

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 442**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/5685** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 9/12** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2014** **E 14200543 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 3040075**

54 Título: **Esteroides C-19 para inhibir la neovascularización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.01.2018**

73 Titular/es:

**CURADIS GMBH (100.0%)**  
**Henkestrasse 91**  
**91052 Erlangen, DE**

72 Inventor/es:

**UNTEREGGER, GERHARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 651 442 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**

Esteroides C-19 para inhibir la neovascularización

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, particularmente a nuevos usos de compuestos esteroideos C-19, más particularmente a esteroideos C-19 que tienen una estructura androsten-3-ona con configuraciones estructurales específicas, en particular en la posición 4 y/o 17, para la inhibición de la neovascularización, angiogénesis y más usos. La presente invención se refiere particularmente a esteroideos C-19 seleccionados que inhiben la proliferación y/o migración de células endoteliales y/o de células musculares lisas en el tratamiento de enfermedades que implican una neovascularización patológica y/o procesos regenerativos excesivos  
10 que están asociados por ejemplo con tumores o procesos inflamatorios. Además, la presente invención se refiere a la reducción de la síntesis o expresión, especialmente bajo situaciones terapéuticas de inflamación y/o cáncer y procesos relacionados de tejidos asociados, de factores de crecimiento o receptores de factor de crecimiento relevantes en la proliferación, cáncer y/o inflamación, seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y factores de crecimiento relacionados funcionalmente, principalmente el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 13 (FGFR 13), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)  $\alpha$  y/o  $\beta$ , receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (SCFR; también conocido como c-Kit o kit de tirosina-proteína quinasa o CD117).

**Descripción de los antecedentes de la técnica**

20 La angiogénesis es un proceso fisiológico de la vascularización tisular que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un tejido donde se los necesita. Por ejemplo, en un proceso de carencia de oxígeno como sería de forma similar el caso después de la formación de una herida, se piensa que las células liberan factores angiogénicos induciendo así el crecimiento de nuevos vasos. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular se percibe como el factor más importante que induce la proliferación de las células endoteliales, las células que forman los vasos, llevando a la vascularización.

25 Sin embargo, este proceso fisiológico podría desregularse en varios procesos patológicos, llevando a una excesiva e innecesaria o incluso dañina formación de nuevo vasos, que también se denomina como neovascularización. Por un lado, este proceso de neovascularización en si mismo provocaría una enfermedad o proceso patológico, por ejemplo, en caso de excesiva formación de cicatriz o glaucoma neovascular. Por otro lado, la neovascularización promueve la progresión de ciertas enfermedades ya que esta por ejemplo se desencadena por varios tumores sólidos, por ejemplo cáncer de mama, cáncer de próstata o linfomas como linfomas de Hodgkin o no de Hodgkin, o tumores no sólidos como mieloma múltiple.

30 Como la angiogénesis o neovascularización es una marca distintiva de los tumores, es una idea en la terapia anti-cancerígena inhibir la formación de nuevos vasos y así "matar de hambre" al tumor. Se han desarrollado varios nuevos compuestos que tienen como objetivo el bloqueo de la proliferación y migración de las células endoteliales. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra VEGF –bevacizumab (Avastin) – se usa con éxito en pacientes con diversos tumores para evitar la metástasis y para reducir los tumores.

35 Además de los anticuerpos que bloquean VEGF y su receptor VEGFR se usan ampliamente pequeñas moléculas como inhibidores de tirosina quinasa (TKI como Sunitinib y fármacos de 2ª generación Dovitinib = TKI 258) que se resumen en revisiones por Mukherji et al. o Heidegger et al. en el contexto de cáncer de próstata (Mukherji D, Temraz S, Wehbe D, Shamseddine A: Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 87 (2013) 122-131; Heidegger I, Massoner P, Eder IE, Pircher A, Pichler R, Aigner F, Bektic J, Horninger W, Klocker H: Novel therapeutic approaches for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 138 (2013) 248-256).

45 Sin embargo, la ingesta de bevacizumab o inhibidores de pequeñas moléculas puede estar acompañada de varios efectos secundarios serios y/o menos serios; además, el desarrollo de resistencia al fármaco se observa de forma regular en el contexto clínico durante el curso del tratamiento. Por tanto, hay una necesidad de nuevas moléculas diana para la terapia anti-angiogénica, estando la terapia asociada con menos efectos secundarios.

50 Recientemente, las hormonas esteroideas se han evaluado de forma controvertida por su efecto en la angiogénesis. Por ejemplo, Frank-Lissbrant y colegas describieron la rápida neovascularización en el lóbulo de la próstata ventral de rata de ratas castradas después de repetidas dosis subcutáneas de testosterona. (Frank-Lissbrant I, Häggström S, Damber JE, Bergh A: Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 1998; 139(2):451-6).

55 Además, Liao et al. describieron un efecto de la testosterona para promover la migración de células endoteliales vasculares de células endoteliales umbilicales humanas cultivadas (HUVEC) (Liao W, Huang W, Guo Y, Xin M, Fu X: Testosterone promotes vascular endothelial cell migration via upregulation of ROCK-2/moesin cascade. *Mol Biol Rep* (2013) 40:6729-6735).

Un papel de la testosterona en la regulación de la función endotelial y que juega un papel en el desarrollo y maduración de las células madre endoteliales en el contexto de la fisiología eréctil se sugiere también en una revisión de Traish y Galoosian (Traish AM, Galoosian A: Androgens modulate endothelial function and endothelial progenitor cells in erectile physiology. *Korean J Urol* 2013; 54:721-731).

5 Eisermann et al. presentó que el análogo de andrógeno R1881 induce la expresión de VEGF en las líneas celulares del cáncer de próstata, llevando así probablemente a la angiogénesis inducida por VEGF (Eisermann K, Broderick, CJ, Bazarov A, Moazam MM, Fraizer GC: Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Molecular Cancer* 2013, 12:7).

10 En contraste con eso, Chao et al. describió los efectos anti-angiogénicos de SR16388, un esteroide sintético con propiedades de unión al receptor ER alfa y ER beta (Chao WR, Amin K, Shi Y, Hobbs P, Tanabe M, Tanga M, Jong L, Collins N, Peters R, Laderoute K, Dinh D, Yean D, Hou C, Sato B, Alt C, Sambucetti L.: SR16388: a steroidal antiangiogenic agent with potent inhibitory effect on tumor growth in vivo. *Angiogenesis*. Marzo de 2011; 14(1):1-16).

15 Los efectos impredecibles en la angiogénesis se ven además con otros andrógenos bien conocidos, que mientras tanto o bien todos se han excluido del mercado o se han retirado debido a sus efectos secundarios. Thomas et al. describió que Danazol (17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxiandrost-4-eno [2,3-*d*]isoxazol) inhibe ciertas funciones celulares endoteliales tales como la proliferación y la formación de tubos pero carece de la inhibición de la etapa crítica de la invasión en el tejido (Thomas GW, Rael LT, Shimonkevitz R, Curtis CG, Bar-Or R, Bar-Or D: Effects of danazol on endothelial cell function and angiogenesis. *Fertil Steril*. Octubre de 2007; 88 (4 Supl.):1065-70). Debido a sus propiedades androgénicas (virilización, aumento de testosterona libre a pesar de la inhibición de la síntesis de testosterona) y su perfil desfavorable se retiró del mercado.

20 La nandrolona, 17 $\beta$ -hidroxiestr-4-en-3-ona, también un fármaco anabólico bien conocido, ejerce ciertas propiedades antiproliferativas en las células HUVEC (D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Sacconi-Jotti G, Botrè F, Carta G, Tozzi-Ciancarelli MG, Pavan A, Dolo V.: Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett*. 8 de marzo de 2007; 169 (2):129-36).

25 Sin embargo, se desconoce, si esto se traduce en la inhibición de la angiogénesis ya que en un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica se observó que la nandrolona aumenta la formación de TGF-beta, que se conoce por estimular la expresión de uno de los factores angiogénicos más potentes, es decir, VEGF (Galbiati M, Onesto E, Zito A, Crippa V, Rusmini P, Mariotti R, Bentivoglio M, Bendotti C, Poletti A. El esteroide anabólico/androgénico nandrolona exacerba las modificaciones de expresión génica inducidas por el SOD1 mutante en los músculos de modelos de ratón de esclerosis lateral amiotrófica. *Pharmacol Res*. Febrero de 2012; 65(2):221-30). Por el contrario, la nandrolona reduce los niveles de VEGF en los músculos de ratas que se ejercitan (Paschoal M, de Cássia Marqueti R, Pérez S, Selistre-de-Araujo HS. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. *Int J Sports Med*. Noviembre de 2009; 30(11):775-8).

35 El estanzolol (17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano[3,2-*c*]pirazol-17 $\beta$ -ol) aumenta la expresión de TGF beta 1, que se conoce por aumentar la producción del factor angiogénico más potente VEGF (Cao Y, Townsend CM, Ko T: Transforming growth factor-beta (TGF-beta) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene expression through Smad3 transcription factor. *ACS*, 2005 Volumen 201, Tema 3, Supl. 17-18).

40 Además, Thorpe et al. mostró que el cortisol unido a hidrazida adípica de heparina (HAH) representaría nuevos inhibidores de angiogénesis para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades angiogénicas (Thorpe PE, Derbyshire EJ, Andrade SP, Press N, Knowles PP, King S, Watson GJ, Yang YC, Rao-Betté M.: Heparin-steroid conjugates: new angiogenesis inhibitors with antitumor activity in mice. *Cancer Res*. 1 de Julio de 1993; 53(13):3000-7).

45 A la luz de las diversas moléculas diana potenciales de hormonas esteroideas, por ejemplo los receptores o enzimas de hormonas esteroideas, se hace evidente que el resultado de una interacción de una célula o tejido definido con esteroides definidos es diferente del género a género, del tejido a tejido y el patrón específico de los receptores esteroideos disponibles y activos. La respuesta biológica específica a las hormonas esteroideas está influida por (i) diferencias en el patrón de expresión de por ejemplo receptores de hormonas esteroideas, (ii) la expresión de enzimas y (iii) diferencias en la expresión de co-factores (co-activadores o co-represores) del receptor que modulan la respuesta del receptor y (iv) la presencia de esteroides en el cultivo celular, órgano o tejido. La predicción de una respuesta biológica hacia un esteroide natural o análogo sintético parece difícil; en base a la bibliografía disponible el experto puede incluso predecir que los compuestos tipo testosterona pueden inducir la angiogénesis.

50 Hay una necesidad, y por tanto es un objetivo de la presente invención, proporcionar un inhibidor de angiogénesis efectivo, que sea capaz de inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales y/o musculares lisas y/o reducir la síntesis o expresión de VEGF y/o de VEGFR, inhibiendo por tanto la neovascularización en enfermedades que implican procesos regenerativos excesivos, es decir, procesos que se dan en diversas enfermedades.

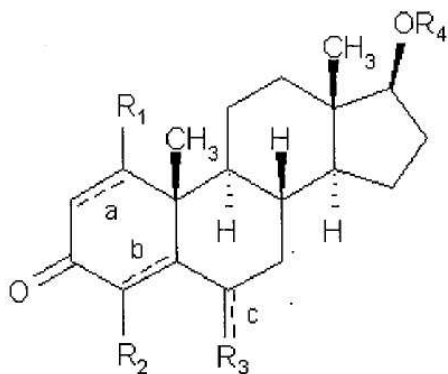
55

Estos objetivos además de otros, que serán evidentes desde la siguiente descripción de la presente invención, se consiguen mediante el contenido de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención se definen por el contenido de las reivindicaciones dependientes.

**Compendio de la invención**

5 Diversos aspectos, características ventajosas y realizaciones preferidas de la presente invención como se resumen en los siguientes puntos, respectivamente solos o en combinación, contribuyen a resolver el objeto de la invención.

1. Un compuesto definido por la fórmula 1



**Fórmula 1**

10 En donde a, b y c respectivamente indican, independientemente los unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es un doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

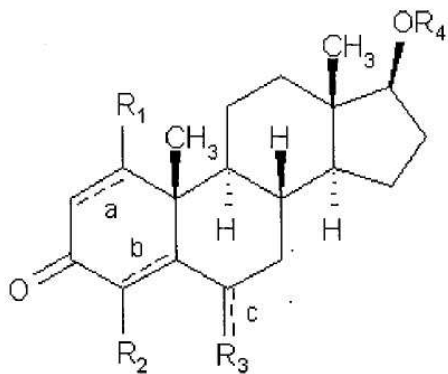
R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

15 R<sub>3</sub> es, en caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno u alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es el mismo que se define anteriormente;

20 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por el grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente, no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización biológica o desprotección química, particularmente un éster, éter, acetal, carbonato, carbamato, fosfato, fosfonato, cetal, sulfato o sulfonato, y sales de los mismos,

Para usar en un tratamiento médico como inhibidor de angiogénesis, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

2. El compuesto definido por la fórmula 1



**Fórmula 1**

En donde a, b y c respectivamente indican, independientemente los unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es un doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

5 R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

R<sub>3</sub> es, en caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es el mismo que se define anteriormente;

10 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente, no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización biológica o desprotección química, particularmente un éster, éter, acetal, carbonato, carbamato, fosfato, fosfonato, cetil, sulfato o sulfonato, y sales de los mismos,

15 Para usar como inhibidor de angiogénesis en la terapia de inflamación y/o cáncer inhibiendo la proliferación o síntesis de, o bien solo o en combinación: proliferación de células endoteliales, proliferación de células musculares lisas, migración de células endoteliales, proliferación de células musculares lisas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 13 (FGFR 13), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)  $\alpha$  y/o  $\beta$ , e inhibidor del receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (SCFR; también conocido como c-kit o kit de tirosina proteína quinasa o CD117), en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

20 3. El compuesto para usar según el punto 1 o 2, en donde el compuesto se define siendo a y c un enlace sencillo, siendo b un doble enlace, y siendo R<sub>2</sub> OR<sub>5</sub>, siendo OR<sub>5</sub> como se define en la reivindicación 1, preferiblemente en donde R<sub>5</sub> es o bien hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y R<sub>4</sub> es o bien hidrógeno o COR<sub>6</sub> siendo R<sub>6</sub> C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>.

4. El compuesto para usar según la presente invención es 4-hidroxitestosterona (4-OHT) o sus sales o ésteres.

25 5. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos anteriores para usar como un inhibidor de la neovascularización en un proceso patológico que implica procesos regenerativos.

6. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos anteriores para evitar o inhibir la neovascularización en un proceso inflamatorio.

30 7. El compuesto para usar según el punto 6, en donde el proceso inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en artritis, enfermedades inflamatorias del intestino, eczema, neurodermatitis.

8. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para evitar o inhibir la neovascularización desencadenada por un tumor.

35 9. El compuesto para usar según cualquiera del punto 8, en donde la neovascularización se desencadena por un tumor de tejido mamario, preferiblemente cáncer de mama, o tumor de tejido prostático, preferiblemente cáncer de próstata.

10. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos anteriores 1 a 5 en una profilaxis o tratamiento de un tumor sólido y metástasis del mismo.

40 11. El compuesto para usar según el punto 10, en donde dicho tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cánceres renales tales como carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro y particularmente glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y linfoma, y metástasis de los mismos.

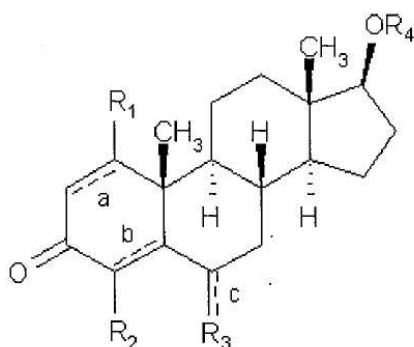
12. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 en una profilaxis o tratamiento de un tumor no sólido y metástasis del mismo.

13. El compuesto para usar según el punto 9, en donde dicho tumor no sólido es mieloma múltiple y metástasis del mismo.

45 14. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para usar en una profilaxis o tratamiento de un neoplasma vascular o vasoproliferativo, particularmente un tumor de células endoteliales seleccionadas del grupo que consiste en hemangiomas.

15. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos anteriores 1 a 7 para evitar o tratar una enfermedad relacionada con el ojo.

16. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para usar en una profilaxis o tratamiento de una enfermedad relacionada con el ojo seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular, inflamación ocular, particularmente queratitis, vascularización de la córnea, inyección vascular en el cuerpo vítreo, vascularización de la lente ocular.
- 5 17. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para evitar o inhibir la neovascularización en la reparación de heridas que incluye la transformación de tejido funcional regular en tejido blando.
18. El compuesto para usar según el punto 17 para reducir la formación de cicatriz más allá del límite en órganos tales como el hígado o el corazón después de lesión aguda o crónica o en la piel.
- 10 19. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para evitar o inhibir las malformaciones vasculares, en particular hemangioma en la piel u órganos sólidos (hígado, cerebro, corazón).
20. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para evitar o inhibir las enfermedades cardiovasculares, particularmente la alta presión sanguínea, estenosis o restenosis de vasos sanguíneos y arteriosclerosis.
21. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para el tratamiento contra la obesidad.
- 15 22. El compuesto para usar según cualquiera de los puntos 1 a 5 para un tratamiento contra la endometriosis.
23. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula como se define en cualquiera de los puntos anteriores y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para usar en un tratamiento médico según cualquiera de los puntos anteriores.
- 20 24. La composición farmacéutica según el punto 23, en donde la composición farmacéutica se prepara para la administración dérmica, mucosa o submucosa, transdérmica, i.m., s.c., i.v., oral o en supositorios o instilación en cavidades.
25. La composición farmacéutica según los puntos 23 o 24, en donde la composición farmacéutica se prepara para uso oral, administración subcutánea, cutánea, intramuscular, intravenosa, intraocular, nasal o transdérmica.
26. Una combinación que comprende
- 25 (i) una sustancia activa seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra VEGF, VEGFR o híbridos de VEGFR/VEGFR soluble, e inhibidores de tirosina quinasa, y
- (ii) un compuesto definido por la fórmula 1



Fórmula 1

- 30 En donde a, b y c indican respectivamente, independientemente los unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

- 35 R<sub>3</sub> es, en caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es el mismo que se define anteriormente;

5 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente, no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización biológica o desprotección química, particularmente un éster, éter, acetal, carbonato, carbamato, fosfato, fosfonato, cetil, sulfato o sulfonato, y sales de los mismos, preferiblemente para usar como se define en cualquiera de los puntos anteriores, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

27. Una composición farmacéutica que comprende una combinación según el punto 26.

### Descripción de los dibujos

10 Fig. 1 A y B: Ensayo de proliferación tras la exposición de células HUVEC a 4-OHT y TKI 258 usando ensayos WST-1, resp. solo o en combinación;

Fig. 2A Principio de ensayo de migración de transwell;

Fig. 2B Análisis del ensayo de migración de transwell tras la exposición de células HUVEC a 4-OHT;

Fig. 3 Ensayo de curación de heridas de células HUVEC tras la exposición a 4-OHT;

Fig. 4 Ensayo de migración en el tubo de células HUVEC tras la exposición a 4-OHT usando matrigel.

### 15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe ahora en más detalle mediante realizaciones y ejemplos preferidos, que se presentan sin embargo solo con propósito ilustrativo.

20 La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula general 1 definido anteriormente, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres, que se ha encontrado sorprendentemente que inhibe de forma eficaz la angiogénesis, y particularmente cualquiera o una combinación de (i) a (vi):

(i) inhibición de la proliferación de células endoteliales;

(ii) inhibición de la proliferación de células musculares lisas;

(iii) inhibición de la migración de células endoteliales;

(iv) inhibición de la migración de células musculares lisas;

25 (v) reducción de la expresión o síntesis de proteína VEGF;

(vi) reducción de la expresión o síntesis de proteína VEGFR;

30 (vii) reducción de la expresión o síntesis de proteína de factores de crecimiento funcionalmente relacionados, que incluye los del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 13 (FGFR 13), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)  $\alpha$  y/o  $\beta$ , y del receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (SCFR; también conocidos como c-kit o kit de tirosina proteína quinasa o CD117).

35 Por consiguiente, es particularmente adecuado para el tratamiento de enfermedades que implican procesos regenerativos excesivos que incluyen neovascularización en el tejido. Además, cualquiera de los tratamientos anti-cáncer/anti-proliferativos y/o anti-inflamatorios (i) a (vii) anteriores serán específicamente y selectivamente efectivos en pacientes afectados por dicha proliferación anormal, y/o en objetivos de tejidos y órganos especiales en

40 De forma importante, el tejido mencionado anteriormente puede ser específicamente un tejido u órgano en el cuerpo humano, en que la (neo)vascularización puede tener lugar y puede desencadenarse mediante un tumor particular, tal como tejido mamario canceroso o no canceroso, tejido de próstata, cualquier tejido intestinal, tejido pulmonar, tejido renal, el cerebro, el ojo, tejido del ovario o el tejido vascular per se en el contexto de las anomalías vasculares, que son por ejemplo neoplasmas vasculares o vasoproliferativos tales como hemangiomas o malformaciones vasculares tales como malformaciones vasculares de flujo lento, malformación capilar, malformación venosa, malformación linfática, malformaciones vasculares de flujo rápido, malformación arterial, malformación arteriovenosa, 45 fístula arteriovenosa o malformaciones vasculares combinadas (varias combinaciones de las anteriores).

Por lo tanto, el compuesto de fórmula 1 (4-OHT) es altamente útil para procesos patológicos o situaciones que desencadenan la (neo)vascularización, estando por ejemplo en los respectivos casos de tumores o cualquier proceso inflamatorio. El compuesto de fórmula 1 (4-OHT) es altamente útil para la profilaxis o tratamiento de otros cánceres y/o una metástasis de los mismos, donde la anti-angiogénesis o vascularización/neovascularización o

casos de inhibición o reducción mencionados anteriormente (i) a (vii) es relevante, por ejemplo para la profilaxis o tratamiento de cáncer renal tal como carcinoma de célula renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, particularmente glioblastoma, cáncer de ovario, mieloma múltiple, linfoma, enfermedades inflamatorias tales como por ejemplo artritis reumatoide, reparación de heridas para reducir la formación de cicatrices (especialmente en órganos tales como el hígado o corazón después de lesión aguda o crónica o en la piel), malformaciones vasculares, neoplasmas vasculares o vasoproliferativos, tumores de células endoteliales, tales como hemangiomas (especialmente en hígado, cerebro y/o corazón), enfermedades relacionadas con los ojos tales como retinopatía (diabética), degeneración macular, inflamación ocular, enfermedades cardiovasculares, particularmente alta presión sanguínea, estenosis o restenosis de vasos sanguíneos, por ejemplo provocadas por arteriosclerosis, particularmente aterosclerosis, por ejemplo después de una lesión y/o en el contexto de angioplastia o implantación de estent. Además, el inhibidor de la angiogénesis de la presente invención puede usarse como agente anti-obesidad, ya que se sabe que los vasos sanguíneos en el tejido adiposo nunca maduran totalmente, y se destruyen por tanto mediante los inhibidores de la angiogénesis (D. Bruemmer, Targeting Angiogenesis as Treatment for Obesity; Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 32(2), 161-162, 2012). Además, el inhibidor de la angiogénesis de la presente invención puede usarse como una sustancia activa para tratar la endometriosis, debido a la unión entre la anti-angiogénesis y un efecto positivo contra la endometriosis.

Además, el compuesto de fórmula 1 (4-OHT) es altamente útil en el tratamiento de tumores tales como carcinomas de células renales, que a menudo están desarrollando resistencia al tratamiento anti-cancerígeno inicial, necesitando por consiguiente una terapia de segunda línea que usa por ejemplo inhibidores mTOR o TKI de 2ª generación. Así que, el compuesto de la presente invención proporciona una alternativa a la terapia anti-cancerígena clásica después de la formación de resistencia.

Además, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula 1 (4-OHT) o sus sales o ésteres, y una sustancia activa seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra VEGF, VEGFR o híbridos de VEGFR/VEGFR soluble, e inhibidores de tirosina quinasa (TKI). "Combinación" significa una combinación fija en una composición normal o forma de dosificación normal, o una combinación separada aunque asociada, por ejemplo, por medio de composiciones administradas de forma simultánea o secuencial, que contienen respectivamente el compuesto de fórmula 1 y el anticuerpo especificado o TKI. Los ejemplos preferidos de dichos anticuerpos incluyen el anticuerpo monoclonal contra VEGF bevacizumab (Avastin), y los ejemplos preferidos de TKI incluyen sunitinib, dovitinib (TKI 258), imatinib, sorafenib y los TKI presentados adicionalmente por Mukherji et al. (2013) y Heidegger et al. (2013) citados anteriormente.

Además, el compuesto de fórmula 1 (4-OHT) es altamente útil para tratar la angiogénesis desencadenada por un tumor, particularmente un cáncer o metástasis del mismo, por ejemplo cáncer de mama o cáncer de próstata o una metástasis del mismo. Sorprendentemente y distinto de las anteriores investigaciones de compuestos relacionados para la inhibición del crecimiento celular de tumores relacionados con hormonas y formación de metástasis, en particular en relación con el cáncer de mama o cáncer de próstata (documentos WO 2007/131736, WO 2007/131737), se encontró por los inventores que el compuesto de la fórmula general 1 (4-OHT) como se define anteriormente inhibe la proliferación y/o migración de células endoteliales humanas y/o células de músculo liso. Además, se encontró sorprendentemente que el compuesto de fórmula general 1 (4-OHT) como se define anteriormente reduce la expresión de VEGF y VEGFR en un medio inflamado y/o canceroso. Por ejemplo en caso de tratamientos anti-cancerígenos, y de nuevo independiente y distinto de los tratamientos que implican la inhibición de crecimiento celular tumoral relacionado con hormonas y formación de metástasis, como era el caso por ejemplo en relación con cáncer de mama o cáncer de próstata (documentos WO 2007/131736, WO 2007/131737), los descubrimientos de la presente invención permiten hacer uso del tratamiento anti-angiogénesis en los correspondientes nuevos contextos clínicos. Por ejemplo, a diferencia de una destrucción directa de células y tejidos diana cancerígenos, la inhibición de la angiogénesis según la presente invención permite inhibir de forma efectiva el crecimiento tumoral adicional y la vascularización tumoral a través de la anti-angiogénesis y/o a través de la inhibición o reducción de efectos (i) a (vii) especificados anteriormente. De esta forma, los medios por los que los tumores pueden nutrirse y por consiguiente por los que la metástasis puede interrumpirse, lo que eventualmente llevará a la inanición del tumor y por consiguiente a la actividad anti-tumoral indirecta. Por ejemplo, los tratamientos de dichos cánceres relacionados con hormonas y metástasis, tales como cáncer de mama o cáncer de próstata, pueden efectuarse con la inhibición de la angiogénesis desencadenada por dicho tumor.

Además, distinto de los meros efectos anabólicos generales tales como la estabilización de colágeno y opcionalmente otras proteínas de soporte y por consiguiente considerando la estabilización del tejido de soporte y tratamientos relacionados como infarto de miocardio e infarto cerebral, arteriosclerosis, incontinencia urinaria, y similares (documento WO2009/062683), de nuevo los descubrimientos de la presente invención permiten hacer uso del tratamiento anti-angiogénesis en los correspondientes nuevos contextos clínicos.

Generalmente con respecto a las aplicaciones terapéuticas, los nuevos contextos clínicos se caracterizan por diferencias con respecto a, por ejemplo, grupo de pacientes, elección del tiempo (por ejemplo, decisiones de cuando y donde comenzar el tratamiento), dosis y combinación con otros tratamientos.

Sin estar atados con ninguna teoría, se asume que es debido a un descenso de por ejemplo VEGF y/o VEGFR y/u otros factores de crecimiento o receptores de factor de crecimiento relevantes para la proliferación, cáncer y/o



inflamación, por ejemplo en células del tejido inflamado y/o canceroso mencionado anteriormente, por ejemplo cualquier célula epitelial que forma el órgano mencionado anteriormente y/o el tumor mencionado anteriormente o en células del estroma, teniendo por consiguiente de forma indirecta un efecto anti-angiogénico en las células vasculares, o debido a un descenso de VEGF y/o VEGFR y/u otros factores de crecimiento o receptores de factor de crecimiento relevantes para la proliferación, cáncer y/o inflamación en las células endoteliales y/o musculares lisas *per se*. Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de enfermedades que implican una proliferación y/o migración indeseada de las células endoteliales y/o musculares lisas, por ejemplo, para las enfermedades mencionadas anteriormente.

En base a estos sorprendentes descubrimientos de la presente invención, el compuesto de fórmula I (4-OHT) convincentemente es útil en contextos clínicos terapéuticos donde están implicados factores de crecimiento funcionalmente relacionados, especialmente el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 13 (FGFR 13), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)  $\alpha$  y/o  $\beta$ , y el receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (SCFR; también conocido como c-kit o kit tirosina proteína quinasa o CD117).

Este efecto inhibitor puede explotarse en varios aspectos:

1. la neovascularización desencadenada por un tumor puede inhibirse de forma efectiva;
2. la neovascularización en el tejido inflamado puede inhibirse;
3. la proliferación anormal de células endoteliales y/o musculares lisas *per se* puede inhibirse, ya que esta puede ser la alteración patológica en tumores de células endoteliales o malformaciones vasculares.

En el uso, los compuestos mencionados anteriormente pueden administrarse al paciente en una cantidad adecuada para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales y/o musculares lisas. Además, el uso puede determinarse mediante una condición de aplicación apropiada, tal como tipo de paciente o tipo de sitio u órgano diana o composición o formulación farmacéutica que es capaz de transportar las actividades mencionadas anteriormente *in vivo* al sitio u órgano diana final designado en un paciente.

Además, el compuesto mencionado anteriormente puede administrarse de forma tópica y/o por aplicación a la mucosa, por ejemplo, en forma de una pomada, una crema, una loción, un gel, un pulverizador, un polvo, un aceite o un apósito transdérmico, que comprende también formas de uso de depósito (que incluyen gránulos); puede administrarse de forma parenteral, por ejemplo, de forma intramuscular, o por inyección intravenosa o subcutánea o por infusión, o intranasal, instilación en cavidades (por ejemplo, vejiga, abdomen, intestino) y/o de forma oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos con azúcar o película, disoluciones o suspensiones líquidas o de forma rectal, por ejemplo en forma de supositorios, o de forma intraocular, por ejemplo en forma de inyección y como gotas oculares.

La cantidad aplicada para inhibir la proliferación y/o migración de células endoteliales y/o musculares lisas puede elegirse de forma adecuada por ejemplo dependiendo de la edad, peso, condiciones del usuario y forma de administración; por ejemplo la dosis adoptada para la administración oral a seres humanos adultos puede oscilar de aproximadamente 1 a aproximadamente 150-1000 mg por aplicación, de 1 a 5 veces diarias.

Por consiguiente, dichos compuestos pueden estar comprendidos en composiciones farmacéuticas que comprenden adicionalmente un vehículo y/o excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para el uso tópico, la composición puede estar formulada incluyendo, por ejemplo, aceites y grasas vegetales tales como aceite de almendra, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de hueso de melocotón, aceite de ricino; extractos de plantas; aceites etéreos; además ceras vegetales y aceites sintéticos y animales; grasas y ceras tales como ácido esteárico y ésteres de estearato, ácido láurico y ésteres láuricos, ésteres de sorbitano, alcoholes de cetearilo; lecitina, alcoholes de lanolina, caroteno, fragancias, alcoholes mono- o polihídricos, urea, tensioactivos tales como poloxámeros, Tweens y similares; conservantes y colorantes etc. Se prefiere la formulación como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite.

Las formas orales sólidas pueden contener por ejemplo, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio, y/o polietilenglicoles, poloxámeros, succinato de tocoferil-poliethylenglicol (TPGS); agentes de unión, por ejemplo almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, un almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; tintes, edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Estos preparados pueden fabricarse de forma conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulado, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con película. Las dispersiones líquidas para el uso oral pueden ser por ejemplo, jarabes, emulsiones y suspensiones.

Los jarabes pueden contener como vehículo, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

Las suspensiones y las emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o poli(alcohol de vinilo), poloxámeros o TPGS.

5 Las suspensiones o disoluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo, propilenglicol, y si se desea, una cantidad adecuada de hidrocloreuro de lidocaína. Las disoluciones para inyecciones o infusiones intravenosas o subcutáneas pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o preferiblemente pueden estar en forma de soluciones salinas estériles, acuosas, isotónicas.

10 Los supositorios pueden contener junto con el compuesto activo un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, un tensioactivo de éster de ácido graso de polioxietilensorbinato o lecitina.

El contenido de compuesto activo de una composición adecuada puede ser al menos 0,0001% en peso, por ejemplo entre 0,0001 y 20% en peso, preferiblemente 0,6% hasta 10% en peso, más preferiblemente 1 y 5% en peso, del compuesto usado según la invención.

15 Si las sustancias se mezclan para promover la penetración en la piel, su contenido, cuando se usan hialuronidasas, puede ser de, por ejemplo, entre 0,01 y 1% en peso, preferiblemente 0,05 y 0,2% en peso, cuando se usa dimetilisorbida o DMSO entre 1 y 25% en peso, preferiblemente 5 y 10% en peso, poloxámeros al 0,5-30%, TPGS al 0,5-30%.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante la descripción de los siguientes ejemplos, que son sin embargo solo para propósitos ilustrativos.

#### 20 Preparación y tratamiento de células endoteliales de la vena umbilical humana

25 Todos los experimentos descritos en los siguientes capítulos se realizaron al menos por triplicado, principalmente usando 2 números celulares diferentes y varios tiempos de incubación. Todos los experimentos se realizaron adicionalmente en varias réplicas (un HUVEC en diferentes pasos además de diferentes preparados). Brevemente, las células endoteliales de la vena umbilical humana (en adelante HUVEC) se aislaron recientemente de los cordones umbilicales humanos por métodos conocidos en la técnica y se usaron en los experimentos del paso p4 hasta el paso p10 para evitar que ningún artefacto se origine a partir de cambios *in vitro* de las células.

30 En todos los experimentos, el compuesto esteroideo C-19 4-OHT se añadió a las células en la concentración indicada en medio EGM-2 (Lonza) para evitar que ningún artefacto se origine a partir de factores exógenos contenidos en el medio. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces y mostraron el mismo patrón de respuesta.

35 La identidad, diferenciación y estabilidad a largo plazo de la expresión génica de células HUVEC cultivadas se evaluó usando tinción inmunocitoquímica con anticuerpo de Factor anti-von Willebrand (vWF). La expresión de vWF es altamente específica para las células endoteliales. La estabilidad de la expresión de vWF se cuantificó entre el paso 1 y 10. En este horario solo se dan cambios menores en el periodo de cultivo y entre las diferentes cargas usadas.

#### Ejemplo 1: Inhibición de la proliferación de células endoteliales

Como un método para determinar la proliferación celular de células endoteliales de mamíferos, los ensayos de proliferación se realizaron como se describe a continuación.

40 Para determinar las velocidades de proliferación, se realizaron ensayos WST-1. Esencialmente, 1000 células HUVEC/pocillo se sembraron en un plato de 96 pocillos y se expusieron a las concentraciones indicadas de 4-OHT (también indicado por el código de laboratorio CR 1447) durante 5 días. La inhibición de la proliferación se cuantificó midiendo la escisión enzimática de la sal de tetrazolio de WST-1 a formazano mediante las deshidrogenasas mitocondriales celulares como una lectura para la viabilidad celular, en donde la viabilidad celular de las células tratadas se expresa como el porcentaje (%) de controles no tratados que contienen solo el disolvente en concentraciones apropiadas. Las medias de 3 experimentos independientes realizados por triplicado se muestran en la Fig. 1A.

50 Como se muestra en la Fig. 1A, la inhibición del crecimiento mediante 4-hidroxitestosterona en todas las concentraciones de 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$  se mostró que era significativamente alta ( $p < 0,001$ ) en los 3 cultivos celulares HUVEC (ensayo t), comparable con el inhibidor de VEGF conocido TKI258 (Dovitinib) (0,2, 0,4 y 1,0  $\mu\text{M}$ ). Las células se cultivaron y subcultivaron en medio de crecimiento de células endoteliales (EGM) durante 3 y 5 días, respectivamente. Como se muestra adicionalmente en la Fig. 1B, la inhibición del crecimiento de CR 1447 en combinación con TKI 258 (en comparación con cada compuesto solo) también es altamente significativa ( $p < 0,001$ ) en los 3 cultivos celulares HUVEC (ensayo t).

#### Ejemplo 2: Inhibición de la migración de células endoteliales usando el ensayo de migración de transwell

Un pre-requisito de la angiogénesis es la capacidad de las células endoteliales para migrar en el tejido. Este proceso se observa en la curación de heridas y también en el proceso de crecimiento tumoral. Las células endoteliales migran en el tejido junto a un gradiente de factores tales como VEGF. Este comportamiento puede estudiarse en un modelo *in vitro* de migración usando un sistema transwell, como por ejemplo es evidente a partir de la Fig. 2A. Específicamente, la Fig. 2A muestra la disposición típica de un ensayo transwell para monitorizar la migración celular.

Para estudiar la migración de células HUVEC usando el sistema transwell con membranas PET que tienen un tamaño de por de 3  $\mu\text{m}$  (24 pocillos sin recubrimiento de fibronectina), las células HUVEC en diferentes números celulares se colocaron en el compartimiento superior, mientras el atrayente se colocó en el compartimiento inferior. El número de células en el sitio del atrayente de la membrana se comparó con el número de células visibles en un sistema de control (control tampón) y con el atrayente (VEGF) en presencia de 4-OHT.

La Fig. 2B muestra una imagen típica de tres experimentos independientes, específicamente mediante un ensayo transwell que usan membranas de bloque FI y tinción de propidio-yoduro de las HUVEC migradas. Las células se sembraron como se describe y la migración se realizó durante 48 horas usando VEGF como atrayente en la cámara inferior. Las figuras representan ejemplos de 3 experimentos independientes. Se comparó con el control (Co). Como puede verse, 4-OHT inhibe significativamente la migración de células en la membrana, indicado por el número de células migrantes extraordinariamente reducido en las muestras sometidas a tratamiento mediante 4-OHT (código "CR").

Ejemplo 3: Inhibición de la migración de células endoteliales usando el ensayo de curado de heridas

Otro método para estudiar la migración celular es el ensayo de curado de heridas (rasguño). Este ensayo se parece a los eventos que se dan en un proceso de curado de heridas agudas. Mediante la liberación de factores desde el área herida las células endoteliales migran al área del rasguño, que se parecerá al proceso de curado y cierre de la herida por vascularización y más tarde formación de cicatriz. En resumen, las células HUVEC se sembraron en un plato de 12 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se hizo un rasguño, eliminando así las células en el área del rasguño. Las células se expusieron a 10  $\mu\text{M}$  de 4-OHT y la migración de células endoteliales al área del rasguño se monitorizó microscópicamente usando un programa de 2 hasta 48 horas, dependiendo del diseño experimental individual.

Se muestra una imagen típica de tres experimentos independientes en la Fig. 3 que representa los resultados típicos de 10 experimentos independientes que usan diferentes concentraciones y horarios. Como se muestra, la migración de células endoteliales se inhibe de forma efectiva mediante 4-OHT como se demuestra en el ensayo de curado de heridas (ensayo de rasguño). Después de 24 h una clara reducción de la migración de células HUVEC en el área de rasguño en comparación con las células de control no tratadas se ve bajo la influencia de 4-OHT (CR 1447).

Ejemplo 4: Ensayo de migración en tubo

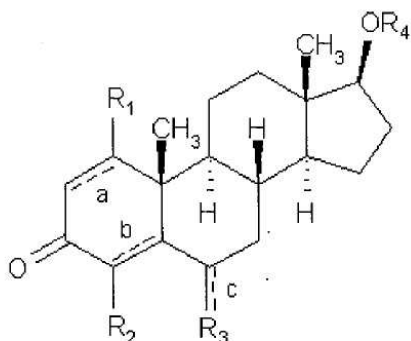
Después de la migración en el tejido de un rasguño, las células HUVEC cambian sus características de crecimiento y forman microvasos. Este efecto puede evaluarse microscópicamente.

Las células HUVEC se sembraron en matrigel (7 mg/ml). Las suspensiones celulares además de los geles que contenían 10  $\mu\text{M/L}$  de 4-OHT se añadieron tras el sembrado. Se dejó que se formaran puntos de ramificación durante la adherencia en esta superficie que imita el carácter de la membrana basal. La formación del tubo se analizó microscópicamente después de 12 y 48 horas.

Se muestra una imagen típica de tres experimentos independientes en la Fig. 4. Por consiguiente, la formación del tubo de células endoteliales humanas (HUVEC) se inhibe significativamente mediante la aplicación de 4-OHT (muestras especificadas "CR" en la fila inferior). Cuando las células endoteliales humanas se sometieron a tapones de matrigel, los puntos de ramificación como un marcador de la formación del tubo se inhiben mediante 4-OHT en comparación con los controles no tratados (flechas rojas). Por tanto, el 4-OHT inhibió notablemente la ramificación de las células e interrumpió masivamente las conexiones célula-célula lineares en el gel, indicando la notable inhibición de la (neo)vascularización.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto definido por la fórmula 1



Fórmula 1

5 En donde a, b y c respectivamente indican, independientemente unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es un doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

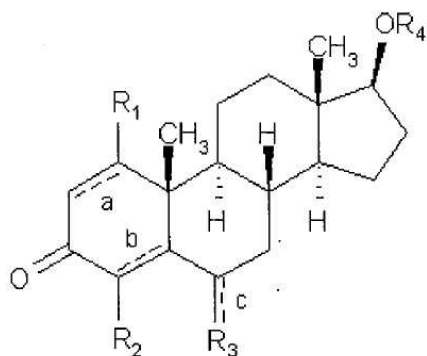
R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

10 R<sub>3</sub> es, en el caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es lo mismo que se define antes;

15 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización biológica o desprotección química, particularmente un éster, éter, acetal, carbonato, carbamato, fosfato, fosfonato, cetil, sulfato o sulfonato; y sales de los mismos,

Para usar en un tratamiento médico como inhibidor de la angiogénesis, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

2. El compuesto definido por la fórmula 1



Fórmula 1

20 En donde a, b y c respectivamente indican, independientemente unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es un doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

R<sub>3</sub> es, en caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es lo mismo que se define anteriormente;

5 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente, no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización metabólica o desprotección química, particularmente un éster, éter, acetal, carbonato, carbamato, fosfato, fosfonato, cetal, sulfato o sulfonato, y sales de los mismos,

10 Para usar según la reivindicación 1 en la terapia de inflamación y/o cáncer mediante la inhibición de la proliferación o síntesis de, o bien solo o en combinación: proliferación de células endoteliales, proliferación de células musculares lisas, migración de células endoteliales, proliferación de células musculares lisas, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 13, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$  y/o  $\beta$ , y receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre,

En donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

15 3. El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar como un inhibidor de la neovascularización en un proceso patológico que implica procesos regenerativos.

4. El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para evitar o inhibir la vascularización en un proceso inflamatorio, particularmente en donde el proceso inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en artritis, enfermedades inflamatorias del intestino, eczema y neurodermatitis.

20 5. El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para evitar o inhibir la vascularización desencadenada por un tumor, particularmente está desencadenada por cáncer de mama o por cáncer de próstata.

25 6. El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5 en una profilaxis o tratamiento de un tumor sólido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y linfoma, y metástasis de los mismos; o en una profilaxis o tratamiento de un tumor no sólido, preferiblemente mieloma múltiple o metástasis del mismo.

7. El compuesto para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en una profilaxis o tratamiento de una enfermedad o proceso seleccionado de:

- Neoplasmas vasculares o vasoproliferativos, preferiblemente un tumor de células endoteliales y particularmente hemangioma,
- 30 • Enfermedades relacionadas con los ojos, particularmente en donde la enfermedad relacionada con los ojos se selecciona del grupo que consiste en retinopatía, degeneración macular, inflamación ocular, vascularización de la córnea, inyección vascular en el cuerpo vítreo, y vascularización de la lente ocular,
- Reparación de heridas, o para la transformación de tejido funcional regular en tejido blando, en particular para reducir la formación de cicatriz más allá del límite,
- 35 • Malformaciones vasculares, en particular contra el hemangioma en la piel u órganos sólidos,
- Enfermedades cardiovasculares, particularmente hipertensión, estenosis o restenosis de vasos sanguíneos, arteriosclerosis
- Obesidad,
- Endometriosis.

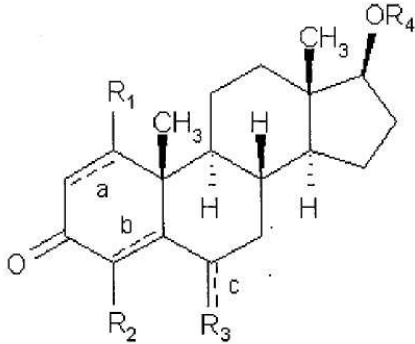
40 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para usar en un tratamiento médico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

45 9. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica se prepara para administración dérmica, mucosa, submucosa, transdérmica, i.m., i.v., s.c., intradérmica, oral, nasal, intraocular o en supositorios o instilación en cavidades.

10. Una combinación que comprende:

(i) una sustancia activa seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra VEGF, VEGFR o híbridos VEGFR/VEGFR soluble, e inhibidores de tirosina quinasa, y

50 (ii) un compuesto definido por la fórmula 1



Fórmula 1

En donde a, b y c respectivamente indican, independientemente los unos de los otros, un enlace sencillo o un doble enlace, con la condición de que al menos uno de a, b y c representa un doble enlace, y con la condición de que si a es un enlace sencillo y b es un doble enlace, R<sub>2</sub> no es H;

5 R<sub>1</sub> es o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>;

R<sub>2</sub> es o bien OR<sub>5</sub> o hidrógeno, en donde R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>;

R<sub>3</sub> es, en caso de que c sea un enlace sencillo, o bien hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, o en caso de que c sea un doble enlace, CHR<sub>5</sub>, en donde R<sub>5</sub> es lo mismo que se define antes;

10 R<sub>4</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo no sustituido o sustituido por un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub> o acilo COR<sub>6</sub>; siendo R<sub>6</sub> hidrógeno, alquilo de cadena lineal o ramificada C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, fenilo o benzoilo, respectivamente, no sustituido o sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>12</sub>, o cualquier grupo que lleve a hidroxilo tras la metabolización biológica o desprotección química, en donde dicho compuesto es 4-hidroxitestosterona o sus sales o ésteres.

11. Una combinación según la reivindicación 10 para usar en un tratamiento médico como se define en las reivindicaciones anteriores.

Fig. 1A

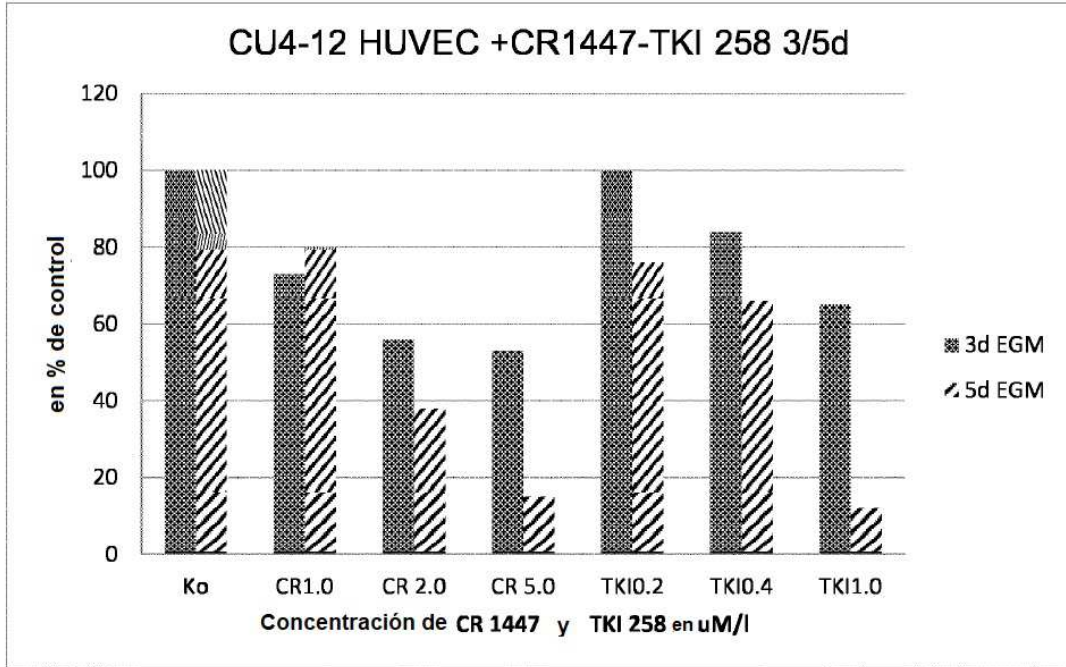


Fig. 1B

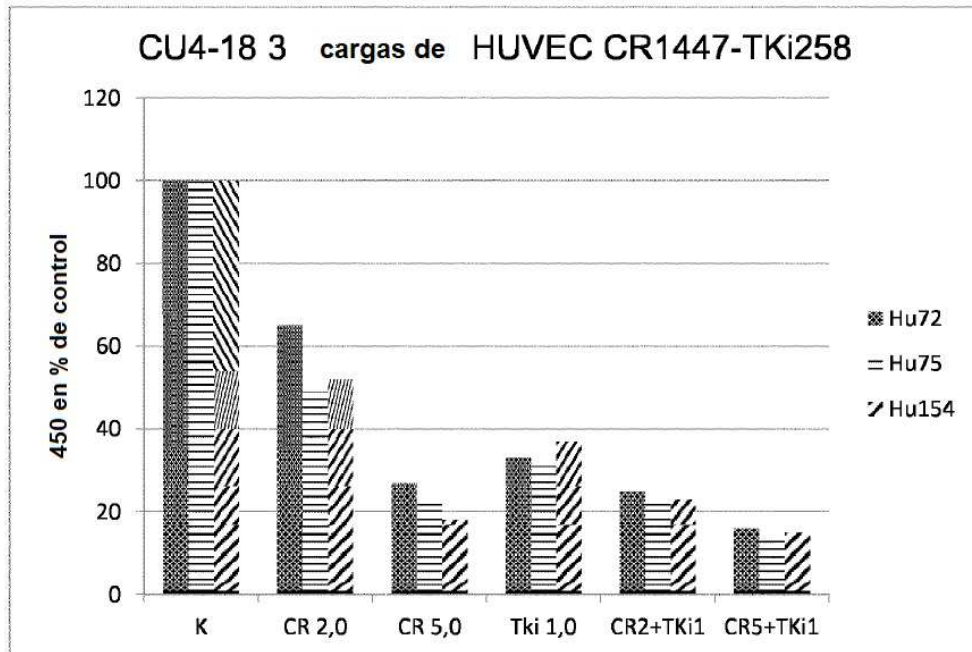


Fig. 2A

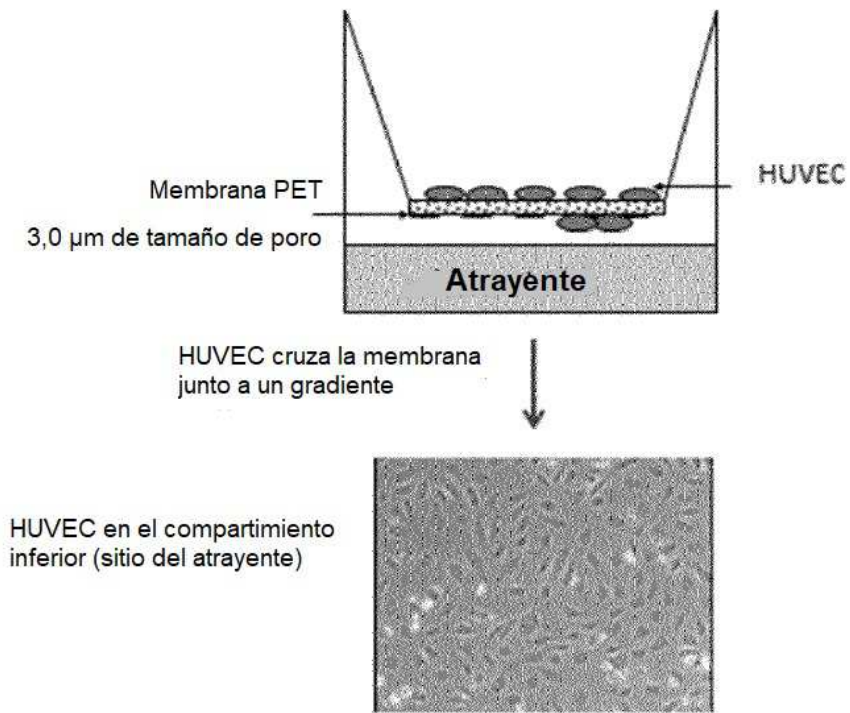




Fig. 2B

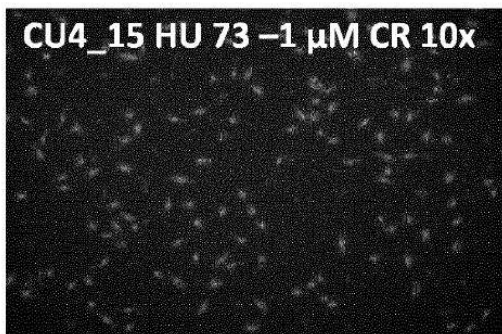
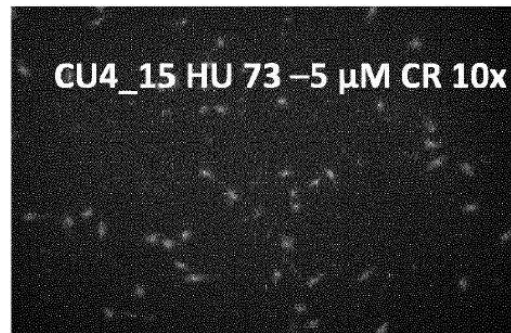
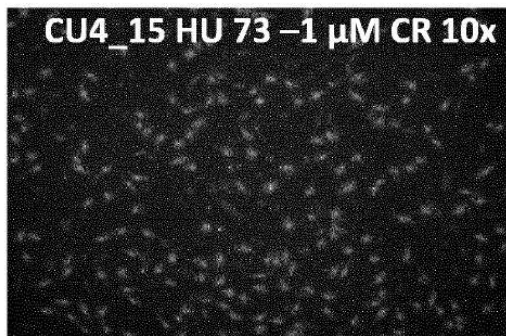
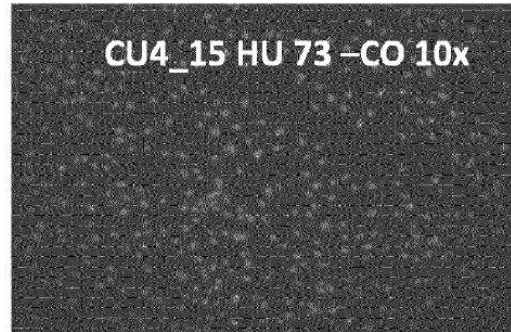
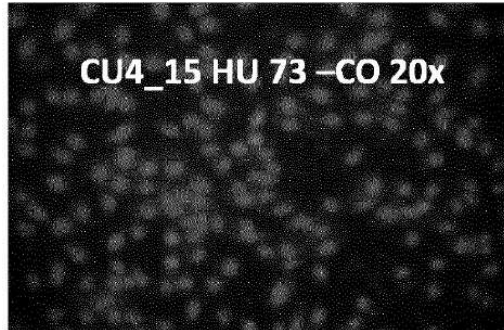


Fig 3

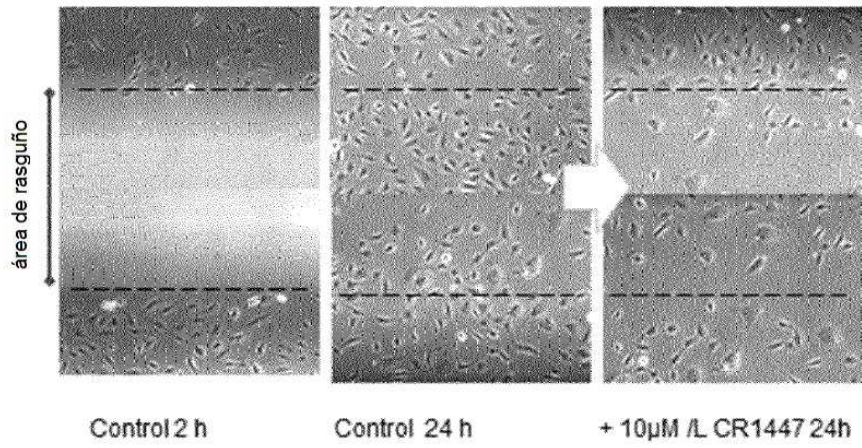


Fig 4

