

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 314**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/KR2012/010630**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13085340**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12854573 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2789337**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende derivados de piridinol bicíclicos para prevenir o tratar enfermedades causadas por la angiogénesis**

30 Prioridad:

08.12.2011 KR 20110131290

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2018

73 Titular/es:

**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION
FOUNDATION YEUNGNAM UNIVERSITY (100.0%)
214-1 Dae-dong Gyeongsan-si
Gyeongsangbuk-do 712-160, KR**

72 Inventor/es:

**JEONG, BYEONG-SEON;
KIM, JUNG-AE;
KANG, YOU RA;
NAM, TAE-GYU;
KU, JIN-MO y
PORTER, NED A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 683 314 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

Composición farmacéutica que comprende derivados de piridinol bicíclicos para prevenir o tratar enfermedades causadas por la angiogénesis

[Campo técnico]

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de piridinol para prevenir o tratar enfermedades causadas por la angiogénesis como se define en la reivindicación 1.

[Técnica anterior]

- 10 La angiogénesis es un procedimiento de formación de vasos sanguíneos capilares nuevos a partir de microvasos preexistentes. La angiogénesis se produce normalmente durante el desarrollo embrionario, regeneración tisular, cicatrización de heridas y desarrollo de cuerpo lúteo que es un cambio cíclico en el sistema reproductivo femenino; en cualquier caso, la angiogénesis está estrictamente regulada para progresar (Folkman J y col., Int. Rev. Exp. Pathol., 16, págs. 207-248, 1976).

- 15 Las células endoteliales vasculares crecen lentamente y no se dividen relativamente bien en comparación con otros tipos de células en el cuerpo adulto. La angiogénesis es un proceso que generalmente incluye la degradación de una membrana basal vascular mediante proteasas liberadas por estímulos de factores proangiogénicos; migración y proliferación de células endoteliales vasculares; formación tubular debido a la diferenciación de células endoteliales vasculares; reconstrucción de vasos sanguíneos; y generación de nuevos vasos sanguíneos capilares.

- 20 Sin embargo, son enfermedades inducidas por la angiogénesis que no se regulan de forma autónoma sino que crecen de forma mórbida. Tales enfermedades asociadas con la angiogénesis que aparecen en afecciones patológicas incluyen hemangioma, angiofibroma, malformación vascular y enfermedades cardiovasculares, tales como arteriosclerosis, adhesión vascular y escleredema. Enfermedades oculares asociadas con la angiogénesis incluyen angiogénesis de injerto corneal, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, enfermedades corneales inducidas por nuevos vasos sanguíneos, degeneración macular, pterigión, degeneración retinal, fibroplasia retrolental, conjuntivitis granular y similares. Además, las enfermedades relacionadas con la angiogénesis pueden
- 25 incluir enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis, enfermedades cutáneas tales como psoriasis, capilarectasia, granuloma piogénico, dermatitis seborreica, acné, enfermedad de Alzheimer y obesidad. El crecimiento tumoral y metástasis son necesariamente dependientes de la angiogénesis (D'Amato RJ y col., Ophthalmology, 102(9), págs. 1261-1262, 1995; Arbiser JL, J. Am. Acad. Dermatol., 34(3), págs. 486-497, 1996; O'Brien KD y col. Circulation, 93(4), págs. 672-682, 1996; Hanahan D y col., Cell, 86, págs. 353-364, 1996).

- 30 Especialmente, la angiogénesis juega un papel importante en el crecimiento y metástasis de células cancerígenas. El tumor es suministrado con nutrición y oxígeno necesarios para el crecimiento y proliferación a través de nuevos vasos sanguíneos y los nuevos vasos sanguíneos que se infiltran en el tumor permiten que las células cancerígenas se metastaticen para entrar en el sistema de circulación sanguíneos y, de este modo, apoyen la metástasis de las células cancerígenas (Folkman and Tyler, Cancer Invasion and Metastasis, Biologic Mechanisms and Therapy (S.B. Day ed.) Raven Press, Nueva York, págs. 94-103, 1977; Polverini PJ, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 6(3), págs. 230-247, 1995). La causa principal de muerte en pacientes con cáncer es la metástasis y las razones por las que las quimioterapias e inmunoterapias que se usan clínicamente en la actualidad no contribuyen en un aumento en la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer se dirige a la metástasis del cáncer.

- 40 La artritis, una enfermedad típica en las enfermedades inflamatorias, se inicia como un trastorno autoinmune. Junto con el progreso de la enfermedad, se produce la inflamación crónica de la cavidad sinovial entre las articulaciones que induce que la angiogénesis destruya el cartílago. Es decir, las proliferaciones de células sinoviales y células endoteliales vasculares en la cavidad sinovial se activan por las citocinas que inducen inflamaciones, dando como resultado el desarrollo de la angiogénesis. Finalmente, el cartílago articular que juega un papel de almohadilla se destruye mediante pannus articular como una capa de tejido conectivo formada en una parte cartilaginosa (Koch AE y col., Arthritis. Rheum., 29, págs. 471-479, 1986; Stupack DG y col., Braz J. Med. Biol. Res., 32(5), págs. 578-581, 1999; Koch AE, Arthritis. Rheum., 41(6), págs. 951-962, 1998).

- 50 Muchas enfermedades oculares, a partir de las cuales millones de personas están perdiendo su visión en todo el mundo cada año, resultan principalmente de la angiogénesis (Jeffrey MI y col., J. Clin. Invest., 103, págs. 1231-1236, 1999). Enfermedades típicas que resultan de la angiogénesis incluyen degeneración macular, retinopatía diabética y similares que se producen comúnmente en la edad avanzada, retinopatía del bebé prematuro, glaucoma neovascular, enfermedades corneales inducidas por nuevos vasos sanguíneos y similares (Adamis AP y col., Angiogenesis, 3, págs. 9-14, 1999). Entre ellos, la retinopatía diabética es una de las complicaciones diabéticas y una enfermedad que los capilares retinales invaden el cuerpo vítreo hasta quedarse ciego.

- 55 La psoriasis caracterizada por puntos rojos y piel escamosa es una enfermedad proliferativa crónica que aparece en la piel y va acompañada de dolor y malformación. Normalmente, los queratinocitos se proliferan una vez al mes, sin embargo, en un paciente con psoriasis, los queratinocitos se proliferan al menos una vez a la semana. Por tal rápida proliferación, se requiere una gran cantidad de sangre, resultando en angiogénesis activa (Folkman J, J. Invest.

Dermatol., 59, págs. 40-48, 1972).

5 Puesto que es posible aplicar inhibidores de la angiogénesis a agentes para tratar diversas enfermedades asociadas con la angiogénesis, en los últimos años, se han llevado a cabo activamente una variedad de estudios destinados a tratar tales enfermedades inhibiendo la angiogénesis. Puesto que tales inhibidores de la angiogénesis deben administrarse a pacientes durante un largo período, el inhibidor más ideal es uno que debe tener una baja toxicidad y puede administrarse oralmente. Por consiguiente, ha existido una petición del desarrollo de fármacos que tengan una baja toxicidad como inhibidores de la angiogénesis

10 M. Ushio-Fukai, Cardiovascular Research, vol. 71, n.º 2, 2006-07-15, indica que especies reactivas de oxígeno (EOR) activan el VEGF, que es un factor de la angiogénesis, mientras que la vitamina E (tocoferol), que es un antioxidante, reduce la expresión del VEGF e inhibe la angiogénesis.

[Divulgación]

[Problema técnico]

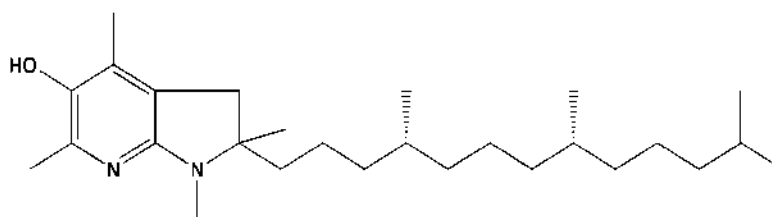
15 Por lo tanto, los inventores de la presente invención han confirmado que un derivado de piridinol bicíclico que tiene una estructura específica es altamente eficaz en la inhibición de la angiogénesis y, por lo tanto, completa la presente invención.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que tiene un derivado de piridinol bicíclico como un principio activo para evitar y tratar enfermedades causadas por la angiogénesis.

[Solución técnica]

20 La presente invención proporciona a una composición farmacéutica que contiene un derivado de piridinol expresado por la siguiente Fórmula Química 3 para prevenir o tratar enfermedades causadas por la angiogénesis como se define en la reivindicación 1:

[Fórmula Química 3]



[Efectos ventajosos]

25 Un derivado de piridinol bicíclico según la presente invención puede usarse eficazmente como fármaco para evitar y tratar enfermedades causadas por la angiogénesis puesto que inhibe la neovascularización inducida mediante un inductor de la angiogénesis tal como un factor del crecimiento endotelial vascular en un modelo de membrana corioalantoidea de gallina.

[Descripción de los dibujos]

30 La FIG. 1 ilustra fórmulas químicas de derivados de piridinol bicíclico según un ejemplo de la presente invención; La FIG. 2 es un valor de CI₅₀ obtenido mediante el tratamiento de un compuesto 12 con una CAM mediante concentraciones; La FIG: 3 ilustra un resultado de medición de un efecto inhibitorio del crecimiento inducido por el VEGF del compuesto 12 sobre células de HUVEC;

35 La FIG. 4 proporciona fotomicrografías tomados a una ampliación de 200 veces de una parte inferior de un filtro de policarbonato para evaluar un efecto inhibitorio de infiltración del compuesto 12 sobre células HUVEC; La FIG. 5 proporciona fotomicrografías tomadas a una ampliación de 400 veces de células para evaluar un efecto de barrido de EOR del compuesto 12;

40 La FIG. 6 ilustra un resultado de observación del efecto de barrido de EOR del compuesto 12 mediante el tratamiento de la línea celular (ARPE)-19 de epitelio pigmentario de la retina adulta con angiotensina II, que es un factor de riesgo de degeneración macular; La FIG. 7 ilustra un resultado de observación del efecto de barrido de EOR del compuesto 12 mediante el tratamiento de la línea celular (ARPE)-19 de epitelio pigmentario de la retina adulta con 4-hidroxinonal (4-HNE), que es un factor de riesgo de degeneración macular; y

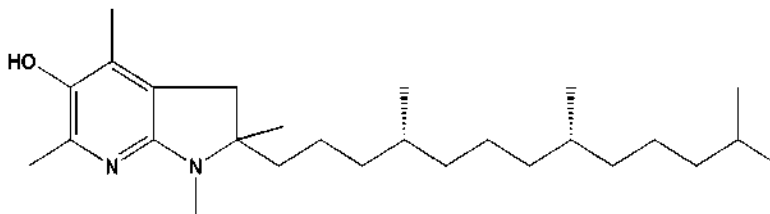
45 la FIG. 8 ilustra un resultado de observación de la angiogénesis causada por tumorigénesis mediante la inoculación de células cancerígenas pulmonares A549 a una CAM y un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral.

[Mejor modo]

Con el fin de conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona a una composición farmacéutica que contiene un derivado de piridinol expresado por la siguiente Fórmula Química 3 para prevenir o tratar enfermedades causadas por la angiogénesis:

5

[Fórmula Química 3]



10

15

Las enfermedades causadas por la angiogénesis se seleccionan entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, psoriasis, úlcera corneal, degeneración macular senil, retinopatía diabética, retinopatía de cuerpo vítreo proliferativa, retinopatía prematura, inflamación ocular, córnea cónica, síndrome de Sjogren, tumor de ojo miope, rechazo de injerto de córnea, cicatrización de herida anormal, enfermedad ósea, proteinuria, enfermedad de aneurisma aórtico abdominal, pérdida de cartilago regresiva debido a lesión articular traumática, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso, cirrosis hepática, enfermedad glomerular, ruptura prematura de la membrana embrionaria, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de membrana periodontal, arterioesclerosis, reestenosis, enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer y metástasis de infiltración de cáncer.

20

Un derivado de piridinol bicíclico de la presente invención puede usarse eficazmente como fármaco para evitar y tratar enfermedades causadas por la angiogénesis puesto que inhibe la angiogénesis inducida mediante un inductor de la angiogénesis tal como un factor del crecimiento endotelial vascular en un modelo de membrana corioalantoidea de gallina.

25

Las dosis y modos de aplicación de una composición farmacéutica que contiene un derivado de piridinol bicíclico de la presente invención pueden variar dependiendo de las formulaciones y las finalidades de uso de los mismos.

La composición farmacéutica que contiene un derivado de piridinol bicíclico de la presente invención puede contener un derivado de piridinol bicíclico en la cantidad del 0,1 al 50 % en peso con respecto al peso total de la composición.

Además, la composición farmacéutica que contiene el derivado de piridinol bicíclico de la presente invención puede contener adicionalmente vehículos adecuados, excipientes o diluyentes comúnmente usados en la preparación de composiciones farmacéuticas.

30

Ejemplos de vehículos, excipientes o diluyentes pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral.

35

La composición farmacéutica que contiene el derivado de piridinol bicíclico de la presente invención puede prepararse en formulaciones orales entre las que se incluyen polvos, granulados, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles y similares, agentes para aplicación externa, soluciones de inyección de supositorio y de esterilizante mediante respectivos procedimientos comúnmente usados.

En el caso de ser formulada, la composición farmacéutica se prepara usando diluyentes o excipientes tales como cargas, expansores, aglutinantes, humectantes, desintegrantes, tensioactivos, etc. Formas de dosificación sólida para la administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, granulados, cápsulas y similares. Tales dosificaciones sólidas se preparan mezclando el compuesto con al menos un excipiente, tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa y gelatina.

40

Además de excipientes simples, pueden usarse lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Formas de dosificación líquida para administración oral, tales como suspensiones, soluciones internas, emulsiones y jarabes, pueden contener diluyentes simples comúnmente usados, por ejemplo, agua y parafina líquida, así como diversos excipientes, por ejemplo, humectantes, edulcorantes, aromáticos, conservantes y similares. Formas de dosificación para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, agentes liofilizados, supositorios y similares. Los disolventes no acuosos y suspensiones pueden prepararse usando propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva o ésteres inyectables tales como oleato de etilo. Como bases para supositorios, pueden usarse witepsol, macrogol, Tween 61, aceite de cacao, laurino y glicerogelatina.

45

Las dosificaciones del derivado de piridinol bicíclico de la presente invención pueden variar dependiendo de la edad, sexo y peso de un paciente. De 0,001 a 100 mg/kg o preferentemente, 0,01 a 10 mg/kg del derivado de piridinol bicíclico pueden administrarse una vez o varias veces al día. Además, las dosificaciones del compuesto pueden aumentarse y disminuirse dependiendo de una vía de administración, gravedad de la enfermedad, sexo, peso, edad y similares. Por consiguiente, las dosificaciones no limitan el ámbito de la presente invención en ningún aspecto.

La composición farmacéutica puede administrarse a mamíferos tales como ratas, ratones, ganado y humanos a través de diversas vías. Por ejemplo, puede administrarse mediante cualquier tipo de procedimiento de administración tal como por vía oral, rectal o intravenosa, administraciones de inyección intramuscular, cutánea, intrauterina o intracerebrocentricular.

El derivado de piridinol bicíclico según la presente invención tiene un 50 % de letalidad (CL_{50}) de 2 g/kg o más con estabilidad asegurada y, por lo tanto, puede usarse en la composición farmacéutica de la presente invención.

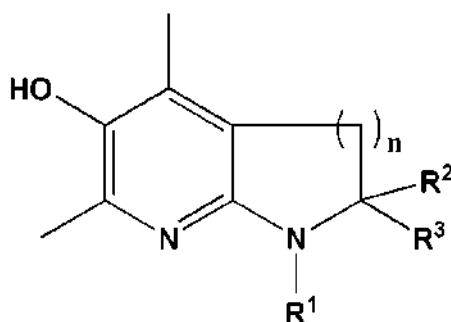
[Modo]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se explicará en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada a estos Ejemplos.

15 <Ejemplo 1> Síntesis de derivado de piridinol bicíclico

La siguiente Tabla 1 enumera y la FIG. 1 ilustra derivados de piridinol bicíclicos según un ejemplo y cada uno de los derivados de piridinol bicíclicos se prepararon sintetizando los compuestos mediante los procedimientos descritos en las referencias, respectivamente.

[Fórmula Química 1]



20

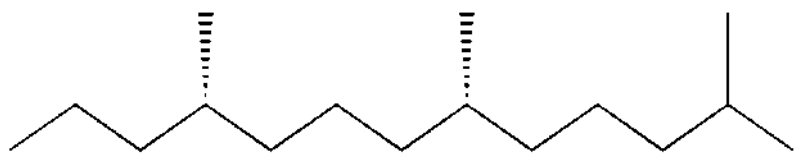
[Tabla 1]

Compuesto	N	R ¹	R ²	R ³	Referencia
1	2	H	H	H	Chem. Eur. J., 2010, 16, 14106-14114
2	2	Me	H	H	Chem. Eur. J., 2010, 16, 14106-14114
3	2	n-C ₁₆ H ₃₃	H	H	Chem. Eur. J., 2010, 16, 14106-14114
4	2	H	Me	Me	Synthesis, 2005, 1397-1404
5	2	Me	Me	Me	Synthesis, 2005, 1397-1404, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 10211-10219
6	2	Me	Me	n-Bu	J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 10211-10219
7	2	Me	H	Me	J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 10211-10219
8	2	Me	H	n-Bu	J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 10211-10219
9	2	Me	H	t-Bu	J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 10211-10219
10	1	Et	H	H	Org. Biomol. Chem., 2011, in press. DOI: 10.1039/clob05144j

(continuación)

Compuesto	N	R ¹	R ²	R ³	Referencia
11	1	Et	Me	CH ₂ OCOMe	Org. Biomol. Chem., 2011, in press. DOI: 10.1039/clob05144j
12	1	Me	Me	C16*	Org. Biomol. Chem., 2011,9, 1749-1755

Me representa metilo, Et representa etilo, Bu representa butilo y C16* representa



5 <Ejemplo experimental 1> Efectos inhibitorios de la angiogénesis mediante ensayo CAM

Para examinar los efectos inhibitorios de la angiogénesis *in vivo*, se llevó a cabo un ensayo de membrana corioalantoidea (CAM) (Nguyen M y col., *Microvascular Res.*, 47, págs. 31-40, 1994).

Se cultivaron huevos de gallina fertilizados manteniendo la temperatura a 37 °C y la humedad relativa al 55 %. El décimo día, se realizó un primer pequeño agujero en la región del saco de aire y el segundo agujero se perforó en la región plana del huevo, en la que se debió realizar una ventana, usando una aguja hipodérmica (Greencross Medical Science, Korea).

Cada huevo se desinfló mediante el primer agujero en la región del saco de aire de modo que la membrana corioalantoidea (CAM) se separó de la cáscara del huevo. Posteriormente, se realizó una ventana cortando esta región mediante el uso de una muela (Multipro 395JA, Dremel, México).

Después, se trató un disco de filtro de Whatman n.º 1 (Whatman Inc. EE.UU.) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y se secó. El disco de filtro se empapó con un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en una concentración de 20 ng/CAM.

El disco de filtro se colocó sobre los vasos a través de la ventana anteriormente hecha y un compuesto 12 de Ejemplo de disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) para tratar mediante concentraciones.

Después de 3 días del tratamiento de fármaco, las CAM, sobre las cuales se había colocado el disco de filtro, se separaron y lavaron con PBS para tomar imágenes usando un estereomicroscopio (Stemi SV6 stereomicroscope, Carl Zeiss, Alemania) y software Image-Pro Plus (Media Cybernetics; Silver Spring, MD, EE.UU.). Después, se contó el número de ramificaciones y se analizaron los datos del resultado.

Como resultado de los mismos, como se enumera en la siguiente Tabla 2, podría confirmarse que un aumento en la neovascularización inducida por el VEGF disminuyó de un modo dependiente de la concentración debido al tratamiento con el compuesto 12 según la presente invención. En particular, según la comparación con el efecto inhibitorio de la angiogénesis entre el compuesto 12 y SU4312, batimastat y α -tocoferol, el compuesto 12 tenía un efecto inhibitorio de la angiogénesis excelente capaz de inhibir la angiogénesis en una concentración inferior a los otros compuestos.

[Tabla 2]

Grupo experimental	Número de ramificaciones / Vaso principal	Tasa de inhibición (%)
PBS	14,4 ± 2,7	-
VEGF (20 ng/CAM)	52,2 ± 2,7	-
VEGF (20 ng/CAM) + SU4312 (1 µg/CAM, 378 µM)	24 ± 4,6 ^{n.º}	74,6 ± 12,1

(continuación)

Grupo experimental		Número de ramificaciones / Vaso principal	Tasa de inhibición (%)
	Batimastat (1 µg/CAM, 209 µM)	19,9 ± 2,87 ^{n.º}	78,4 ± 7,4
	α-tocoferol (3 ng/CAM, 0,7 µM)	32,3 ± 3,5	45,1 ± 9,3
	α-tocoferol (100 ng/CAM, 23 µM)	24,3 ± 2,7 ^{n.º}	64,4 ± 14,2
	Compuesto 12 (0,004 ng/CAM, 1 µM)	28 ± 4,7 ^{n.º}	64,0 ± 12,5
	Compuesto 12 (0,04 ng/CAM, 10 µM)	25,2 ± 2,4 ^{n.º}	71,4 ± 6,4

Además, Se obtuvo el Cl_{50} tratando el compuesto 12 con una CAM por concentraciones y el Cl_{50} fue de 0,7 nM (FIG. 2).

5 <Ejemplo experimental 2> Efecto inhibitorio de crecimiento inducido por VEGF en células HUVEC

Se cultivaron células HUVEC en un matraz recubierto con un 0,2 % de gelatina. Después, las células HUVEC se cultivaron en un medio basal de células endoteliales-2 (EBM-2, Clonetics, San Diego, CA). Este EBM-2 contenía suero bovino fetal (FBS), hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos (hFGF-B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento tipo insulina recombinante (R3-IGF-1), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), GA-1000 y heparina. Las células HUVEC se cultivaron durante 4 a 5 días y se inyectaron en una placa de 24 pocillos en una densidad de 5×10^4 células/pocillo y el medio de los respectivos pocillos se estableció a 1 ml. Para evaluar el efecto del compuesto 12 en células endoteliales inducidas por el VEGF, las células HUVEC se trataron con una mezcla del VEGF y el compuesto 12 y se cultivaron durante 24 horas y, a continuación, se añadieron a las mismas 100 µl de MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio; 5 g MTT/1 en H₂O) y a continuación se cultivaron adicionalmente durante 4 horas. Después, se añadieron 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a los respectivos pocillos que contenían las células correspondientes y se mezclaron con una pipeta para disolver los cristales de MTT reducidos. Las tasas de supervivencia celular relativa se midieron mediante escaneo con un lector de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA) que tiene un filtro de 540 nm. Como se ilustra en la FIG. 3, el compuesto 12 de la presente invención redujo el crecimiento celular inducido por VEGF de un modo dependiente de la concentración.

<Ejemplo experimental 3> Efecto inhibitorio de migración quimioestática en células HUVEC

Con el fin de examinar un efecto inhibitorio de migración quimioestática del compuesto de la presente invención, se llevó a cabo el siguiente experimento *in vitro* usando células HUVEC (Mi-Sung Kim y col., Cancer Research, 63, 5454-5461, 2003; Sang-Oh Yoon y col., The Journal of Biological Chemistry, 276, 20085-20092, 2001; Sonia Zorzet y col., The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 295, 927-933, 2000). Una placa de cultivo aplicada al mismo fue una placa de 24 pocillos (Corning Costar, Cambridge, MA) que incluía un filtro de policarbonato que tenía una pluralidad de poros de 8 mm de tamaño. La parte inferior del filtro de policarbonato se revistió con 20 µl de tipo I de colágeno en una concentración de 0,5 mg/ml y la parte superior del mismo se revistió con 20 µl de matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA) en una concentración de 1,5 mg/ml. En este caso, la región inferior del filtro de policarbonato se cargó con un medio que incluía un 2 % de FBS y las células HUVEC se inocularon en la región superior del filtro de policarbonato. En este caso, el compuesto 12 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) por concentraciones (1, 3, 10 µM). Las células HUVEC inoculadas como tal se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, las células que se infiltraron en la parte inferior del filtro de policarbonato se fijaron con metanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina. La FIG. 4 proporciona fotomicrografías tomados a una ampliación de 200 veces de una parte inferior del filtro de policarbonato para evaluar un efecto inhibitorio de infiltración del compuesto 12 sobre células HUVEC. En el presente documento, en el caso de un tratamiento con el compuesto 12 de la presente invención, podría observarse que las células cancerígenas que infiltraban la parte inferior del filtro de policarbonato disminuyeron notablemente en comparación con el grupo de control y, por lo tanto, podía observarse que el compuesto 12 de la presente invención redujo la infiltración de las células HUVEC de un modo dependiente de la concentración.

<Ejemplo experimental 4> Medición de efecto de barrido de especies reactivas de oxígeno (EOR) en células HUVEC

Con el fin de medir un efecto de barrido de EOR en células HUVEC inducidas mediante un VEGF, se usó diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF-DA). Cuando las EOR estaban presentes en células, el DCF-DA se oxidó a DCF fluorescente mostrando fluorescencia verde. Las células HUVEC se inyectaron a placas de 8 pocillas revestidas con un 0,2 % de gelatina en una densidad de 1×10^5 células/pocillo y a continuación se cultivaron durante 24 horas. Se llevó a cabo un pretratamiento al compuesto 12 durante 3 horas y se indujo mediante el VEGF durante 15 minutos y se lavó con PBS (pH 7,4) tres veces. Después, se colocaron 10 µM de DCF-DA en un EBM-2 y se usaron para tratar

en una sala oscura durante 30 minutos y a continuación se lavó de nuevo con el PBS tres veces. Se midió un grado de fluorescencia de las células usando un microscopio de fluorescencia. La FIG. 5 proporciona fotomicrografías tomadas a una ampliación de 400 veces de células para evaluar un efecto de barrido de EOR del compuesto 12 de la presente invención. En el presente documento, en el caso de un tratamiento con el compuesto 12 de la presente invención, podía observarse que un grado de fluorescencia de las células disminuyó notablemente en comparación con el VEGF. La FIG. 6 y FIG. 7 ilustran un resultado de observación del efecto de barrido de EOR del compuesto 12 mediante el tratamiento de la línea celular (ARPE)-19 de epitelio pigmentario de la retina adulta con 4-hidroxinonenal (4-HNE) o angiotensina II, que es un factor de riesgo de degeneración macular. Asimismo, podía observarse que un grado de fluorescencia de las células disminuyó notablemente en comparación con el grupo de control. El 4-hidroxinonenal (4-HNE) o la angiotensina II, que es un factor de riesgo de degeneración macular causaron daño celular por generación de EOR en células ARPE y causó daño a una membrana de Bruch y angiogénesis, resultando en degeneración macular y pérdida de visión. Basándose en el resultado del experimento anterior, el compuesto 12 inhibe en gran medida la generación de EOR de 4-hidroxinonenal (4-HNE) o angiotensina II y, de este modo, puede esperarse que sea eficaz en el tratamiento de degeneración macular.

15 **<Ejemplo experimental 5> Angiogénesis causada por tumorigénesis y efecto inhibitorio de crecimiento tumoral**

la FIG. 8 ilustra un resultado de observación de la angiogénesis causada por tumorigénesis mediante la inoculación de células cancerígenas pulmonares A549 a una CAM y un efecto inhibitorio de crecimiento tumoral. Se cultivaron huevos de gallina fertilizado y, el noveno día, se realizó una ventana del mismo modo y, en lugar de un disco, se mezclaron células cancerígenas con matrigel a una relación de 1:1 y se trataron con el compuesto 12 y se inocularon en una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/CAM. Después de 5 días de la inoculación, una parte de CAM, en la que se había formado un tumor, se separó y lavó con PBS para tomar imágenes usando un estereomicroscopio (Stemi SV6 stereomicroscope, Carl Zeiss, Alemania) y software Image-Pro Plus (Media Cybernetics; Silver Spring, MD, EE.UU.). Después, se contó el número de ramificaciones y se analizaron los datos del resultado. Como resultado de los mismos, el compuesto 12 de la presente invención inhibió angiogénesis causada por tumorigénesis y también inhibió el crecimiento tumoral en una concentración significativamente baja en comparación con α -tocoferol como el grupo de control.

20 **<Ejemplo experimental 6> Experimento de toxicidad**

El compuesto 12 se suspendió en una solución de metilcelulosa al 0,5 % y se administró por vía oral a ratones Balb/c macho con una única dosis de 0,5 g/kg, 1 g/kg y 2 g/kg. Después, la tasa de supervivencia y pesos de los ratones se revisaron durante 7 días.

Después de la administración, se observó si el animal estaba muerto o no, los síntomas clínicos, cambios en peso y se llevó a cabo un ensayo hematológico y un ensayo químico de sangre. Además, los ratones se sometieron a autopsia y, a continuación, se observó si los órganos abdominales y del tórax eran anormales a simple vista.

35 Como resultado de los mismos, no se observó ningún síntoma clínico espacialmente notable en los animales y ningún animal murió. No se observó cambio en toxicidad a partir del cambio de peso, el ensayo hematológico, el ensayo químico de sangre y el informe post mortem.

Según el resultado anterior, los compuestos de la presente invención con una dosis de hasta 2 g/kg no mostraron un cambio en toxicidad en los ratones y, por lo tanto, se determinaron como sustancias seguras que tenían una dosis letal media (DL_{50}) de más de 2 g/kg para la administración vía oral.

En lo sucesivo en el presente documento, se explicarán los ejemplos de formulación de la composición que contiene el compuesto 12 según la presente invención, sin embargo, los cuales no deben quedar limitados a los mismos. En su lugar, estos ejemplos se proporcionan tan solo para explicar la presente invención en más detalle.

40 **<Ejemplo de formulación 1> Preparación de polvos**

20 mg del compuesto 12, 100 mg de lactosa y 10 mg de talco se mezclaron entre sí y se envasaron en una bolsa al vacío, preparando, de este modo, un polvo.

<Ejemplo de formulación 2> Preparación de comprimidos

20 mg del compuesto 12, 100 mg de almidón de maíz, 100 mg de lactosa y 2 mg de estearato de magnesio se mezclaron entre sí y se prepararon en forma de comprimidos según un procedimiento convencional de preparación de comprimidos, preparando, de este modo, un comprimido.

<Ejemplo de formulación 3> Preparación de cápsulas

10 mg del compuesto 12, 100 mg de almidón de maíz, 100 mg de lactosa y 2 mg de estearato de magnesio se mezclaron entre sí y se envasaron en una cápsula de gelatina según un procedimiento convencional de preparación de cápsulas, preparando, de este modo, una cápsula.

<Ejemplo de formulación 4> Preparación de inyecciones

10 mg del compuesto 12, agua destilada estéril para inyección en una cantidad adecuada y un regulador de pH en una cantidad adecuada se mezclaron entre sí y, a continuación, se preparó una inyección en una ampolla de 2 ml que contenía los ingredientes anteriores según un procedimiento convencional de preparación de inyecciones.

5 <Ejemplo de formulación 5> Preparación de ungüentos

10 mg del compuesto 12, 250 mg de PEG-4000, 650 mg de PEG-400, 10 mg de vaselina blanca, 1,44 mg de metil para-oxibenzoato, 0,18 mg de propil para-oxibenzoato y un equilibrio de agua destilada se mezclaron entre sí y, a continuación, se preparó un ungüento según un procedimiento convencional de preparación de ungüentos.

10 Se han descrito en detalle partes específicas de la presente invención y, por lo tanto, resulta obvio para los expertos en la técnica que tales descripciones detalladas se proporcionan como aspectos preferentes pero no limitan el ámbito de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de piridinol expresado por la siguiente Fórmula Química 3 para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por la angiogénesis, en la que las enfermedades causadas por la angiogénesis se seleccionan al menos entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, artritis séptica, psoriasis, úlcera corneal, degeneración macular senil, retinopatía diabética, retinopatía de cuerpo vítreo proliferativa, retinopatía prematura, inflamación ocular, córnea cónica, síndrome de Sjogren, tumor de ojo miope, rechazo de injerto de córnea, cicatrización de herida anormal, enfermedad ósea, proteinuria, aneurisma aórtico abdominal, pérdida de cartílago regresiva debido a lesión articular traumática, enfermedad desmielinizante del sistema nervioso, cirrosis hepática, enfermedad glomerular, ruptura prematura de la membrana embrionaria, enfermedad intestinal inflamatoria, periodontitis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer y metástasis de infiltración de cáncer:

[Fórmula Química 3]

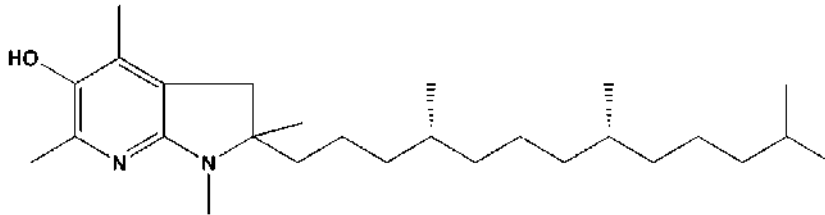


Fig. 1

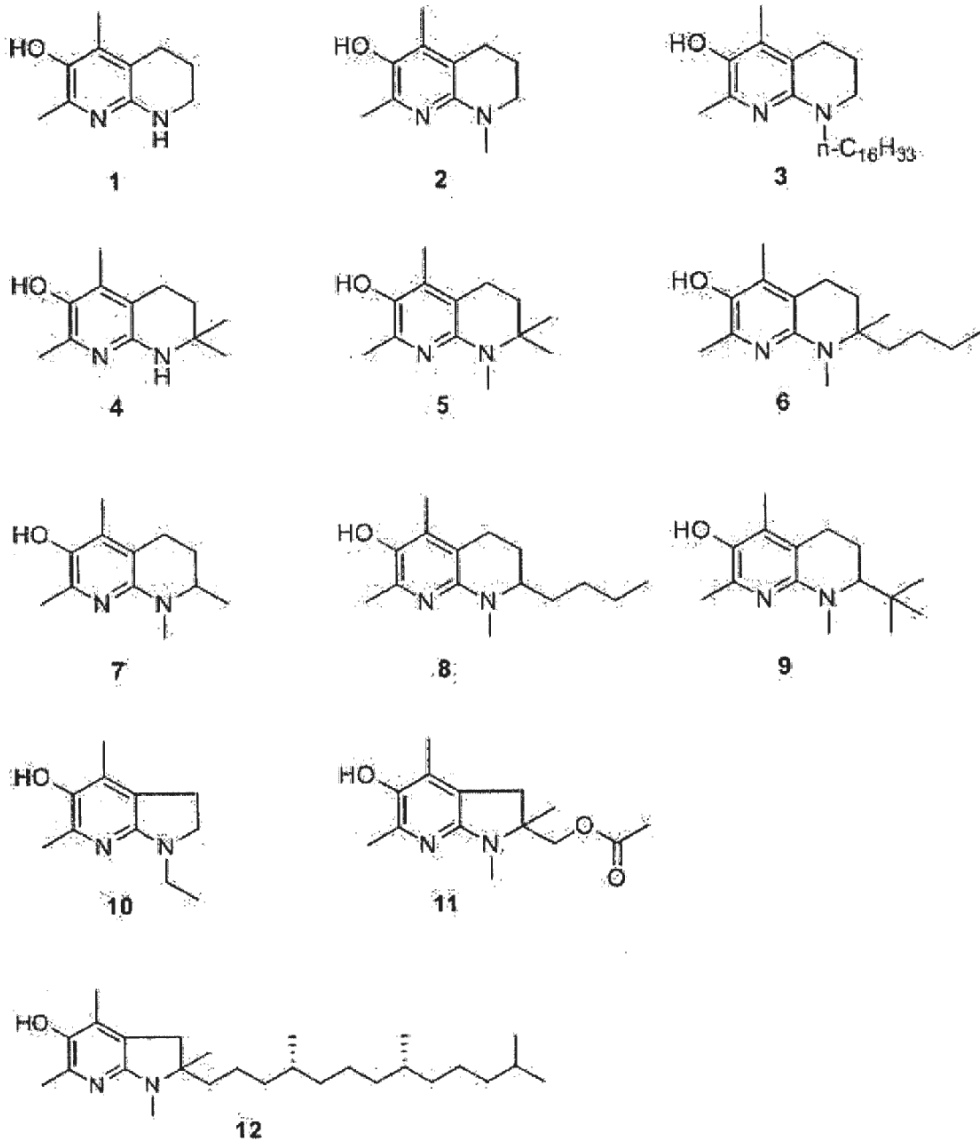


Fig. 2

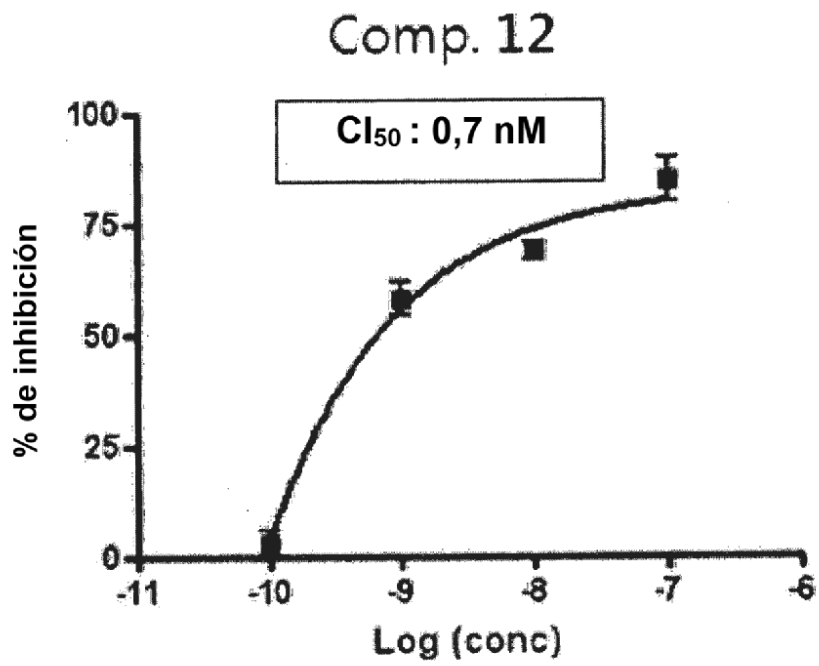


Fig. 3

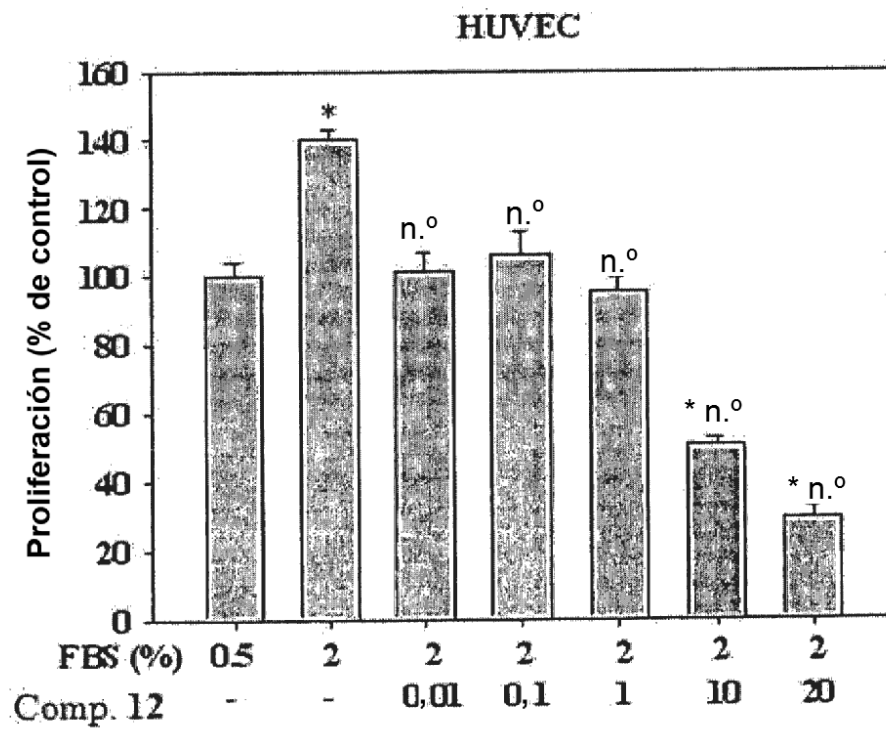


Fig. 4

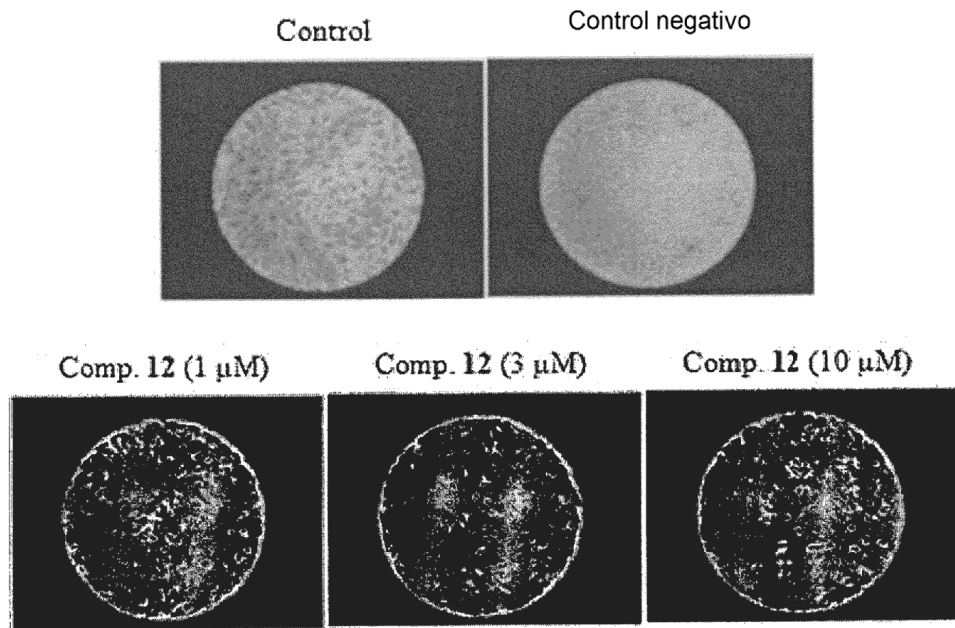
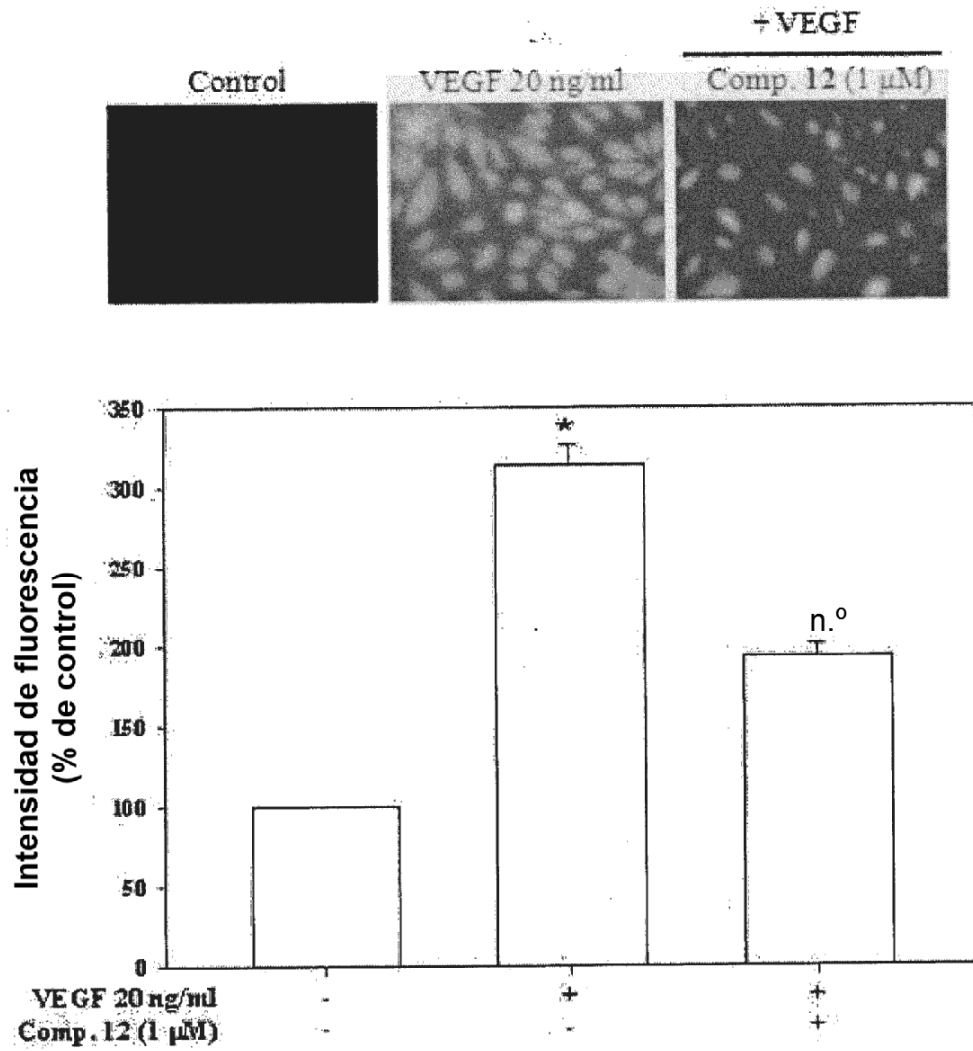


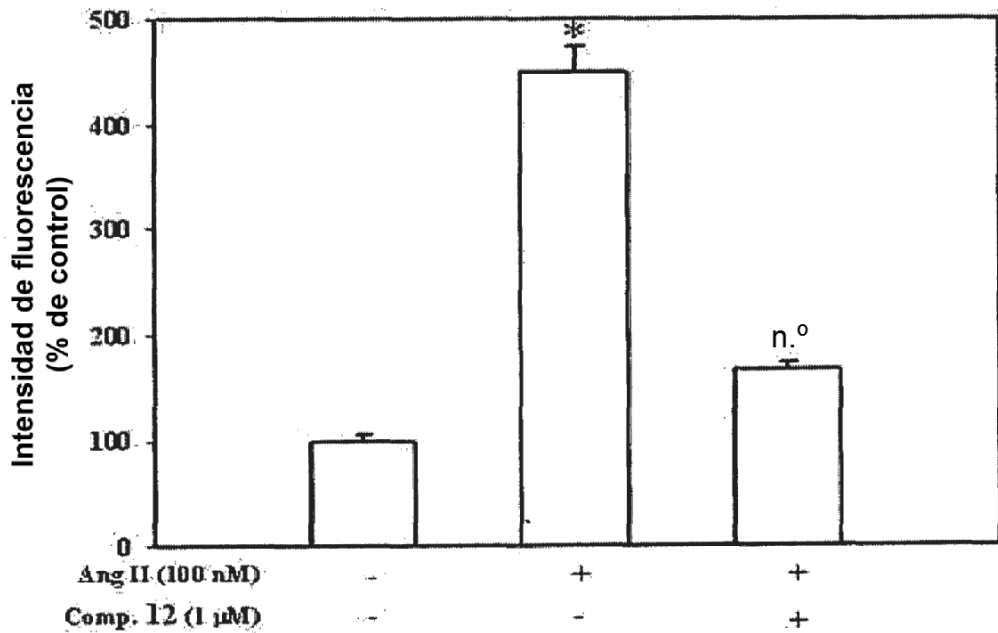
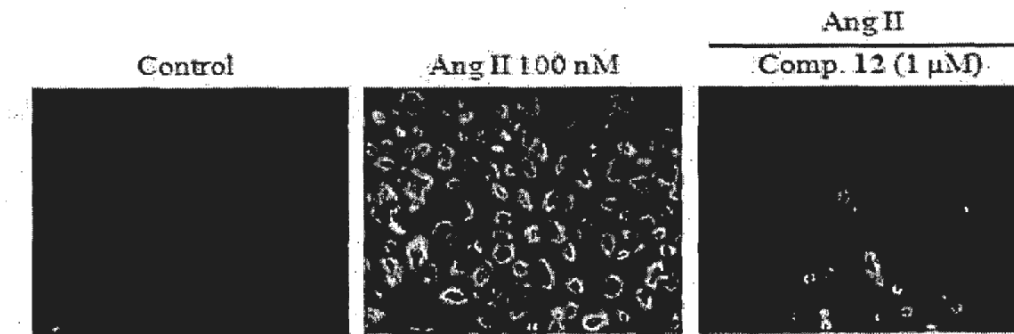
Fig. 5



*P<0,05 en comparación con grupo de control

*P<0,05 en comparación con grupo tratado con VEGF

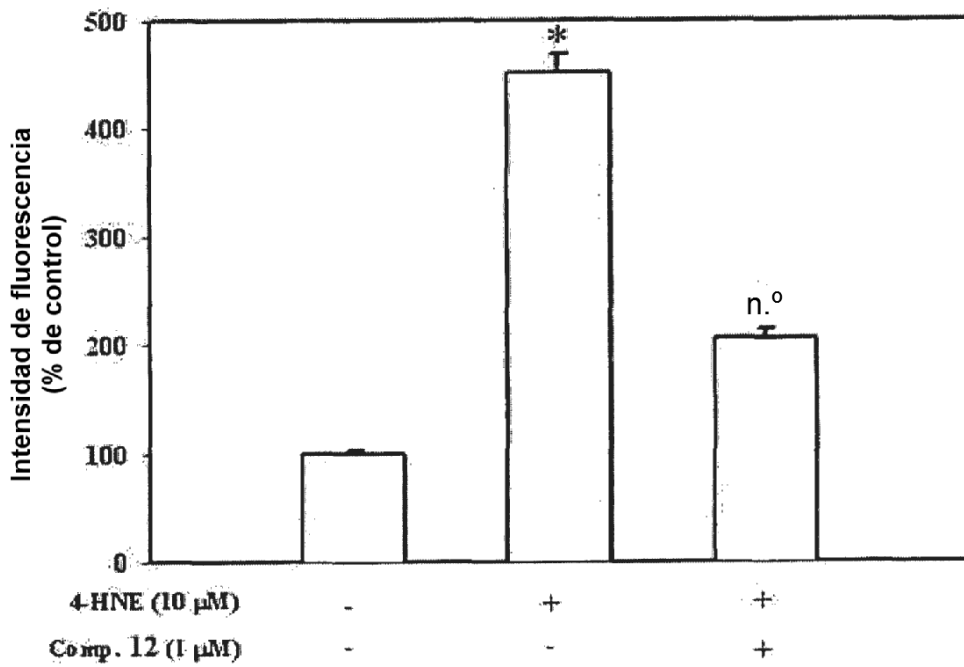
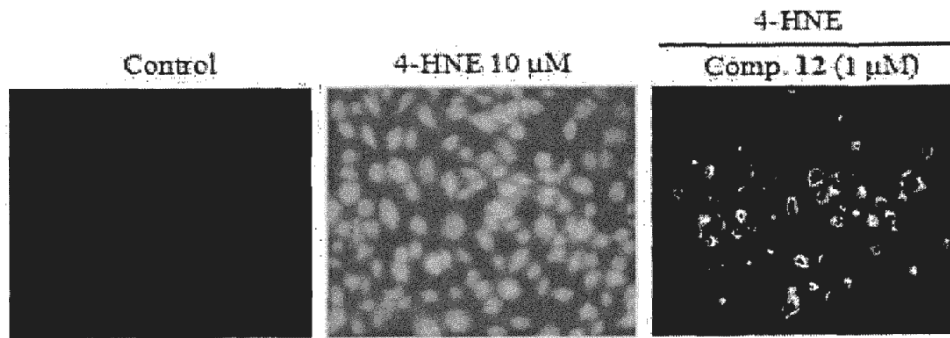
Fig. 6



*P<0,05 en comparación con grupo de control

*P<0,05 en comparación con grupo tratado con Ang II

Fig. 7



* $P < 0,05$ en comparación con grupo de control

* $P < 0,05$ en comparación con grupo tratado con HNE

Fig. 8

Tratamiento		Inhibición de la angiogenesis (%)	Inhibición de crecimiento tumoral (%)
PBS			
	0,1	0,6 ± 2,0	8,4 ± 3,9
A-tocoferol	1	0,3 ± 2,3	10,4 ± 3,8
	10	14,5 ± 2,8	23,9 ± 16,1
	100	29,6 ± 0,8 [#]	35,5 ± 8,2 [#]
PBS			
	0,0001	17,3 ± 10,3	16,1 ± 11,6
Comp. 12 (µM)	0,001	22,9 ± 5,0 [#]	44,7 ± 13,0 [#]
	0,01	33,9 ± 1,6 [#]	49,4 ± 6,6 [#]
	0,1	50,0 ± 2,1 [#]	53,3 ± 9,9 [#]