de la afección, de manera que la inhibición de la angiogénesis en un paciente que presenta dicha afección podría retrasar o bloquear la progresión adicional de la afección, o conducir a la remisión o regresión del estado de enfermedad. Dichas afecciones se caracterizan o se asocian frecuentemente a una proliferación celular anormal y entre ellas se incluyen, por ejemplo, las enfermedades neoplásicas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "tratar una enfermedad o trastorno" se refiere a la administración de agentes destinados a limitar el grado, progresión y/o gravedad de una afección en un paciente, en comparación con pacientes que no han sido tratados de esta manera. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "enfermedad neoplásica" se refiere a cualquier afección caracterizada por la presencia de un crecimiento aberrante de células o tejidos anormales, incluyendo, aunque sin limitación, todos los cánceres y tumores, sean benignos o malignos. La expresión "tratar una enfermedad neoplásica" se refiere a la administración de un agente quimioterapéutico que inhibirá el crecimiento adicional o metástasis de cualquier tejido neoplásico que pueda existir en un paciente y/o que estimulará la regresión de dichos neoplasmas, incluyendo la reducción del tamaño y/o número de dichos neoplasmas y/o la inducción de la muerte de las células neoplásicas.

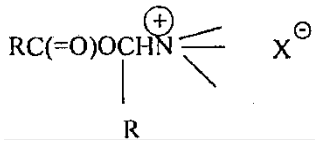
Las formas de profármaco de los compuestos que presentan diversas funciones de nitrógeno (amino, hidroxiamino, amida, etc.) pueden incluir los tipos de derivados siguientes, en los que cada grupo R individualmente puede ser

hidrógeno, o un grupo alquilo sustituido o no sustituido, arilo, alquenilo, alquinilo, heterociclo, alquilarilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo o cicloalquenilo, tal como se ha definido anteriormente.

(a) Carboxamidas, -NHC(O)R,
(b) carbamatos, -NHC(O)OR,
(c) (aciloxi)alquil-carbamatos, NHC(O)OROC(O)R,
(d) enaminas, -NHCR(=CHCO$_2$R) o -NHCR(=CHCONR$_2$),
(e) bases de Schiff, -N=CR$_2$,
(f) bases de Mannich (a partir de compuestos carboximida), RCONHCH$_2$NR$_2$.

La preparación de dichos derivados de profármaco se comenta en diversas fuentes de la literatura (son ejemplos: Alexander *et al.*, J. Med. Chem. 31:318, 1988; Aligas-Martin *et al.*, documento nº PCT WO pp/41531, p 30). La función nitrógeno convertida durante la preparación de dichos derivados es una (o más) de los átomos de nitrógeno de un compuesto de la invención.

Entre las formas de profármaco de compuestos que portan carboxilos de la invención se incluyen ésteres (-CO$_2$R) en los que el grupo R corresponde a cualquier alcohol cuya liberación en el cuerpo mediante procesos enzimáticas o hidrolíticos se encuentre a niveles farmacéuticamente aceptables. Otro profármaco derivado de una forma ácido carboxílico de la invención puede ser una estructura de tipo sal cuaternaria:



descrita por Bodor *et al.*, J. Med. Chem. 23:469, 1980.

Evidentemente se entiende que los compuestos de la presente invención se refieren a todos los isómeros y estereoisómeros ópticos en los diversos posibles átomos de la molécula.

Entre las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se incluyen los derivados de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Entre los ejemplos de ácidos adecuados se incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalén-2-sulfónico, trifluoroacético y bencenosulfónico. Entre las sales derivadas de bases apropiadas se incluyen metales alcalinos tales como sodio y amonio.

Los compuestos de la presente invención pueden ser sintetizados por el experto en la materia a partir de la presente exposición sin necesidad de experimentación indebida. Se encuentran disponibles procedimientos en la literatura química adecuados para preparar los azúcares o nucleósidos necesarios. En esta línea, ver Choi Jong-Ryoo, Kim Jeong-Min, Roh Kee-Yoon, Cho Dong-Gyu, Kim Jae-Hong, Hwang Jae-Taeg, Cho Woo-Young, Jan Hyun-Sook, Lee Chang-Ho, Choi Tae-Saeng, Kim Chung-Mi, Kim Yong-Zu, Kim Tae-Kyun, Cho Seung-Joo, Kim Gyoung-Won, solicitud de patente int. PCT, 100 páginas, 2002, nº WO 0257288 A1 20020725. Holy Antonin, Votruba Ivan, Tloustova Eva, Masojidkova Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 66(10):1545-1592, 2001. Rejman Dominik, Masojidkova Milena, De Clercq Eric, Rosenberg Ivan, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 20(8):1497-1522, 2001; Ubasawa Masaru, Skiya Kouichi, solicitud de patente int. PCT, 39 páginas, 2001, nº WO 0164693 A1 20020907. Otmar Miroslav, Masojfdkova Milena, Votruba Ivan, Holy Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 66(3):500-506, 2001. Michal, Hocek Michal, Holy Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 65(8):1357-1373, 2000. Jeffery A.L., Kim J.-H., Wiemer D.F., Tetrahedron 56(29):5077-5083, 2000. Holy Antonin, Guenter Jaroslav, Dvorakova Hana, Masojidkova Milena, Andrei Graciela, Snoeck Robert, Balzarini Jan, De Clercq Erik, Journal of Medicinal Chemistry 42(12):2064-2086, 1999. Janeba Zlatko, Holy Antonin, Masojidkova Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 66(9):1393-1406, 2001. Holy Antonin, Guenter Jaroslav, Dvorakova Hana, Masojidkova Milena, Andrei Graciela, Snoeck Robert, Balzarini Jan, De Clercq Erik. Journal of Medicinal Chemistry 42(12):2064-2086, 1999. Dan Qun, Erion Mark D., Reddy M. Rami, Robinsion Edward D., Kasibhatla Srinivas Rao, Reddy K. Raja. solicitud de patente int. PCT, 126 páginas, 1998, nº WO 9839344 A1 19980911. Arimilli Murty N., Cundy Kenneth C., Dougherty Joseph P., Kim Choung U., Oliyai Reza, Stella Valentino J., solicitud de patente int. PCT, 74 páginas, 1998, nº WO 9804569. Sekiya Kouichi, Takashima Hideaki, Ueda Naoko, Kamiya Naohiro, Yuasa Satoshi, Fujimura Yoshiyuki, Ubasawa Masaru, Journal of Medicinal Chemistry 45(14):3138-3142, 2002. Ubasawa Masaru, Sekiya Kouichi, Takashima Hideaki, Ueda Naoko, Yuasa Satoshi, Kamiya Naohiro, Eur. Pat. Appl., 56 páginas, 1997, nº EP 785208 A1 19970723. Hocek Michal, Masojidkova Milena, Holy Antonin, Collection of Czechoslovak Chemical Communications 62(1):136-146, 1997. Holy Antonin, Votruba Ivan, Tloustova Eva, Masojidkova Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 66(10):1545-1592, 2001. Holy Antonin, De Clercq, Erik Desire Alice, solicitud de patente int. PCT, 57 páginas, 1996, nº WO 9633200 A1 19961024. Rejman Dominik, Rosenberg Ivan. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 61(número especial):S122-S123, 1996. Holy Antonin, Dvorakova Hana, Jindrich Jindrich,

Masojidkova Milena, Budesinsky Milos, Balzarini Jan, Andrei Graciella, De Clercq Erik, Journal of Medicinal Chemistry 39(20):4073-4088, 1996. Guanti Giuseppe, Merlo Valeria, Narisano Enrica, Tetrahedron 51(35):9737-46, 1995. Takashima Hideaki, Inoue Naoko, Ubasawa Masaru, Sekiya Kouichi, Yabuuchi Shingo, solicitud de patente EU, 88 páginas, 1995, nº EP 632048 A1 19950104. Alexander Petr, Holy Antonin, Masojidkova Milena, Collection of Czechoslovak Chemical Communications 59(8):1853-69, 1994. Alexander Petr, Holy Antonin, Masojidkova Milena, Collection of Czechoslovak Chemical Communications 59(8):1853-69, 1994. Jindrich Jindrich, Holy Antonin, Dvorakova Hana. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 58(7):1645-67, 1993. Holy Antonin, Collection of Czechoslovak Chemical Communications 58(3):649-74, 1993. Guanti Giuseppe, Merlo Valeria, Narisano Enrica, Tetrahedron 51(35):9737-46, 1995. Emishetti Purushotham, Brodfuehrer Paul R., Howell Henry G., Sapino Chester Jr., solicitud de patente int. PCT, 43 páginas, 1992, nº WO 9202511 A1 19920220. Glazier Arnold. Solicitud de patente int. PCT, 131 páginas, 1991, nº WO 9119721. Kim Choung Un, Lu Bing Yu, Misco Peter F., Bronson Joanne J., Hitchcock Michael J.M., Ghazzouli Ismail, Martin John C., Journal of Medicinal Chemistry 33(4):1207-13, 1990. Rosenberg Ivan, Holy Antonin, Masojidkova Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 53(11B):2753-77, 1988. Rosenberg Ivan, Holy Antonin, Masojidkova Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 53(11B):2753-77, 1988.

Los ejemplos siguientes ilustran y describen aspectos de la presente exposición.

Ejemplo 1

Ensayo de proliferación celular

Se cultivaron líneas celulares primarias humanas, de endotelio arterial, tales como CEAH, CEAPH, CEVCU de endotelio venoso (de Cambrex BioScience Rockland Inc.) y fibroblastos pulmonares LL47 (de la American Type Culture Collection) siguiendo las instrucciones y se utilizaron para evaluar los compuestos diana para su actividad diferencial contra endotelios humanos versus fibroblastos mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo. Este ensayo, que genera señales luminiscentes, se basa en la cuantificación de los niveles de ATP en los cultivos celulares. La cantidad de ATP producida en el cultivo celular refleja el número de células viables. Por lo tanto, este ensayo se utiliza con frecuencia para estimar la proliferación celular y los efectos citotóxicos de los compuestos de ensayo. Se sembraron células en placas de 96 pocillos con su medio de crecimiento, aproximadamente $5x10^3$ células por pocillo. Tras 24 horas, se añadieron a los cultivos diversas dosis de los compuestos de ensayo, preparando cuatro réplicas por cada dosis. Tras 72 horas de tratamiento, se añadió el reactivo de CellTiter-Glo a los cultivos siguiendo las instrucciones del fabricante y se midió la luminiscencia. Los grupos de control recibieron únicamente vehículo DMSO. Se determinaron las IC_{50} de los compuestos diana para la proliferación de endotelios y fibroblastos en su medio de crecimiento basándose en la curva de dosis-respuesta y se representaron frente al intervalo de concentraciones.

Ejemplo 2

Ensayo de migración de células endoteliales

La migración de las células endoteliales es una etapa clave en el proceso de la angiogénesis, lo que resulta crucial para el reclutamiento *in situ* de formación de vasos sanguíneos. Se utilizó la cámara de filtro/inserto Trans-well del Biocoat Endothelial Cell Migration Angiogenesis System (BD Biosciences) para el ensayo de migración de células endoteliales, que es una placa con 24 cámara Trans-well que contienen insertos de 3 µm de tamaño de poro recubiertos con fibronectina humana. Los insertos se incubaron a 37ºC con albúmina de suero bovino al 0,1% que contenía medio basal de células endoteliales durante 1 hora. Las células endoteliales (CEVCU) se sometieron a ayuno con albúmina de suero bovino al 0,1% en medio basal de células endoteliales durante 4 a 5 horas antes de la recolección celular y después se sembraron ($1x10^5$ por pocillo) en cámaras superiores de la placa Trans-well con diversos tratamientos en 100 µl de albúmina de suero bovino al 0,1% en medio basal de células endoteliales. Se añadió medio de crecimiento completo que contenía diversos quimioatrayentes en las cámaras inferiores. Se dejó que las células migrasen durante 22±1 horas a 37ºC. Las células que no habían migrado en el interior de los insertos se retiraron cuidadosamente con un hisopo Q-tip. Las células que habían migrado en la parte inferior de los insertos Trans-well seguidamente se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con Hoechst 33342 y se fotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia. Se analizaron tres campos de visión de microscopía de cada filtro/inserto para el número de células migradas. Se llevaron a cabo cultivos de filtro/cámara de inserto por triplicado para cada concentración de ensayo y el control. Los datos se expresan como número medio de células que han migrado por cada campo de visión de microscopía a una magnificación 10x y se calculó la IC_{50} basándose en la curva de dosis.

Ejemplo 3

Ensayo de formación de tubo endotelial

Se cultivaron células endoteliales humanas *in vitro* sobre matriz extracelular, que estimula la adhesión y diferenciación de las células endoteliales en túbulos. El ensayo de formación de tubos endoteliales se basa en este fenómeno. Se sembraron células endoteliales (CEVCU) ($1,5x10^4$ en cada pocillo) en una placa de 96 pocillos

recubierta con matriz extracelular y se trataron con los compuestos diana a diferentes concentraciones con el medio de crecimiento completo por triplicado. Se dejó que las células formasen tubos endoteliales a 37ºC durante aproximadamente 18 horas y se fotografiaron bajo un microscopio de luz invertida. Se cuantificaron las longitudes de los túbulos utilizando software de análisis de imágenes, Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Siler Spring, MD). Los datos se expresaron como longitudes de tubo medias de tres campos de visión para cada pocillo y pocillos por triplicado para cada condición de tratamiento. Se calcularon los valores de IC_{50} basándose en la curva de dosis.

Ejemplo 4

Ensayo de membrana corioalantoica (MCA) de pollo

La membrana corioalantoica del embrión del pollo proporciona un modelo *in vivo* ideal para el proceso fisiológico de la angiogénesis. Los moduladores angiogénicos aplicados sobre discos de metilcelulosa situados sobre la membrana corioalantoica de embrión de pollo son capaces de alterar el desarrollo de la nueva vasculatura sanguínea. Ver Staton *et al.*, Current Methods for Assaying Angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, Int. J. Exp. Pathol. 85:233-48, 2004. Se utilizó el ensayo de membrana corioalantoica de la angiogénesis para la evaluación *ex vivo* del potencial angiogénico de los compuestos sintéticos. Se incubaron huevos de pollo fertilizados a 37,5ºC en un incubador de huevos humidificado con circulación de aire forzada. El día embrionario 3, se abrieron los huevos y se transfirieron los embriones a placas de Petri de 100 mm^3 para continuar su desarrollo en un incubador de cultivos celulares a 37,5ºC. Se implantaron cuidadosamente discos de metilcelulosa previamente preparados de aproximadamente 2 mm de diámetro sobre la parte superior de la membrana corioalantoica embrionaria el día embrionario 5 y después se aplicó sobre el disco de metilcelulosa compuesto de ensayo en solución o vehículo de control. Se incubaron los embriones durante dos días más en el incubador de cultivos celulares. Se examinaron las membranas corioalantoicas y se analizó cuantitativamente la formación de nuevos vasos sanguíneos el día embrionario 7. Se evaluaron los efectos del tratamiento mediante la determinación del índice de densidad vascular (IDV) de cada MCA con embriones de pollo viables. El IDV representa el número de intersecciones realizadas por los vasos sanguíneos con tres círculos concéntricos equidistantes en el área cubierta por discos de metilcelulosa mediante la utilización del software Image Pro Plus. Los datos se expresan como IDV medio basado en el análisis cuantitativo para cada grupo de tratamiento ($N \geq 5$) con desviación estándar.

Ejemplo 5

Ensayo de matriz tridimensional de Matrigel en ratón

El ensayo de matriz tridimensional de Matrigel es un ensayo *in vivo* de formación de nuevos vasos sanguíneos ampliamente utilizado para la evaluación de las actividades antiangiogénicas de los compuestos sintéticos y las proteínas recombinantes. Se utilizaron ratones C57BL/6 hembra de aproximadamente 8 a 10 semanas y matriz de Matrigel de alta concentración para los experimentos de matriz tridimensional de Matrigel. Se utilizaron cuatro o cinco ratones por cada grupo de tratamiento y dos matrices tridimensionales de Matrigel en cada ratón. Se mezcló el Matrigel con 50 ng/ml de FCEV, 50 ng/ml de FCDP b y 3 ng/ml de heparina como estímulos angiogénicos. Los compuestos diana a diferentes dosis se mezclaron con Matrigel o se administraron i.p. o i.v. o por vía oral. Se inyectó por vía subcutánea Matrigel a 4ºC, 500 µl de Matrigel para cada matriz, en cada flanco de ratón, en donde se había afeitado el pelaje. El Matrigel inyectado forma rápidamente una única matriz de gel sólida. Las matrices de cada grupo se recogieron aproximadamente dos semanas después de la inoculación de Matrigel. Los ratones se eutanizaron mediante inhalación de CO_2 y se retiró la piel del ratón para exponer la matriz. Las matrices intactas se retiraron y se fijaron en formalina al 10% para el análisis histológico. Se inmunotiñeron secciones (de 5 µm de grosor) de matrices incluidas en parafina, con anticuerpo específico contra CD31 y se contratiñeron con H&E. Se realizó un recuento de los microvasos positivos para CD31 en un área transversal completa de cada matriz tridimensional de Matrigel. Para cada grupo de ratones, se analizaron cuantitativamente aproximadamente seis matrices de Matrigel con el fin de evaluar cualquier diferencia estadísticamente significativa de densidad de microvasos entre los grupos de control y tratados con compuesto.

Ejemplo 6

Eficacia antitumoral de compuestos evaluada mediante el modelo de xenoinjerto en ratón desnudo

El crecimiento tumoral depende de la angiogénesis. La inhibición de la angiogénesis tumoral se ha convertido en un tratamiento eficaz para el cáncer. Se utilizaron modelos estándares de xenoinjerto en ratón desnudo para evaluar potenciales agentes antiangiogénicos para su actividad antitumoral. Se implantaron células o fragmentos de tumor humano en ratones desnudos de 5 a 7 semanas de edad. Se administraron compuestos diana en cada grupo de ratones por vía i.p., i.v. u oral. Se realizó un seguimiento dos veces a la semana del tamaño tumoral y el peso corporal de los ratones. Los volúmenes tumorales medios en cada punto temporal se expresan con desviación estándar frente al tiempo de crecimiento tumoral, que es en días posteriores a la inoculación de xenoinjerto.

Se utilizaron procedimientos tales como los descritos en los ejemplos anteriores para obtener los datos presentados en las figuras y en la Tabla I, a continuación.

Tabla I								
Compuesto	**IC_{50} (μM) proliferación endotelial arterial**	**IC_{50} (μM) proliferación endotelial venosa**	**IC_{50} (μM) proliferación de fibroblastos**	**Inhibición de la migración endotelial**		**Inhibición de la formación de tubo endotelial**		**Inhibición en ensayo de MCA (10 μg)**
				2 μM	**8 μM**	**2 μM**	**8 μM**	
Ritanserina*	11,0	10,5	>50	55%	65%	11%	33%	21%
Hidrocloruro de amiodarona*	7,5	8,8	20,0	36%	38%	33%	33%	27%
Terfenadina*	3,0	5,5	7,0	34%	100%	20%	43%	28%
Hidrocloruro de clomipramina*	10,8	4,5	28,0	58%	63%	12%	26%	19%
Perfenazina*	4,2	11,1	10,8	43%	46%	7%	22%	-
Bitionol	2,0	6,0	10,5	5%	100%	19%	38%	30%

*Ejemplos de referencia

Formulaciones

Los compuestos de la presente exposición pueden administrarse mediante cualesquiera medios convencionales disponibles para la utilización conjuntamente con farmacéuticos, como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. Pueden administrarse solos, aunque generalmente se administran con un portador farmacéutico seleccionado basándose en la vía de administración seleccionada y la práctica farmacéutica estándar. Los compuestos también pueden administrarse conjuntamente con otros agentes terapéuticos, tales como interferón (IFN), interferón-α-2a, interferón-α-2b, interferón de consenso (IFNC), ribavirina, amantadina, remantadina, interleuquina-12, ácido ursodesoxicólico (ACUC) y glicirrizina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables indicados en la presente memoria, por ejemplo vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, son bien conocidos por el experto en la materia. Típicamente el portador farmacéuticamente aceptable es químicamente inerte para los compuestos activos y no presenta efectos secundarios perjudiciales o toxicidad bajo las condiciones de utilización. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir polímeros y matrices de polímero.

Los compuestos de la presente exposición pueden administrarse mediante cualquier método convencional disponible para la utilización conjuntamente con farmacéuticos, como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos.

La dosis administrada evidentemente variará según factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. Una dosis diaria de principio activo puede esperarse que sea de entre aproximadamente 0,001 y 1000 miligramos (mg) por kilogramo (kg) de peso corporal, siendo una dosis preferida de entre 0,1 y aproximadamente 60 mg/kg.

Las formas de administración (composiciones adecuadas para la administración) contienen entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de principio activo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, el principio activo habitualmente se encontrará presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 y 95% en peso basado en el peso total de la composición.

El principio activo puede administrarse por vía oral en formas de administración sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de administración líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. También puede administrarse por vía parenteral, en formas de administración líquidas estériles. El principio activo también puede administrarse por vía intranasal (gotas nasales) o mediante inhalación de unos polvos aerosolizados de fármaco. Otras formas de administración son potencialmente posibles, tales como la administración por vía transdérmica, mediante un mecanismo de parche o pomada.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir de: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja, (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, en forma de sólidos o gránulos, (c) polvos, (d) suspensiones en un líquido apropiado, y (e) emulsiones adecuadas. Entre las formulaciones líquidas pueden incluirse diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo etanol, alcohol bencílico, propilenglicol, glicerina y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un surfactante, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo duro o blando ordinario que contenga, por ejemplo, surfactantes, lubricantes y rellenos inertes,

tales como lactosa, sacarosa, fosfato cálcico y almidón de maíz. Entre las formas de comprimido pueden incluirse uno o más de los siguientes: lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silico coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponadores, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes y portadores farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el principio activo en un saborizante, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones y geles que contienen, además del ingrediente activo, portadores tales como los conocidos en la técnica.

Los compuestos de la presente exposición, solos o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones de aerosol para la administración mediante inhalación. Estas formulaciones de aerosol pueden introducirse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano y nitrógeno. También pueden formularse como farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o en un atomizador.

Entre las formulaciones adecuadas para la administración parenteral se incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que conviertan la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. El compuesto puede administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, soluciones acuosas de dextrosa y azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol, tal como poli(etilenglicol) 400, cetales de glicerol, tales como 2,2,-dimetil-1,3-dioxolán-4-metanol, éteres, un aceite, un ácido graso, un éster o glicérido de ácido graso, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin adición de un surfactante farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Entre los aceites, que pueden utilizarse en formulaciones parenterales, se incluyen petróleo bruto y aceites animales, vegetales y sintéticos. Entre los ejemplos concretos de aceites se incluyen los de cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y mineral. Entre los ácidos grasos adecuados para la utilización en formulaciones parenterales se incluyen el ácido oleico, el ácido esteárico y el ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácido graso adecuados. Entre los jabones adecuados para la utilización en formulaciones parenterales se incluyen la sales grasas de metal alcalino, de amonio y de trietanolamina, y entre los detergentes adecuados se incluyen: (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquil-amonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, y sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasos, alcanolamidas de ácido graso y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfotéricos tales como, por ejemplo, β-aminopropionatos de alquilo y sales 2-alquilimidazolina de amonio cuaternario, y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales típicamente contienen entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 25% en peso del principio activo en solución. Pueden utilizarse conservantes y tampones adecuados en estas formulaciones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más surfactantes no iónicos que presenten un equilibrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 17. La cantidad de surfactante en dichas formulaciones se encuentra comprendida entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15% en peso. Entre los surfactantes adecuados se incluyen ésteres de ácido graso de sorbitán-polietileno, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de elevado peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables también son bien conocidos por el experto en la materia. La elección de excipiente estará determinada en parte por el compuesto particular, así como por el método particular utilizado para administrar la composición. De acuerdo con lo anterior, existe una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente exposición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables preferentemente no interfieren con la acción de los ingredientes activos y no provocan efectos secundarios adversos. Entre los portadores y excipientes adecuados se incluyen solventes tales como agua, alcohol y propilenglicol, adsorbentes y diluyentes sólidos, agentes activos en superficie, agente de suspensión, ligantes de tableteo, lubricantes, saborizantes y agentes colorantes.

Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados unidosis o multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado seco por congelación (liofilizado) que requiere únicamente la adición de excipiente líquido estéril, por ejemplo agua, para inyecciones inmediatamente antes de la utilización. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Los requisitos para los portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien

conocidos por el experto ordinario en la materia (5, 6). Ver Banker y Chalmers, Pharmaceutics and Pharmacy Practice, 238-250 (J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, editores, 1982) y Toissel, ASHP Handbook on Injectable Drugs, 622-630 (4ª ed., 1986).

Entre las formulaciones adecuadas para la administración tópica se incluyen pastillas que comprenden el principio activo en un saborizante, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto, pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, y colutorios bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado, así como cremas, emulsiones y geles que contienen, además del principio activo, portadores tales como los conocidos en la técnica.

Además, las formulaciones adecuadas para la administración rectal pueden presentarse en forma de supositorios mediante la mezcla con una diversidad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuada para la administración vaginal pueden presentarse en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de aerosol que contengan, además del principio activo, portadores conocidos en la técnica que resultan apropiados.

Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo.

La dosis administrada en un animal, particularmente un ser humano, en el contexto de la presente exposición debería resultar suficiente para afectar a la respuesta terapéutica en un animal en un marco temporal razonable. El experto en la materia apreciará que la dosis dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el estado del animal, el peso corporal del animal, así como la gravedad y estadio de la condición bajo tratamiento.

Una dosis adecuada es una que resultará en una concentración del agente activo en un paciente que es conocido que afecta a la respuesta deseada. La dosis preferida es la cantidad que resulta en la inhibición máxima de la condición bajo tratamiento, sin efectos secundarios incontrolables.

El tamaño de la dosis también se determinará a partir de la vía, temporización y frecuencia de la administración, así como de la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que puedan acompañar a la administración del compuesto, y el efecto fisiológico deseado.

Las formas de administración farmacéutica útiles para la administración de los compuestos según la presente exposición pueden ilustrarse de la manera siguiente:

Cápsulas de cubierta dura

Se preparan un gran número de cápsulas unitarias mediante el rellenado de cápsulas de gelatina dura de dos piezas estándares, cada una con 100 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

Se prepara una mezcla de principio activo en un aceite digerible, tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva, y se inyecta mediante una bomba de desplazamiento positivo en gelatina fundida para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 mg del principio activo. Las cápsulas se lavan y se secan. El principio activo puede disolverse en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol para preparar una mezcla de medicinas miscible en agua.

Comprimidos

Se prepara un gran número de comprimidos mediante procedimientos convencionales de manera que la unidad de administración presente 100 mg de principio activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón y 98,8 mg de lactosa. Pueden aplicarse recubrimientos acuosos y no acuosos apropiados para incrementar la palatabilidad, incrementar la elegancia y la estabilidad o retrasar la absorción.

Cápsulas/comprimidos de liberación inmediata

Son formas de administración oral sólidas preparadas mediante procedimientos convencionales y nuevos. Estas unidades se ingieren oralmente sin agua para la disolución y administración inmediatas de la medicación. El principio activo se mezcla en un líquido que contiene ingredientes tales como azúcar, gelatina, pectina y edulcorantes. Estos líquidos se solidifican en comprimidos o cápsulas sólidas mediante liofilización y técnicas de extracción en fase sólida. Los compuestos del fármaco pueden comprimirse con azúcares viscoelásticos y termoelásticos y polímeros o componentes efervescentes para producir matrices porosas destinadas a la liberación inmediata, sin necesidad de agua.

Además, los compuestos de la presente exposición pueden administrarse en forma de gotas nasales, o dosis medidas y un inhalador nasal o bucal. El fármaco se administra a partir de una solución nasal en forma de una niebla fina o de unos polvos en forma de un aerosol.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una cantidad eficaz de bitionol para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición del crecimiento o de la metástasis de un tumor dependiente de la angiogénesis en un paciente necesitado del mismo.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento está destinado a la inhibición del crecimiento de un tumor.

3. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento está destinado a la inhibición de la metástasis de un tumor.

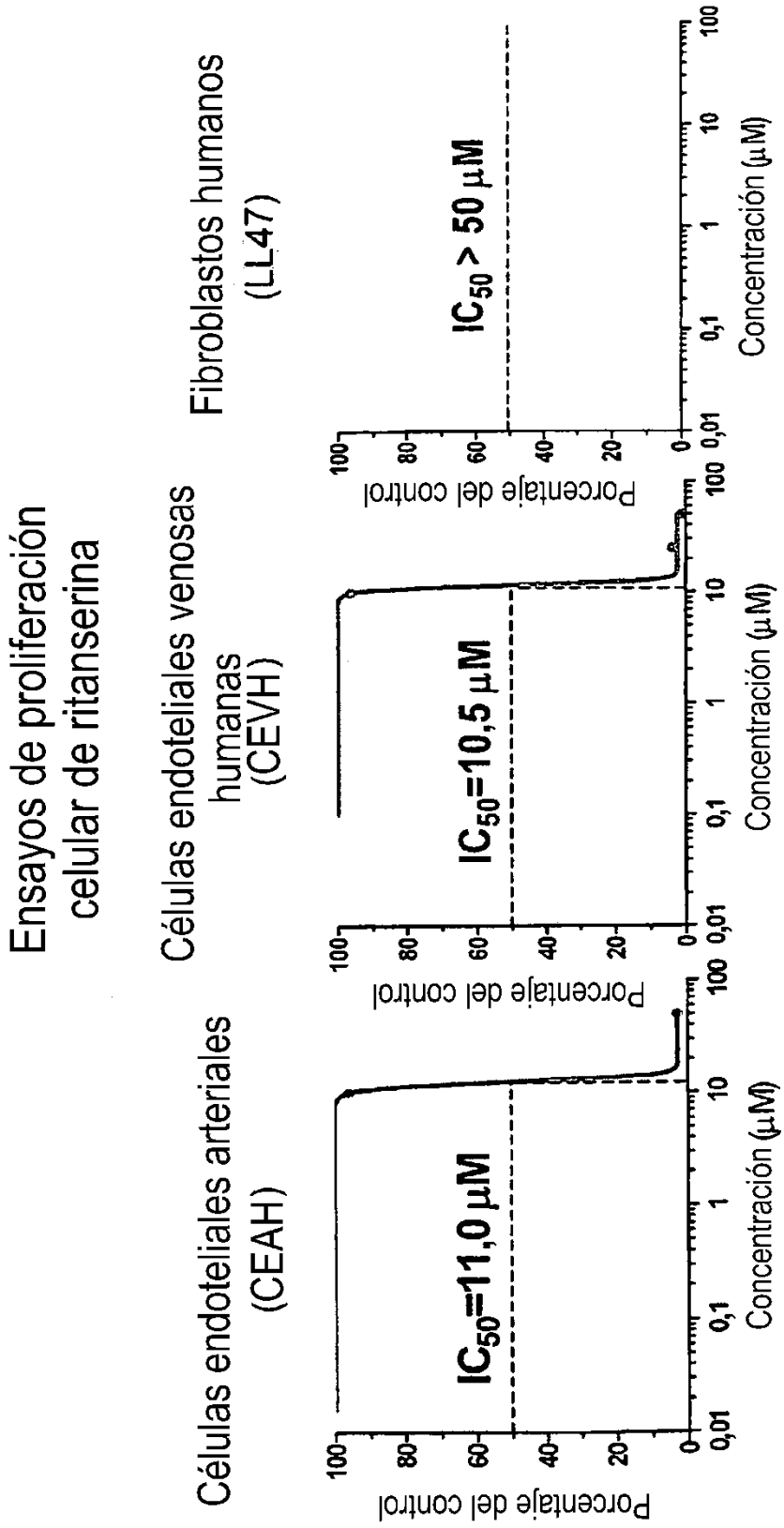

Ensayos de proliferación celular de ritanserina
Células endoteliales arteriales (CEAH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50=11,0 µM
IC50=10,5 µM
IC50 > 50 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 1

Ensayo de migración celular de ritanserina

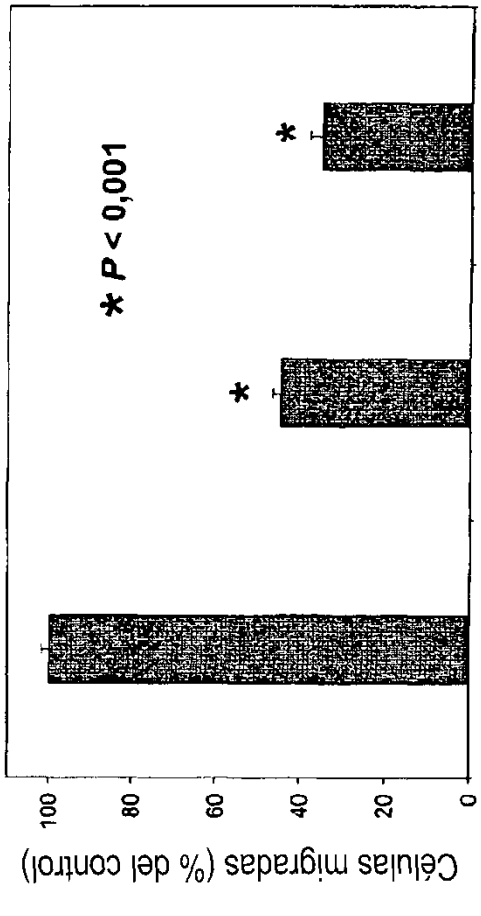


Figura 2

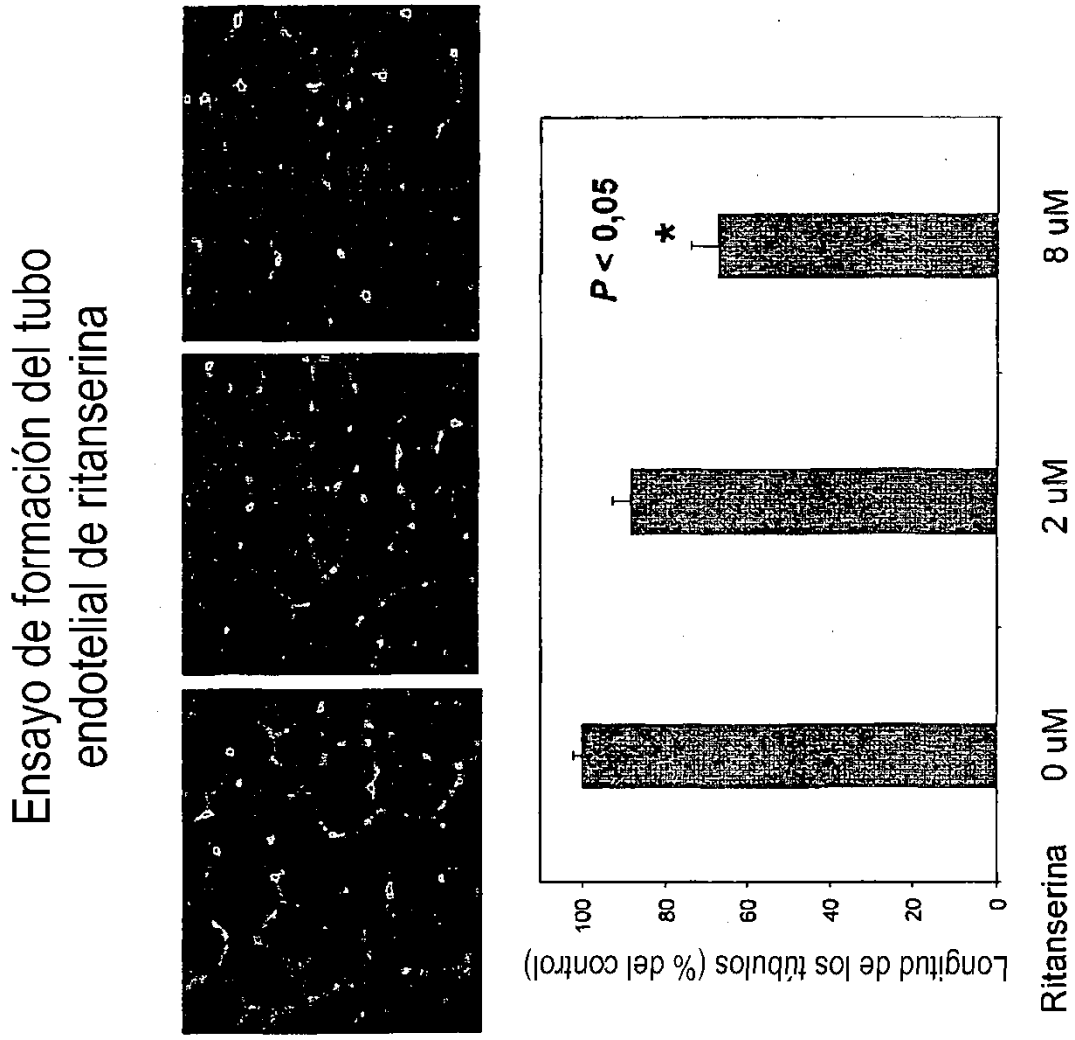

Ensayo de formación del tubo endotelial de ritanserina
Longitud de los tubulos (% del control)
100
80
60
40
20
0
P < 0,05
*
Ritanserina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 3

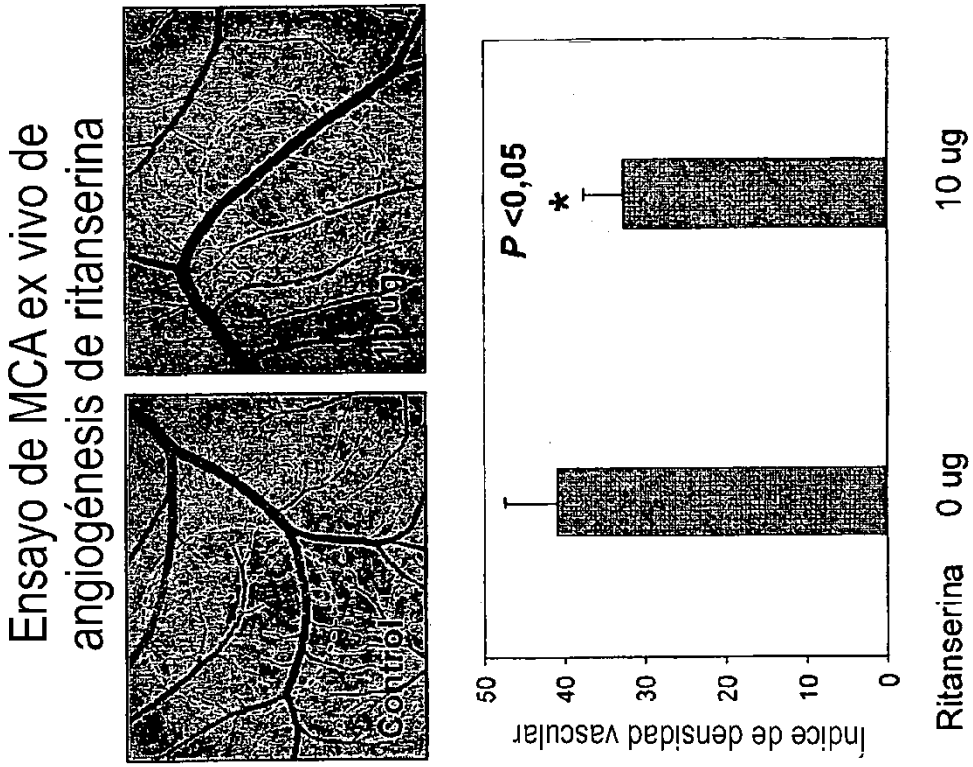

Ensayo de MCA ex vivo de angiogénesis de ritanserina
Control
10 ug
Índice de densidad vascular
50
40
30
20
10
0
P <0,05
*
Ritanserina
0 ug
10 ug

Figura 4

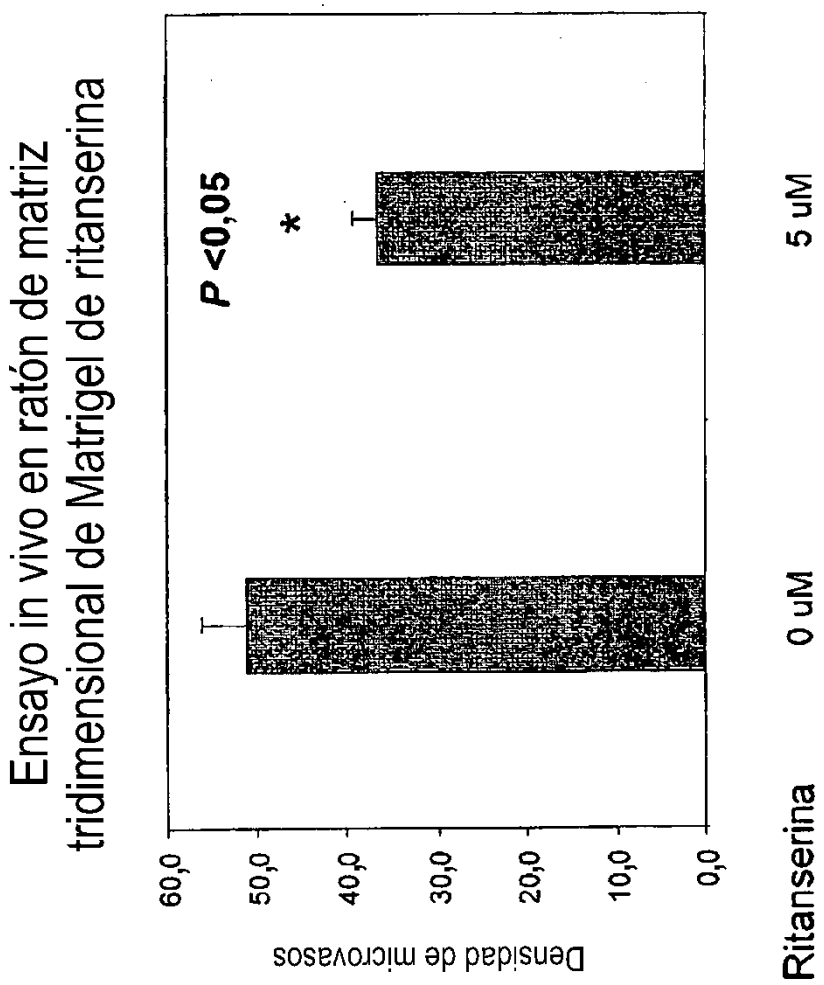

Ensayo in vivo en ratón de matriz tridimensional de Matrigel de ritanserina
Densidad de microvasos
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
P <0,05
*
Ritanserina
0 uM
5 uM

Figura 5

Ritanserina
Modelo de xenoinjerto de ratón

Grupo de animales	Nº de ratones	Línea tumoral	Tratamiento (inicio el día 0)	Dosis (mg/kg) (inyección i.p. diaria)	Inhibición tamaño tumoral
1	10	MX-1	Vehículo	-	-
2	6	MX-1	Ritanserina	1,2 – 2,4 – 4,8	40%
3	10	SKOV-3	Vehículo	-	
4	6	SKOV-3	Ritanserina	1,2 – 2,4 – 4,8	41%

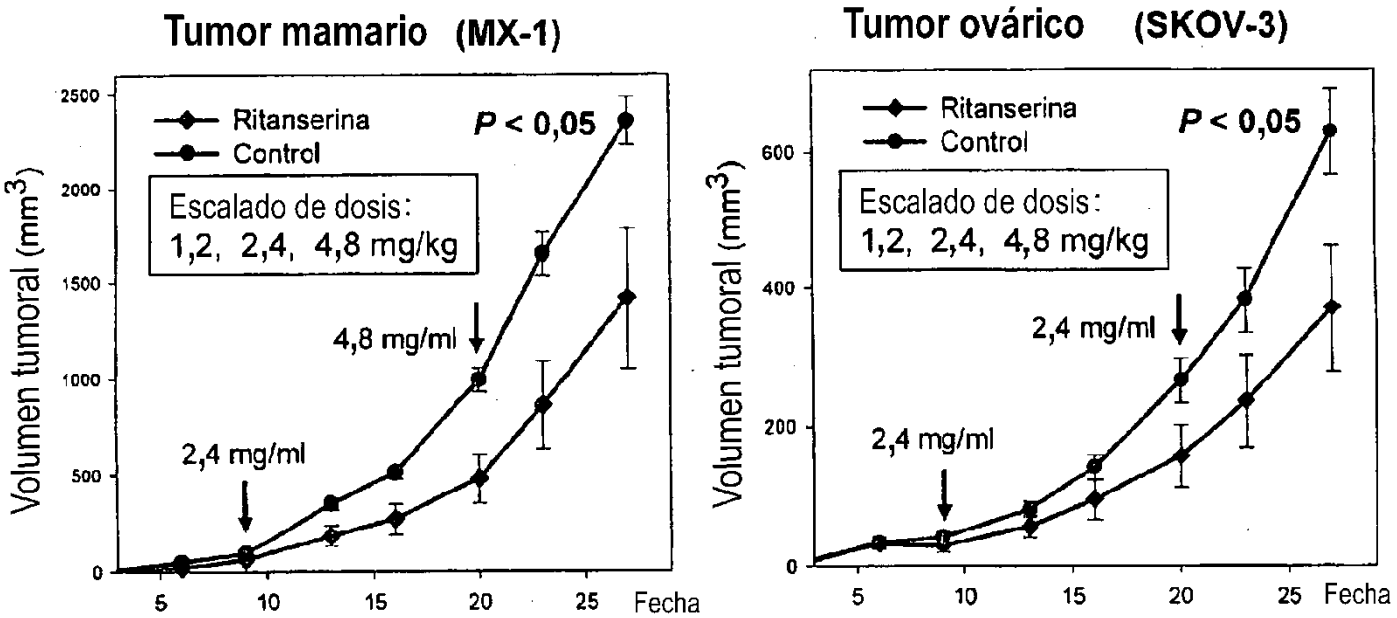


Figura 6

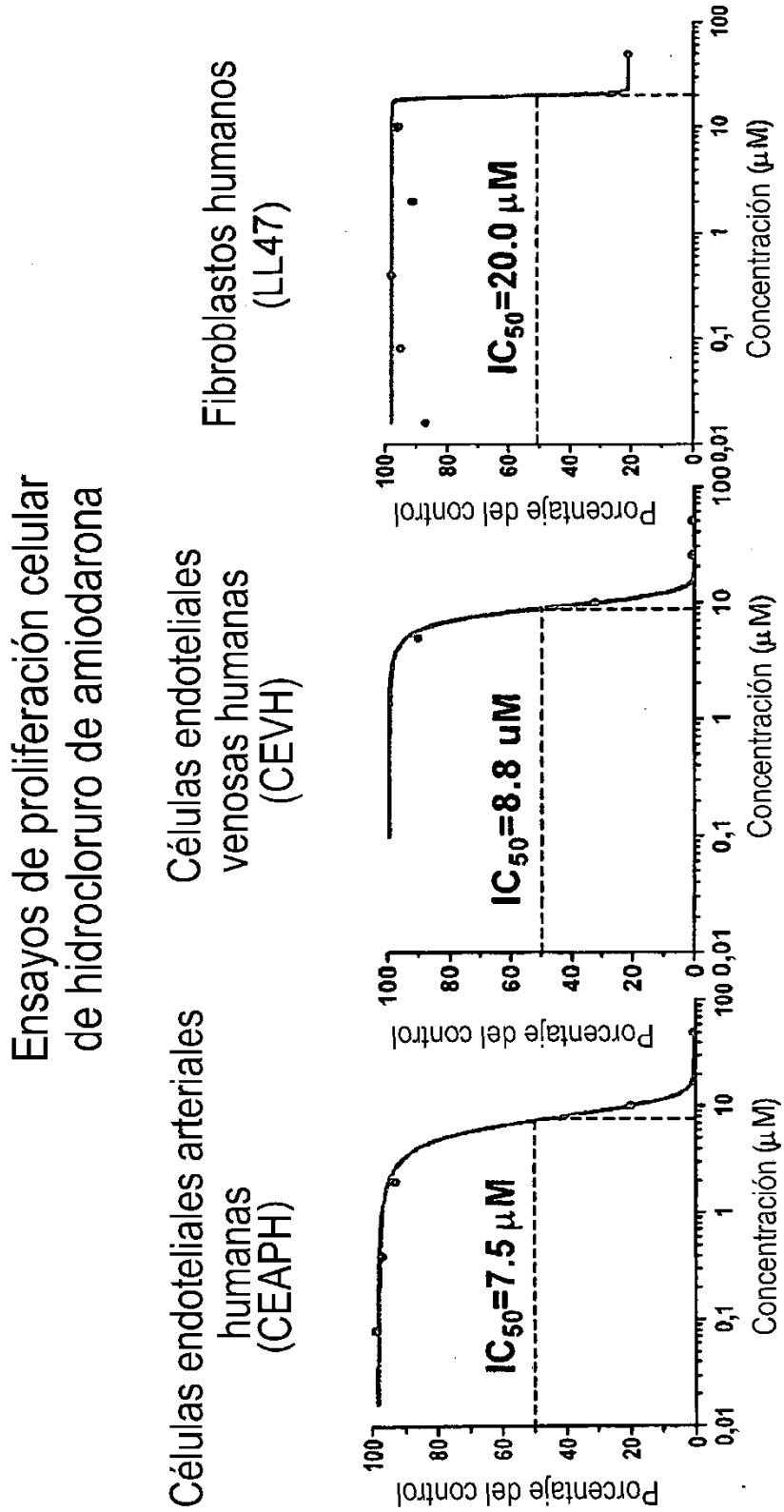

Ensayos de proliferación celular de hidrocloruro de amiodarona
Células endoteliales arteriales humanas (CEAPH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50=7.5 µM
IC50=8.8 uM
IC50=20.0 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 7

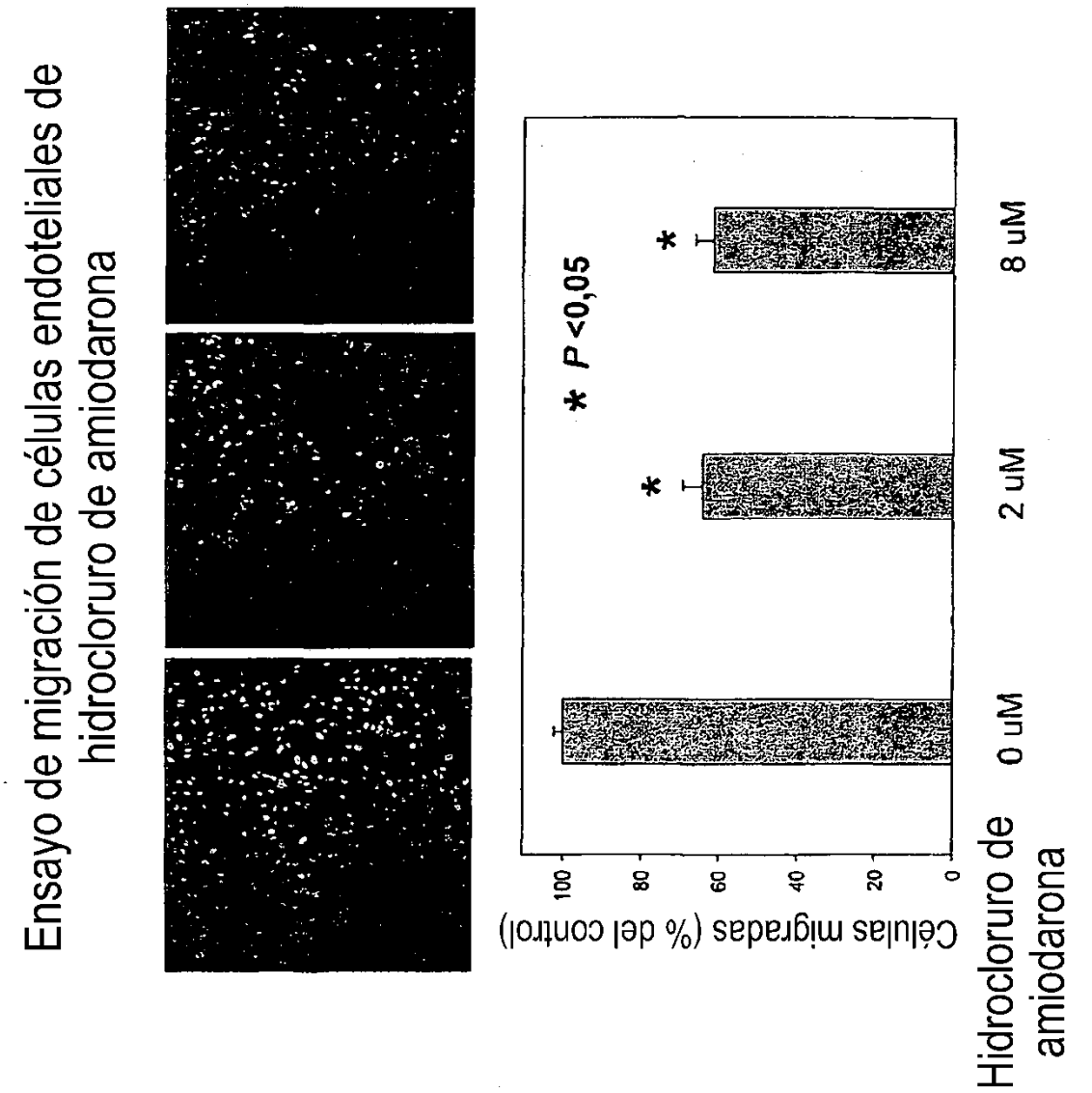
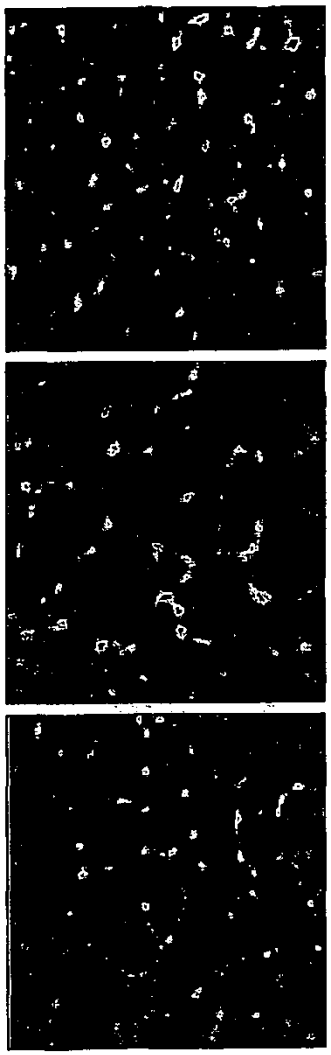

Ensayo de migración de células endoteliales de hidrocloruro de amiodarona
Células migradas (% del control)
100
80
60
40
20
0
* P <0,05
*
*
Hidrocloruro de amiodarona
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 8

Ensayo de formación de tubo endotelial de hidrocloruro de amiodarona



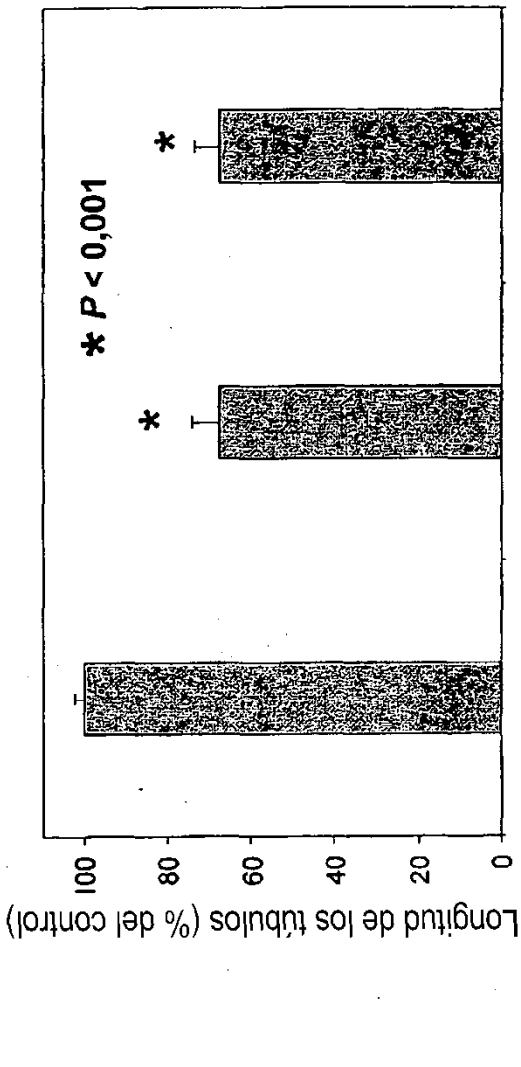


Figura 9

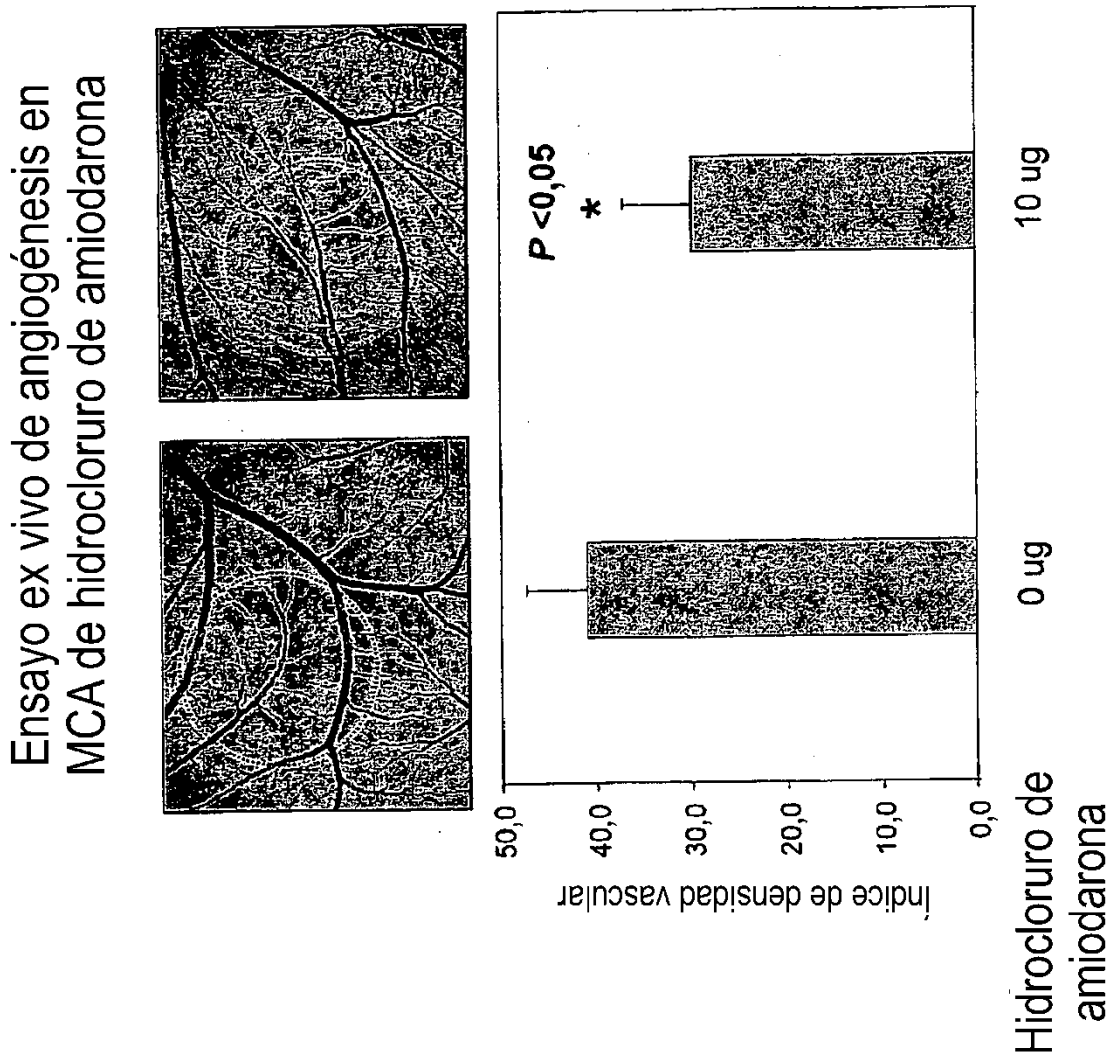

Ensayo ex vivo de angiogénesis en
MCA de hidrocloruro de amiodarona
Índice de densidad vascular
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
P <0,05
*
0 ug
10 ug
Hidrocloruro de
amiodarona

Figura 10

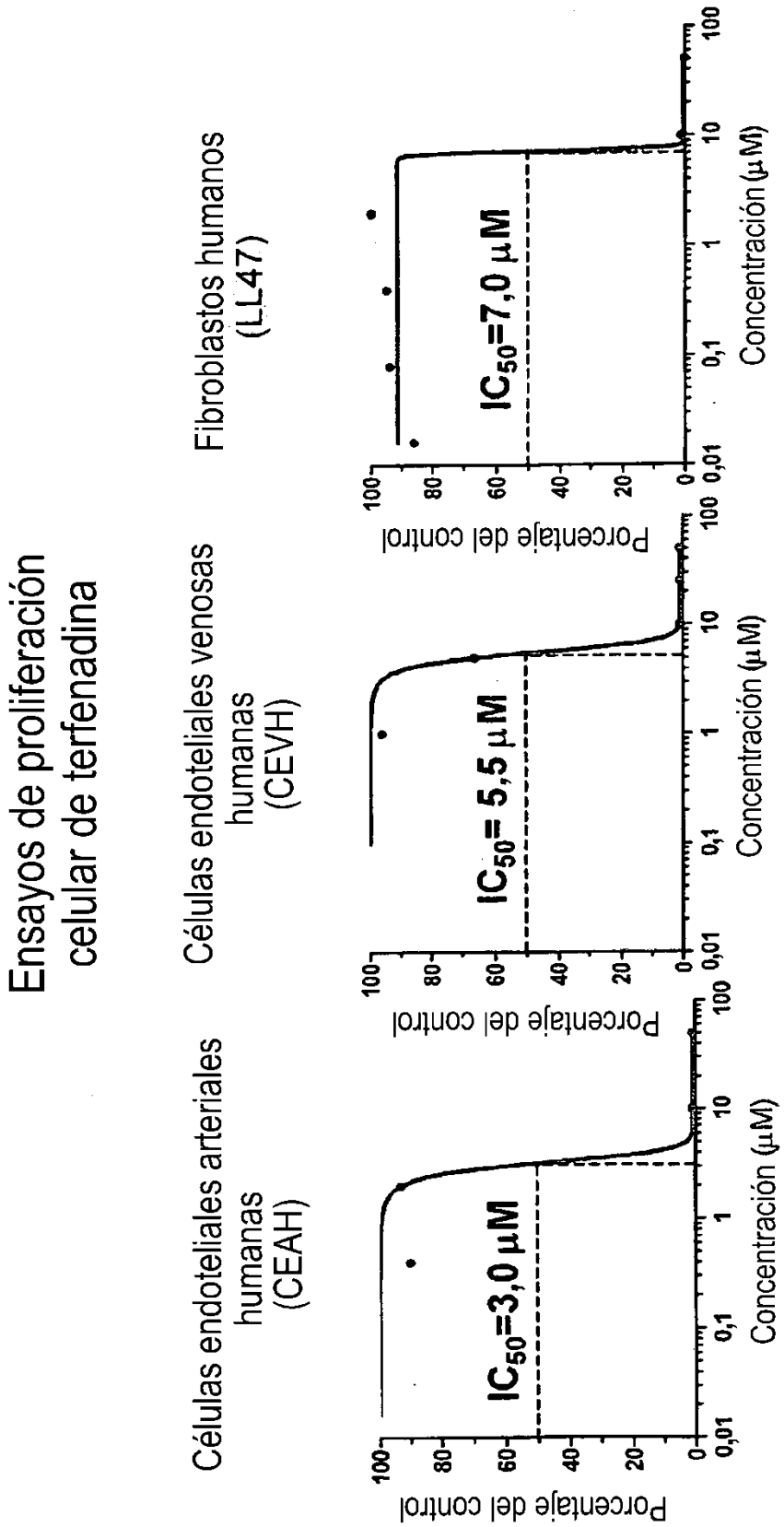

Ensayos de proliferación celular de terfenadina
Células endoteliales arteriales humanas (CEAH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50=3,0 µM
IC50= 5,5 µM
IC50=7,0 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 11

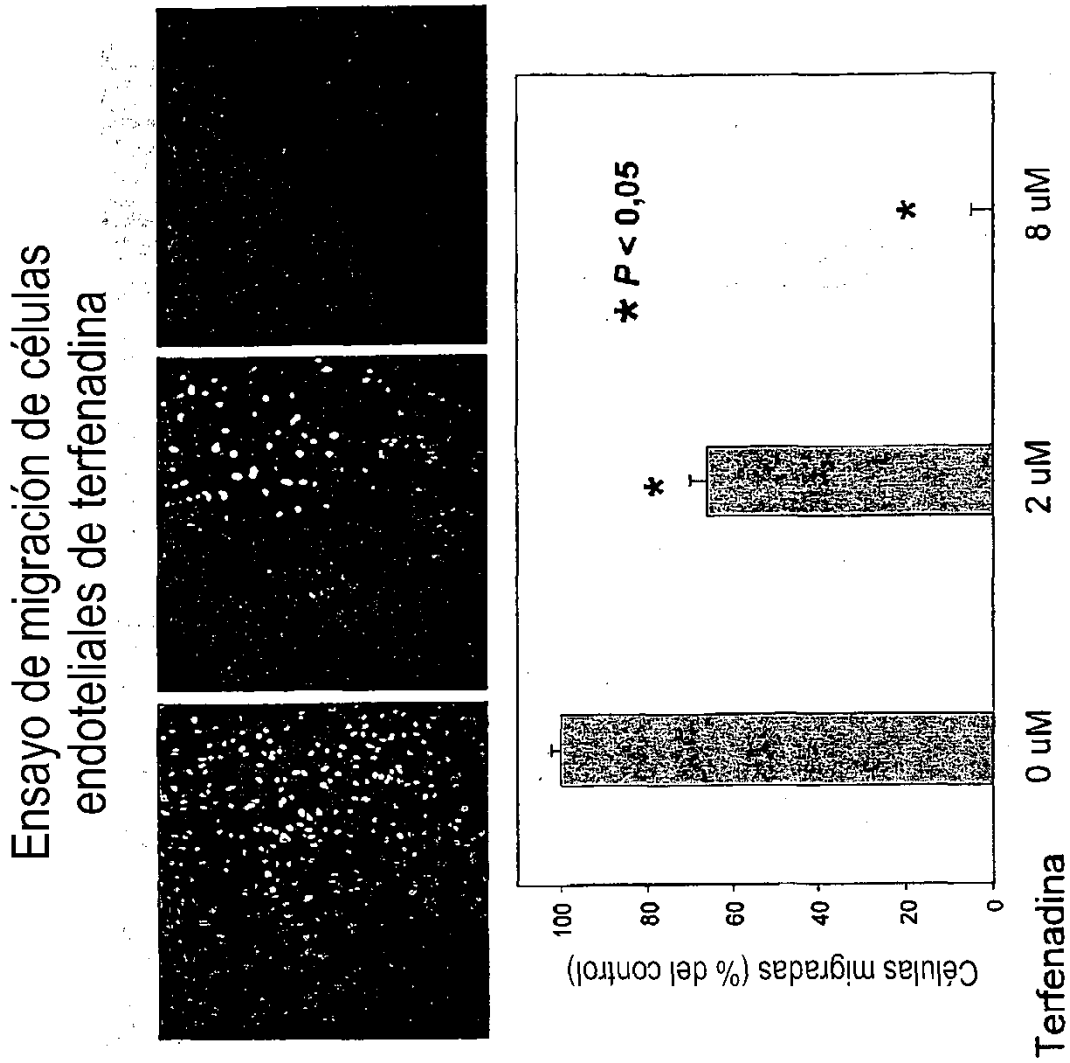

Ensayo de migración de células endoteliales de terfenadina
Células migradas (% del control)
100
80
60
40
20
0
* P < 0,05
*
*
Terfenadina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 12

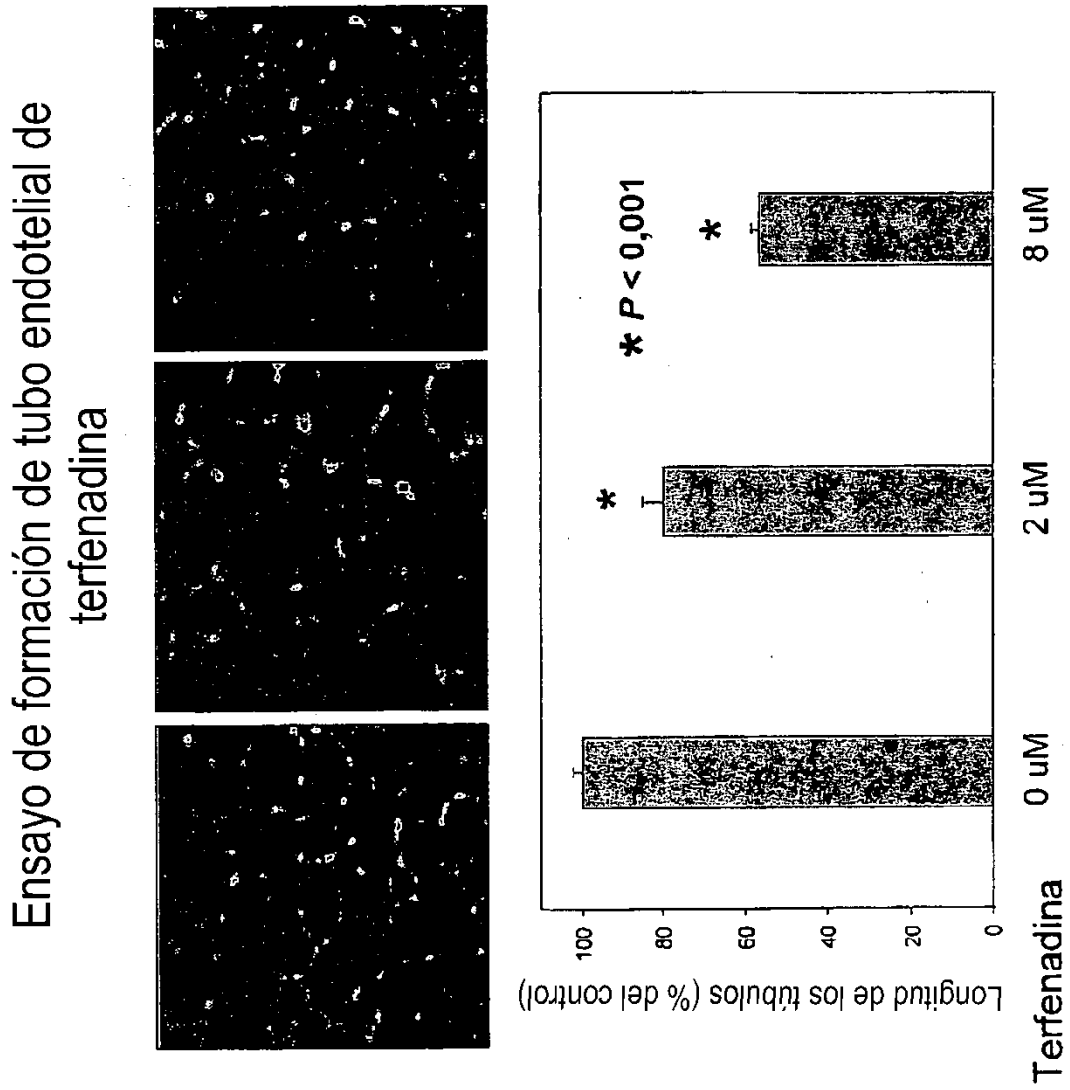

Ensayo de formación de tubo endotelial de terfenadina
Longitud de los túbulos (% del control)
100
80
60
40
20
0
* P < 0,001
*
*
Terfenadina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 13

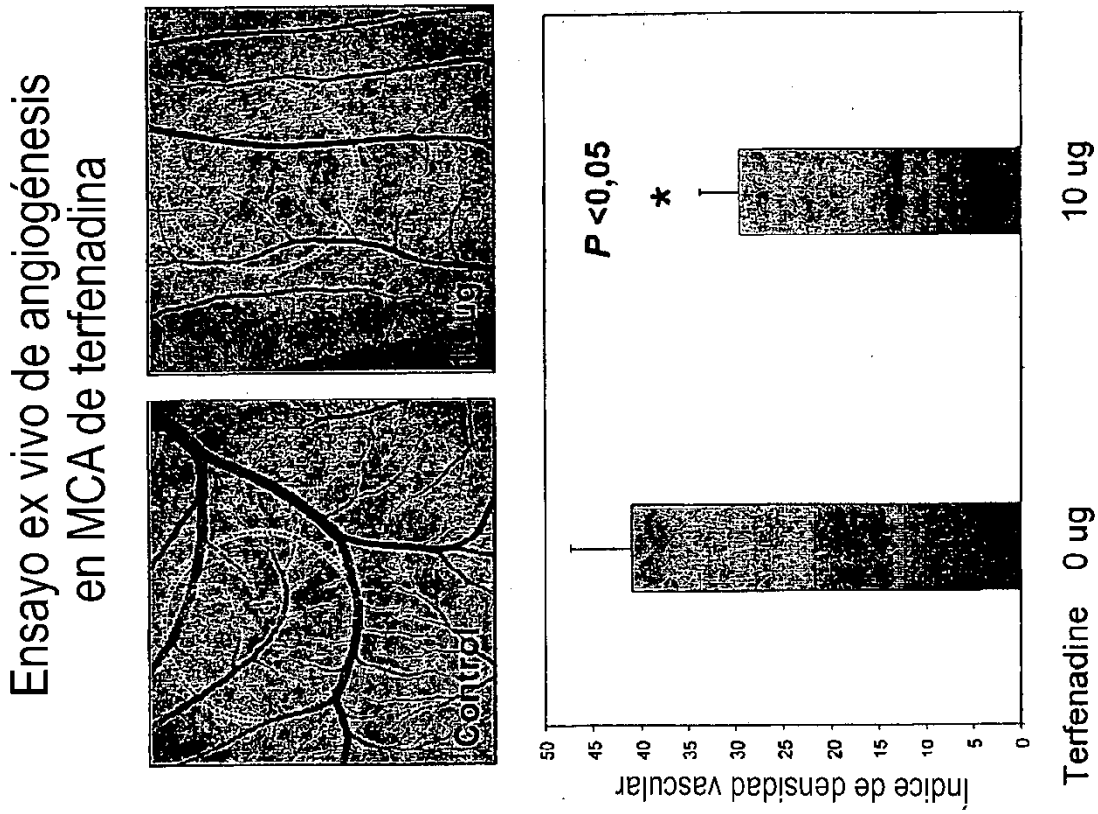

Ensayo ex vivo de angiogénesis
en MCA de terfenadina
Control
10 ug
P <0,05
*
Índice de densidad vascular
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Terfenadine 0 ug
10 ug

Figura 14

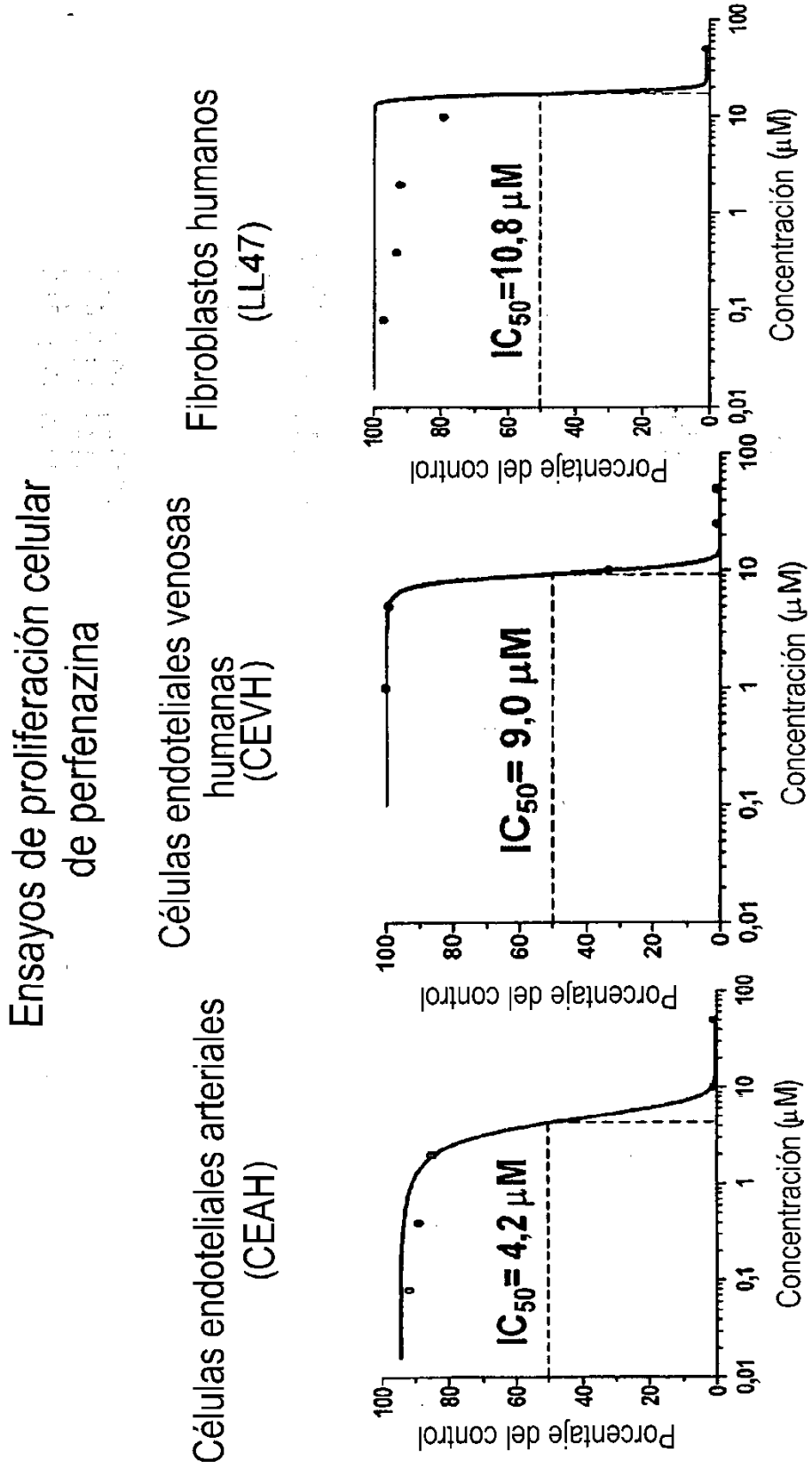

Ensayos de proliferación celular de perfenazina
Células endoteliales arteriales (CEAH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50= 4,2 µM
IC50= 9,0 µM
IC50=10,8 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 15

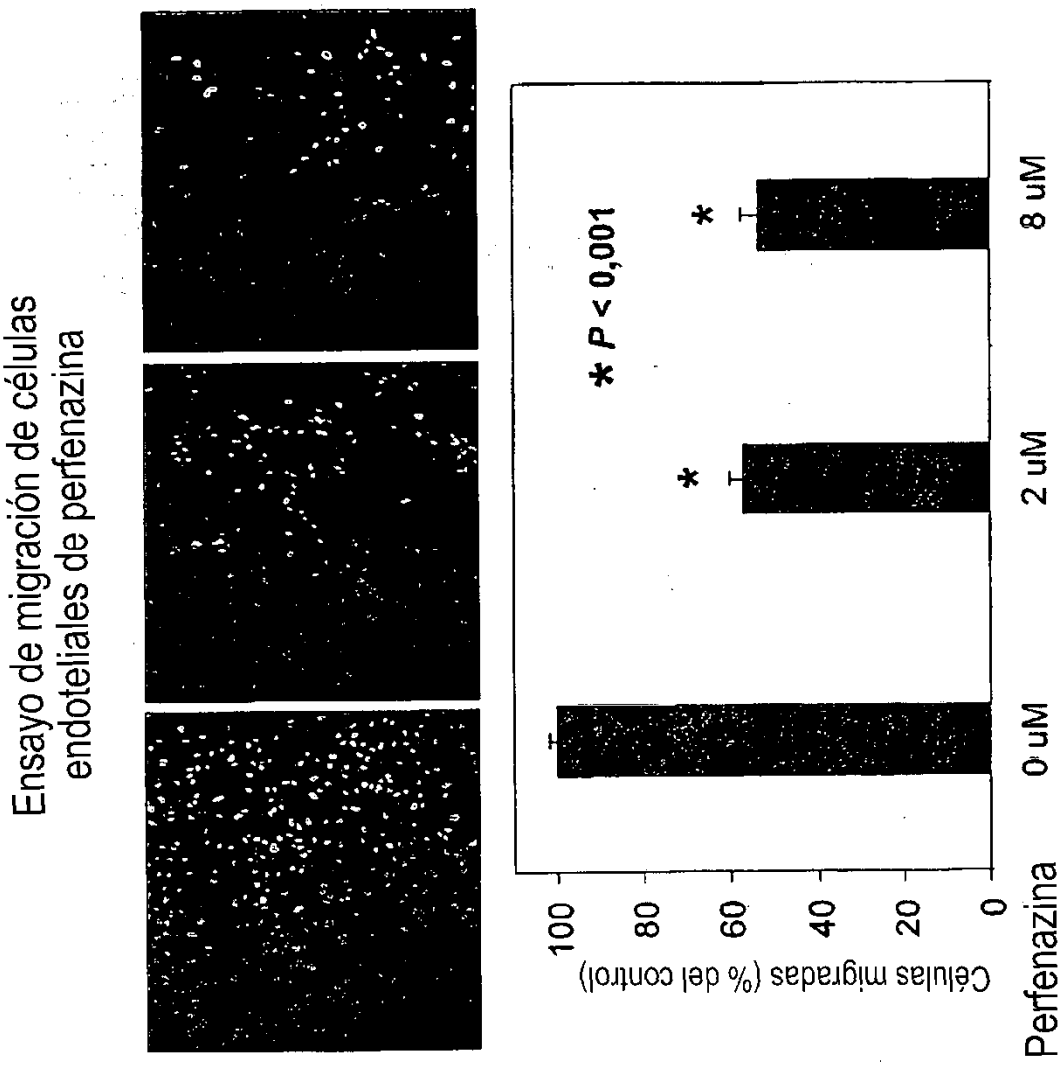

Ensayo de migración de células endoteliales de perfenazina
Células migradas (% del control)
100
80
60
40
20
0
* P < 0,001
*
*
Perfenazina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 16

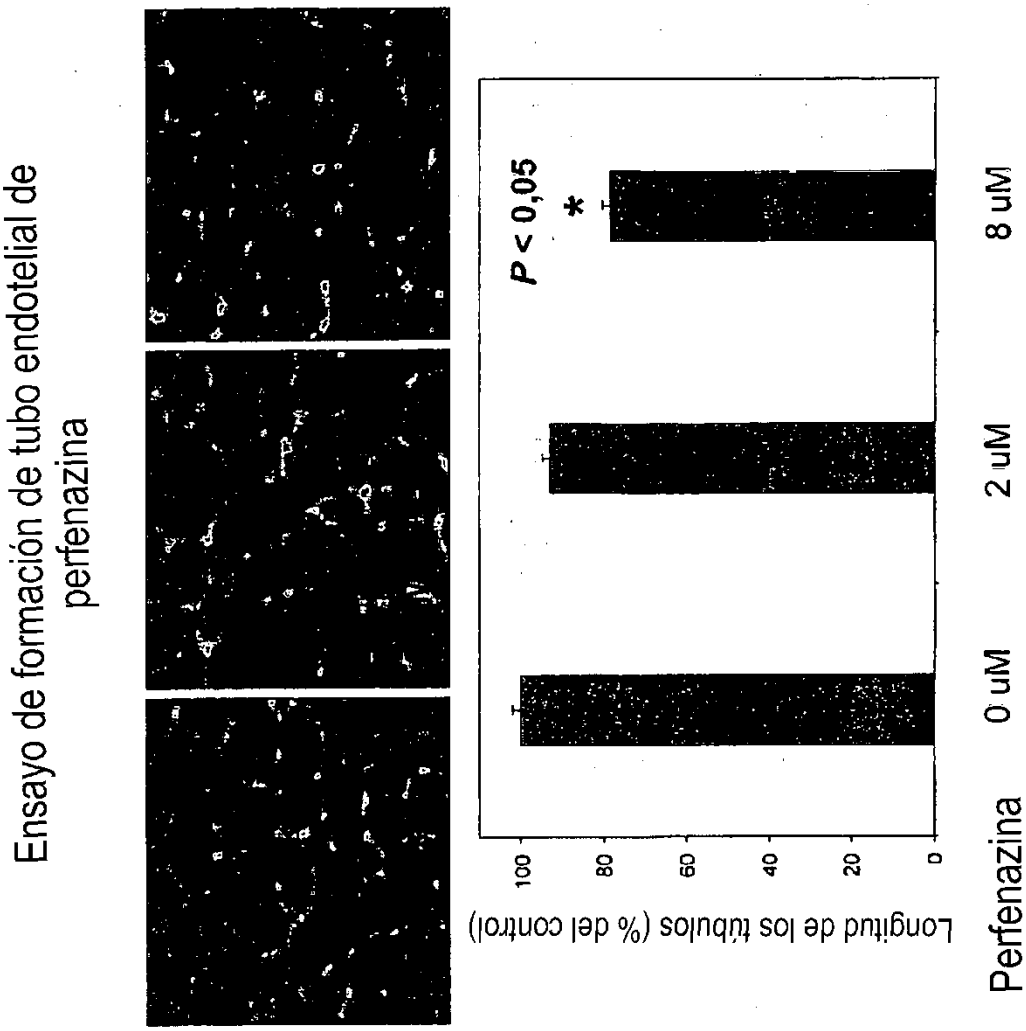

Ensayo de formación de tubo endotelial de perfenazina
Longitud de los tubulos (% del control)
100
80
60
40
20
0
P < 0,05
*
Perfenazina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 17

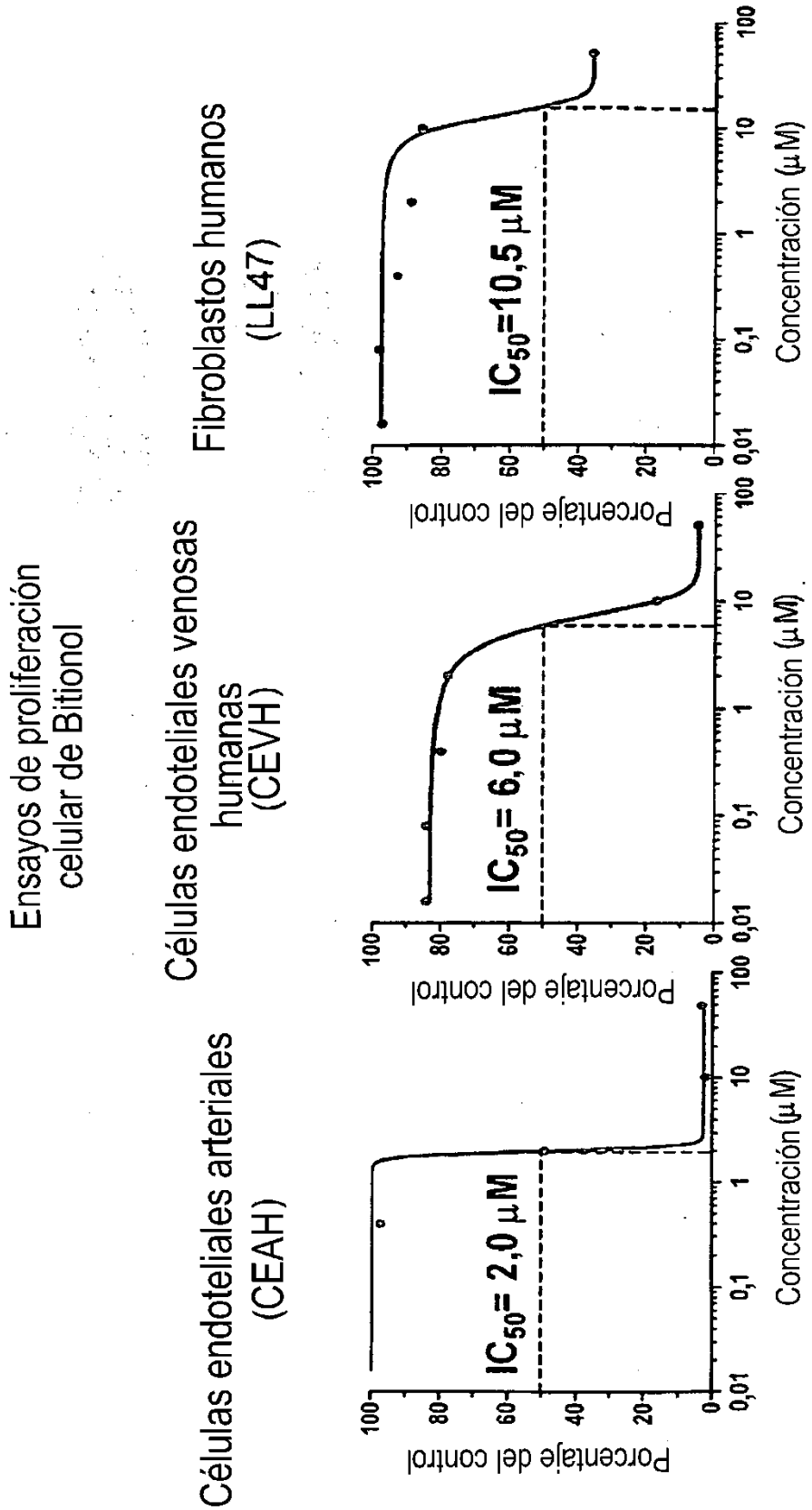

Ensayos de proliferación celular de Bitionol
Células endoteliales arteriales (CEAH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50= 2,0 µM
IC50= 6,0 µM
IC50=10,5 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 18

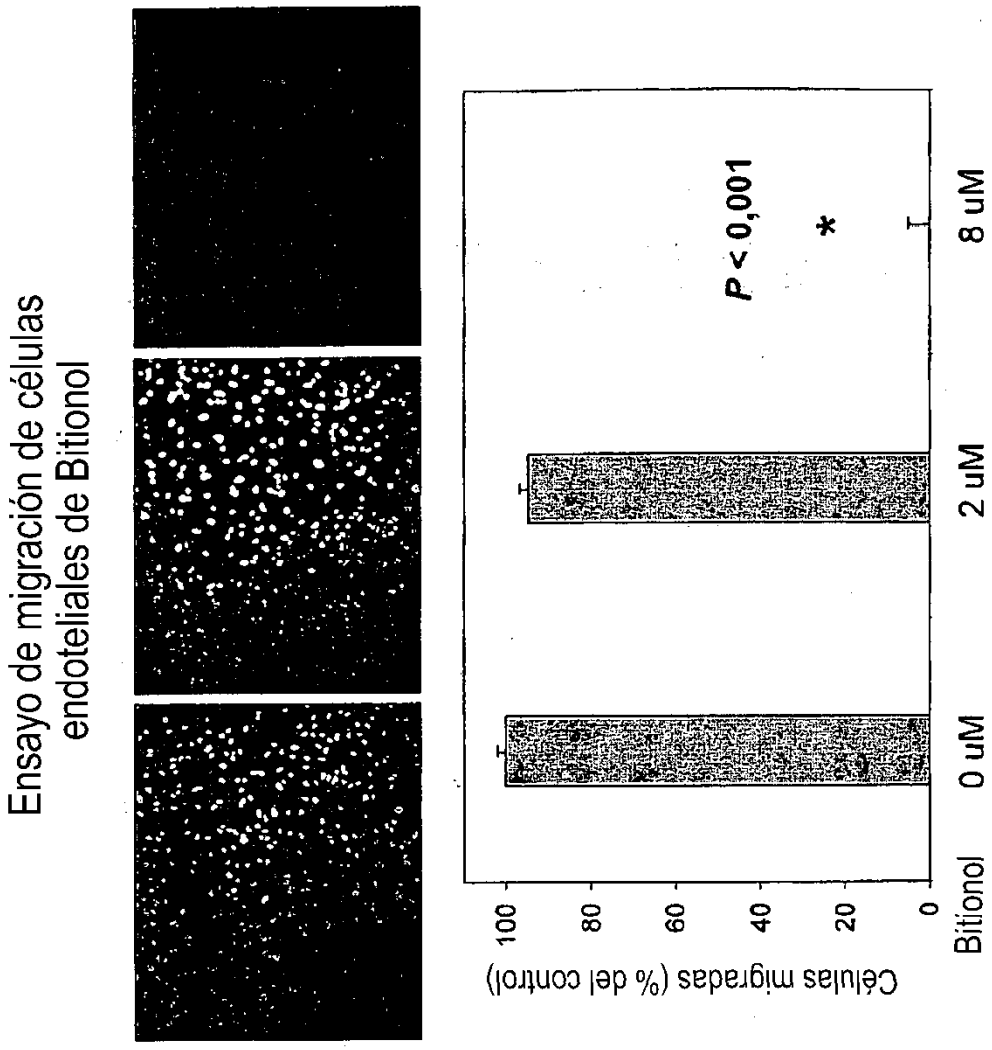

Ensayo de migración de células endoteliales de Bitionol
Células migradas (% del control)
100
80
60
40
20
0
P < 0,001
*
Bitionol
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 19

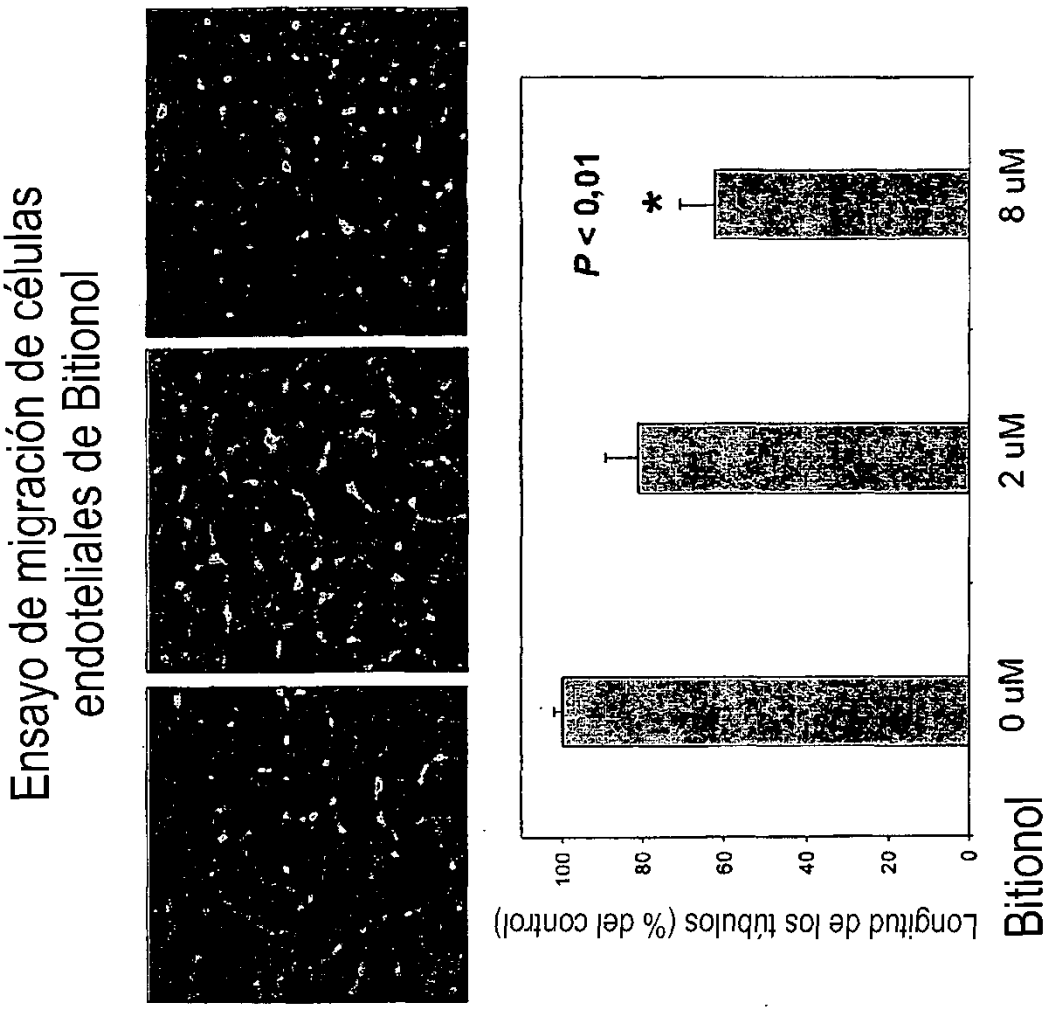

Ensayo de migración de células endoteliales de Bitionol
Longitud de los túbulos (% del control)
100
80
60
40
20
0
P < 0,01
*
Bitionol
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 20

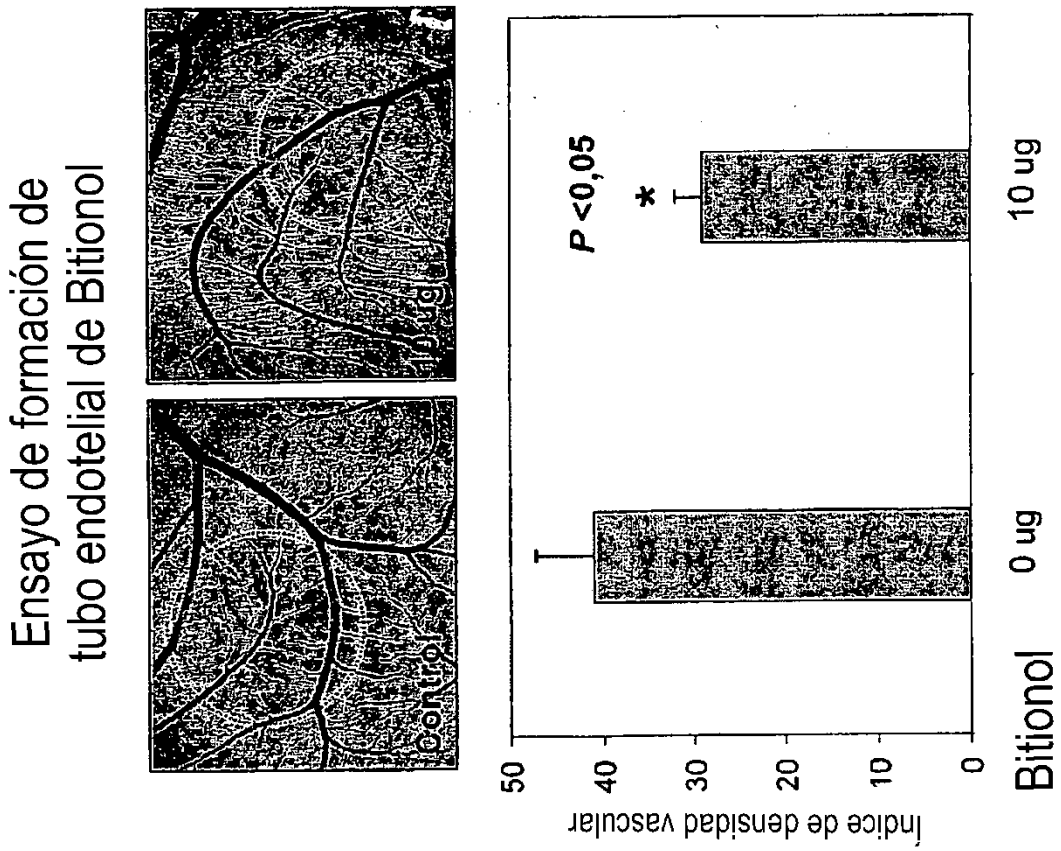

Ensayo de formación de tubo endotelial de Bitionol
control
10 ug
Índice de densidad vascular
50
40
30
20
10
0
P <0,05
*
Bitionol
0 ug
10 ug

Figura 21

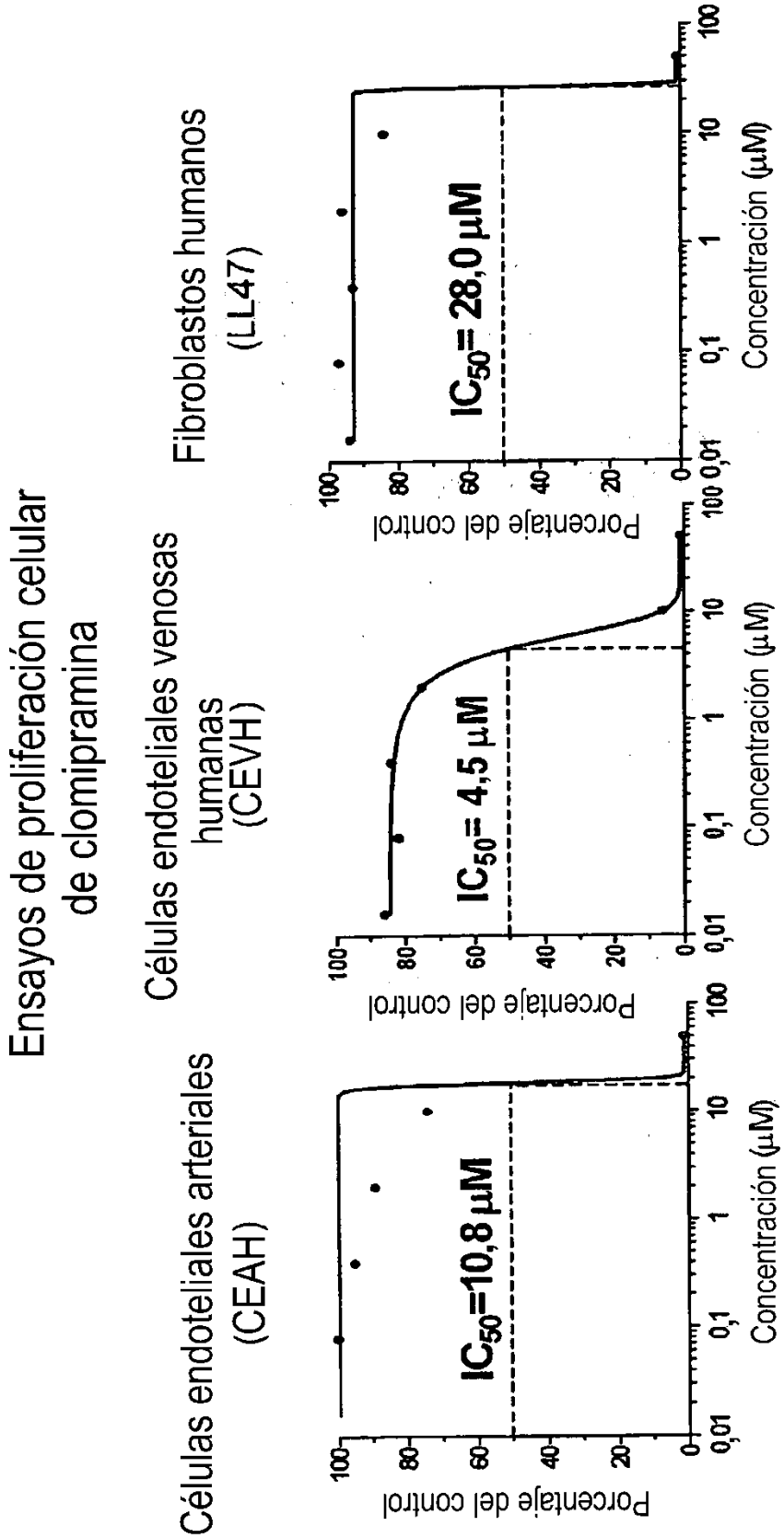

Ensayos de proliferación celular de clomipramina
Células endoteliales arteriales (CEAH)
Células endoteliales venosas humanas (CEVH)
Fibroblastos humanos (LL47)
IC50=10,8 µM
IC50= 4,5 µM
IC50= 28,0 µM
Porcentaje del control
Concentración (µM)
0
20
40
60
80
100
0,01
0,1
1
10
100

Figura 22

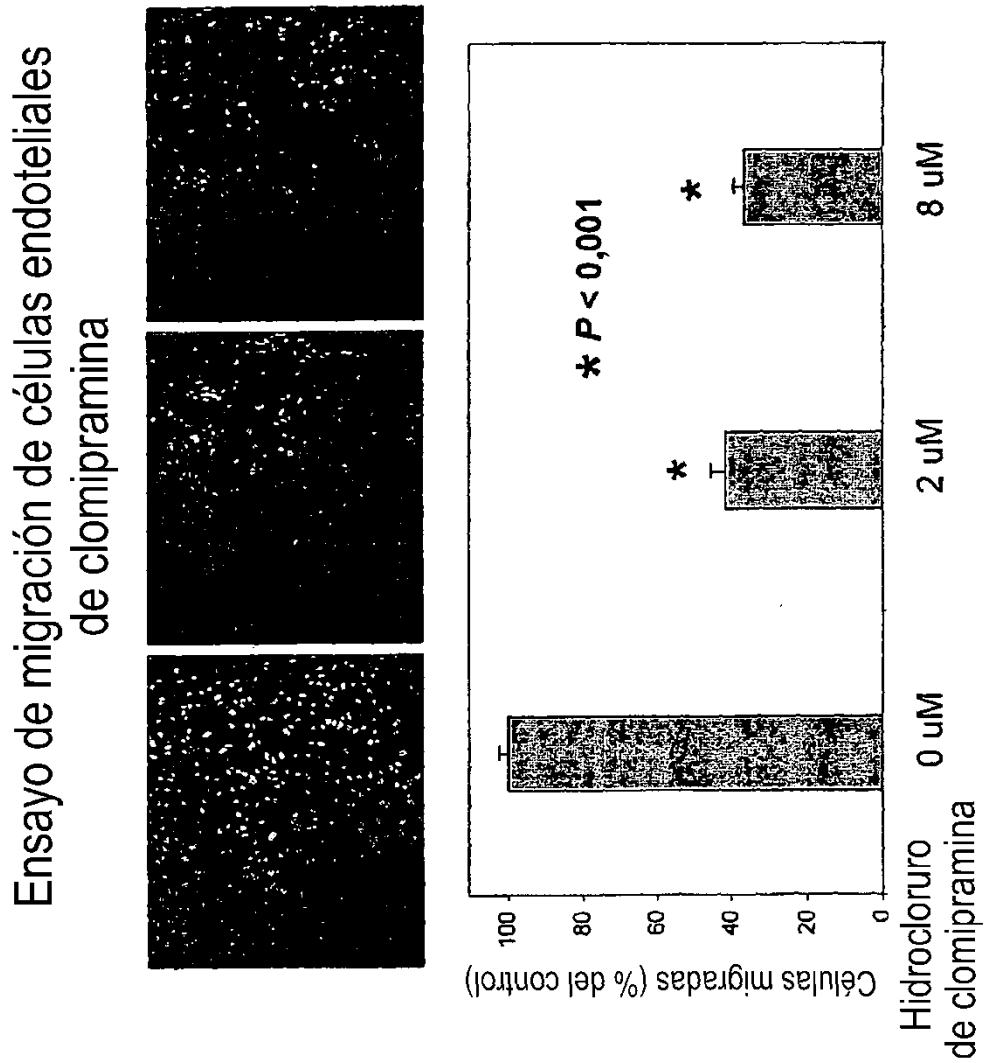

Ensayo de migración de células endoteliales de clomipramina
Células migradas (% del control)
100
80
60
40
20
0
* P < 0,001
*
*
Hidrocloruro de clomipramina
0 uM
2 uM
8 uM

Figura 23

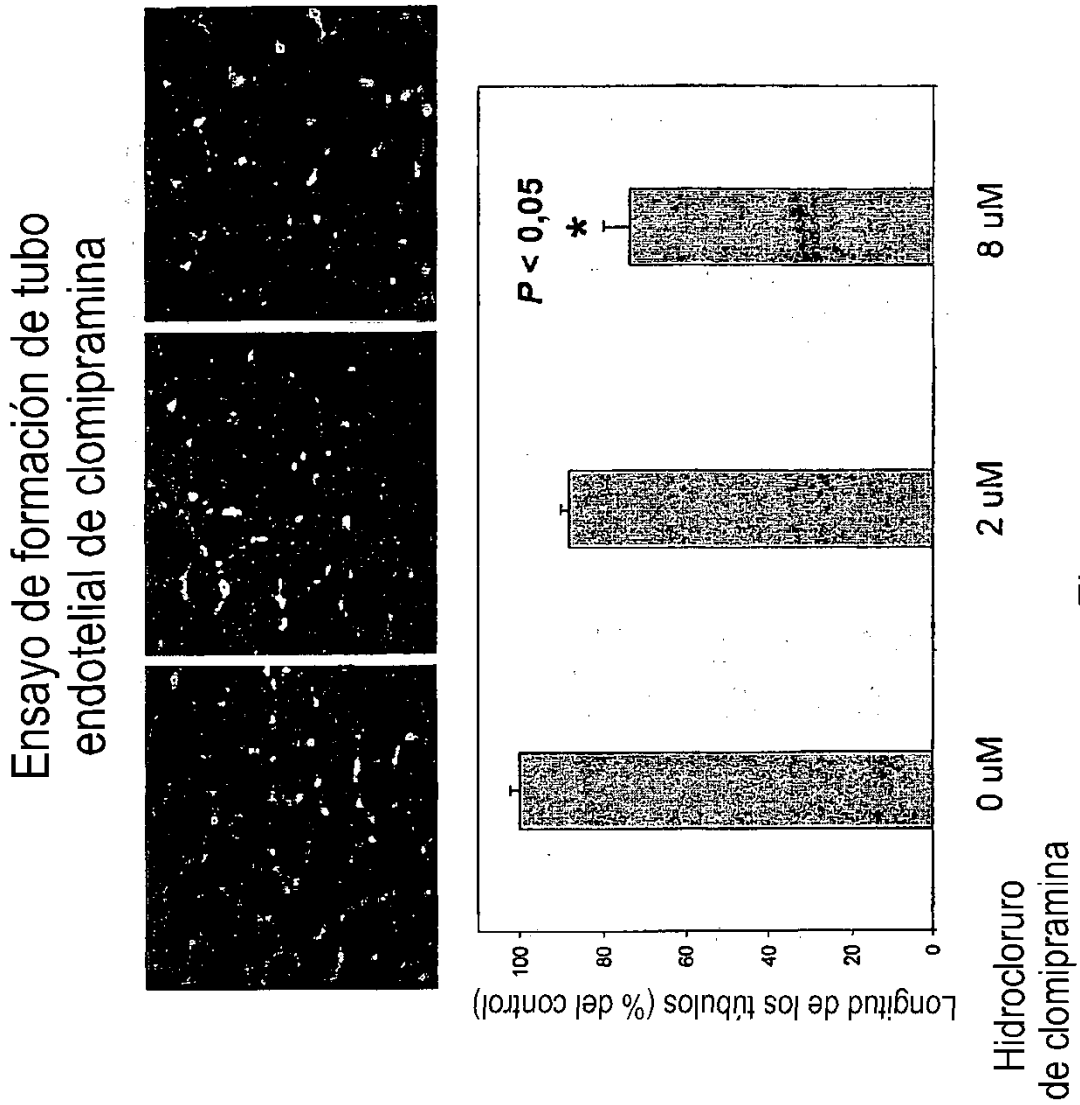

Ensayo de formación de tubo endotelial de clomipramina
Longitud de los túbulos (% del control)
100
80
60
40
20
0
P < 0,05
*
0 uM
2 uM
8 uM
Hidrocloruro de clomipramina

Figura 24

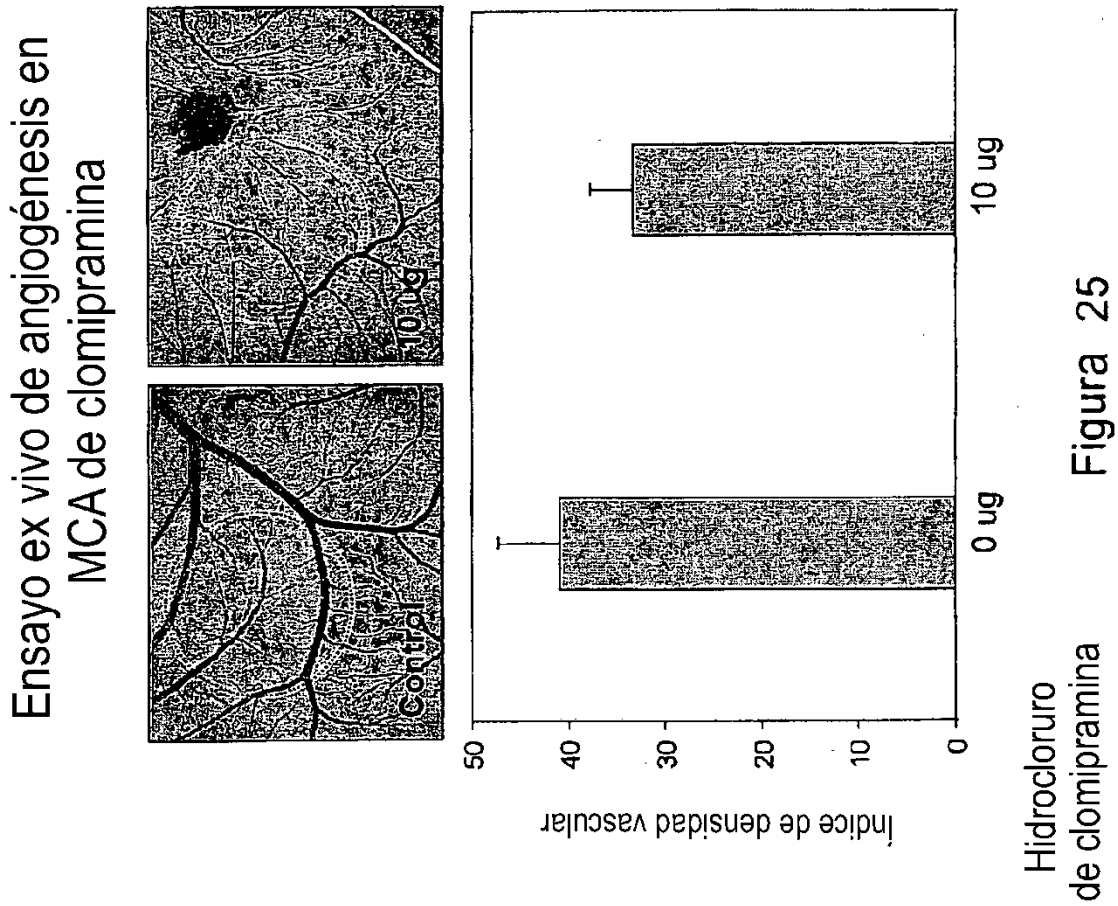

Ensayo ex vivo de angiogénesis en MCA de clomipramina
Control
10 ug
Índice de densidad vascular
50
40
30
20
10
0
0 ug
10 ug
Hidrocloruro de clomipramina

Figura 25