



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 339 951**

(51) Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05722650 .8**

(96) Fecha de presentación : **27.01.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1713510**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

(54) Título: **Compuestos unidos a un calixareno que se unen a factores de crecimiento.**

(30) Prioridad: **27.01.2004 US 539613 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2010

(73) Titular/es: **University of South Florida
FAO 126, 4202 East Fowler Avenue
Tampa, Florida 33620-7900, US
Yale University**

(72) Inventor/es: **Sebti, Said, M.;
Hamilton, Andrew, D. y
Jain, Rishi**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 339 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos unidos a un calixareno que se unen a factores de crecimiento.

5 Antecedentes de la invención

La capacidad de los tumores para crecer más allá de unos pocos milímetros cúbicos en volumen depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el microentorno de los tumores (Ferrara, N. *Nat Rev Cáncer*, 2002, 2:795-803; Kerbel, R.S. *Carcinogenesis*, 2000, 21:505-15; Carmeliet, P. y Jain, R.K. *Nature*, 2000, 407:249-57; Yancopoulos, G.D. *et al. Nature*, 2000, 407:242-8). Este proceso angiogénico es disparado por varios factores de crecimiento claves que son segregados por el tumor. Los factores de crecimiento no sólo se unen a sus receptores en células endoteliales y estimulan su proliferación iniciando la formación de nuevos vasos sanguíneos, sino también se unen a receptores en células accesorias tales como pericitos que mantienen la integridad de los vasos (Ferrara, N. *Nat Rev Cáncer*, 2002, 2:795-803; Kerbel, R.S. *Carcinogenesis*, 2000, 21:505-15; Carmeliet, P. y Jain, R.K. *Nature*, 2000, 407:249-57; Yancopoulos, G.D. *et al. Nature*, 2000, 407:242-8; Helmlinger, G., *et al. Nat Med*, 1997, 3:177-82; Holash, J. *et al. Science*, 1999, 284:1994-8). Entre los factores de crecimiento más estudiados están el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Varios estudios han demostrado la participación de estos dos factores de crecimiento en el proceso angiogénico, desempeñando el VEGF un papel clave principalmente en la iniciación de la formación de nuevos vasos sanguíneos, y estando el PDGF implicado en el mantenimiento de estos vasos (Bergers, G. *et al. J Clin Invest*, 2003, 111:1287-95; Dvorak, H.F. *J Clin Oncol*, 2002, 20:4368-80; Ferrara, N. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:1-30; Dvorak, H.F. *et al. Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:97-132; Eriksson, U. y Alitalo, K. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:41-57).

Esta observación ha alentado un interés en diseñar estrategias para suprimir las funciones de VEGF y PDGF, con el objetivo final de inhibir la angiogénesis y privar de alimento a los tumores. Los enfoques que se han tomado se basaron en seleccionar como dianas las etapas bioquímicas implicadas en el mecanismo de acción de estos factores de crecimiento. Aquellos incluyen inhibir la unión de VEGF y PDGF a sus receptores respectivos usando anticuerpos contra los factores de crecimiento. Uno de estos, AVASTINA, que selecciona como diana a VEGF, ha sido aprobado recientemente para uso clínico en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (Zhang, W. *et al. Angiogenesis*, 2002, 5:35-44; Ferrara, N. *Semin Oncol*, 2002, 29:10-4). Otro enfoque ha implicado el desarrollo de inhibidores de las actividades de tirosina cinasas de los receptores de PDGF y VEGF, dando como resultado la supresión de las rutas de transducción de señales aguas abajo disparadas por estos factores de crecimiento (Kerbel, R.S. *Carcinogenesis*, 2000, 21:505-15; Jain, R.K. *Semin Oncol*, 2002, 29:3-9; Morin, M.J. *Oncogene*, 2000, 19:6574-83; Miao, R.Q. *et al. Blood*, 2002, 100:3245-52; Laird, A.D. *et al. Cáncer Res*, 2000, 60:4152-60; Wedge, S.R. *et al. Cáncer Res*, 2000, 60:970-5). La mayoría de estos agentes imitan la estructura de ATP, y algunos son potentes agentes antitumorales que actualmente están en ensayos clínicos. Sin embargo, todavía ninguno ha sido aprobado por la FDA.

La aprobación por la FDA de AVASTINA (bevacizumab), que incrementa en 5 meses la supervivencia media de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, valida adicionalmente la selección como diana de procesos angiogénicos como una estrategia para tratar cáncer (Ferrara, N. *Semin Oncol*, 2002, 29:10-4). Sin embargo, es necesario hacer mucho más para explotar completamente este enfoque. Por ejemplo, en otros ensayos clínicos, AVASTINA no pudo prolongar las vidas de pacientes con cáncer de mama metastásico. Una posible explicación para esta actividad inconsistente es que el cáncer de mama metastásico avanzado puede burlar la terapia angiogénica anti-VEGF por medio de otros factores de crecimiento. De hecho, el apoyo para esta sugerencia procede de estudios preclínicos que muestran que el cáncer de mama temprano segrega principalmente VEGF, mientras que el cáncer de mama avanzado segrega factores de crecimiento adicionales (Relf, M. *et al. Cáncer Res*, 1997, 57:963-9). Además, en un modelo de cáncer pancreático de animal, SU5416, un inhibidor de tirosina cinasa del receptor de VEGF, suprime el desarrollo temprano, pero no tardío, de tumores pancreáticos. De forma más importante en el mismo modelo, el tratamiento con SU6668 (que inhibe tirosina cinasas tanto de receptores de VEGF como de PDGF) indujo la regresión de tumor pancreático avanzado en la etapa tardía de desarrollo (Bergers, G. *et al. J Clin Invest*, 2003, 111: 1287-95), sugiriendo que el fracaso de la terapia anti-VEGF puede ser debido a su capacidad para inhibir sólo el inicio pero no el mantenimiento de los vasos sanguíneos. Otro apoyo para esta sugerencia procede de un estudio muy reciente en el que AVASTINA inhibió la formación de nuevos vasos sanguíneos, pero fue ineficaz inhibiendo los ya consolidados, en un modelo de animal en el que se transplantaron células de neuroblastoma en riñones de ratón (Huang, J. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7785-90). Tomado en conjunto, la presente comprensión del proceso de angiogénesis sugiere que la selección simultáneamente como dianas de factores de crecimiento que inician (*es decir*, VEGF) así como aquellos que mantienen (*es decir*, PDGF) los vasos sanguíneos puede ser un enfoque más eficaz para la terapia contra el cáncer que la selección de sólo un factor de crecimiento.

60 Breve resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en diseñar una familia de compuestos que se unen a VEGF y/o PDGF e inhiben la unión de estos factores de crecimiento a sus receptores de las superficies celulares respectivos. Por ejemplo, se encontró que el compuesto GFB204, es un inhibidor potente y selectivo de la estimulación de VEGF y PDGF de su fosforilación y señalización (Erk1/2, Akt y STAT3) de tirosina cinasas receptoras. Este agente farmacológico también inhibió potentemente la migración de células endoteliales y la formación de redes capilares *in vitro*, así como la formación de vasos sanguíneos *in vivo* y el crecimiento de tumores humanos en xenoinjertos de ratones atímicos.

Otro objetivo adicional de la presente invención consiste en proporcionar composiciones farmacéuticas de la familia de compuestos citada anteriormente. También se explican métodos para administrar los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra estructuras de GFB204 de la presente invención, que tienen grupos de ácido isoftálico acíclicos unidos a un armazón orgánico no peptídico, así como GFB-111.

Las Figuras 2A-2C muestran que GFB204 inhibe la unión de ^{125}I -VEGF y ^{125}I -PDGF pero no de ^{125}I -EGF a sus receptores en fibroblastos de ratón. Se incubaron células Flk-1/NIH 3T3, NIH 3T3 y EGFR/NIH 3T3 con ^{125}I -VEGF, ^{125}I -PDGF y ^{125}I -EGF (50.000 cpm/pocillo) respectivamente, junto con concentraciones crecientes de GFB204. Las células se incubaron a 4°C durante 0,5 horas, después se lavaron tres veces con PBS y tres veces con tampón de lisis antes de determinar los recuentos de ^{125}I como se describe en Materiales y Métodos. Se usó un exceso de VEGF, PDGF, y EGF fríos para obtener niveles de unión no específica. Las Figuras 2A-2C muestran la unión específica (% de control) para PDGFR, Flk-1, y EGFR, respectivamente.

Las Figuras 2D y 2E ilustran que GFB-204 se une a PDGF y VEGF como se indica mediante el factor de crecimiento triptófano cuando se añaden cantidades crecientes de GFB204 a PDGF y VEGF, respectivamente. La fluorescencia se monitorizó mediante excitación a 295 nm y 228 nm, respectivamente, y emisión a 334 nm.

Las Figuras 3A y 3B muestran el efecto de GFB204 sobre la fosforilación de Erk1, Erk2, Akt, y STAT3 estimulada por el factor de crecimiento. GFB204 inhibe la estimulación por VEGF y PDGF de la fosforilación de tirosina de Flk-1 y la fosforilación de Erk1/Erk2 (Figura 3A). Se trataron células NIH 3T3 o células Flk-1/NIH 3T3 con cantidades crecientes de GFB204 durante 5 minutos antes de la estimulación con PDGFBB (10 ng/ml) o VEGF (50 ng/ml), respectivamente, durante 10 minutos. Las células se lisaron entonces y se procesaron para la transferencia Western mediante SDS-PAGE con un anticuerpo específico para fosfotirosina-Flk-1 o antifosfotirosina para la fosforilación de tirosina de PDGFR o fosfo-Erk1/2. GFB204 afecta a la fosforilación de Erk1, Erk2, Akt, y STAT3 estimulada por el factor de crecimiento (Figura 3B). Células NIH 3T3, Flk-1/NIH 3T3, IGF-1R/NIH 3T3 o EGFR/NIH 3T3 se trataron con GFB204 (10 μM) antes de la estimulación con PDGF (NIH 3T3), VEGF (Flk-1/NIH 3T3), EGF (EGFR/NIH 3T3), bFGF (NIH 3T3) o IGF-I (IGF-1R/NIH 3T3). Las células se recogieron entonces y se procesaron para la transferencia Western mediante SDS-PAGE con anticuerpos específicos para fosfo-Erk1/2, fosfo-Akt y fosfo-STAT3.

Las Figuras 4A-4C muestran los efectos de GFB204 sobre la angiogénesis *in vitro*. GFB204 inhibe la formación de redes capilares de una manera de respuesta frente a la dosis (Figura 4C). Se sembraron sobre Matrigel células endoteliales de arteria cerebral central humana (5×10^4), y las células se incubaron con VEGF en presencia (Figura 4B) o ausencia (Figura 4A) de GFB204, como se describe en Materiales y Métodos.

Las Figuras 5A-5C ilustran que GFB204 inhibe potentemente *in vitro* la migración de células endoteliales de cerebro humano dependiente de VEGF. La migración de células endoteliales de cerebro humano adultas se evaluó usando un ensayo de cámara de Boyden modificado, como se describe en Materiales y Métodos. Se añadió control de vehículo (Figura 5A) o GFB204 (Figura 5B) a medio que contiene 2% de FBS en la cámara exterior, y se determinó tras una incubación de 18 horas (Figura 5C) el número de células que migraron a la cámara inferior que contiene VEGF.

La Figura 6 ilustra que GFB204 inhibe el crecimiento de xenoinjertos A-549 en ratones atímicos (Figura 6). Se implantaron células A-549 en los flancos de ratones atímicos y, cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de alrededor de 100 mm³, los ratones se seleccionaron al azar y se trataron con vehículo (◆) o con GFB204 a 1 mg/kg (■) y 5 mg/kg (●), y los tamaños de los tumores se midieron como se describe en Materiales y Métodos. Los tumores se procesaron dos horas tras la última inyección i.p. para la tinción inmunohistoquímica IHC de CD31, como se describe en Materiales y Métodos.

Las Figuras 7A-7B ilustran la tinción IHC de CD31 como se describe en Materiales y Métodos para tumores procesados dos horas después de la última inyección i.p. para un control (Figura 7A) y GFB204 (Figura 7B). La cuantificación de la densidad de los microvasos (400X) se determinó como se describe en Materiales y Métodos. SE, error estándar. Recuento de los microvasos de las Figuras 7A y 7B; Fig. 7A = $11,3 \pm 1,9$; Fig. 7B = $2,6 \pm 0,9$.

Materiales y Métodos

Inhibición de la fosforilación de tirosina receptora, dependiente del factor de crecimiento, mediante GFB

Células NIH 3T3 que sobreexpresan Flk-1/KDR (Flk-1/NIH 3T3) o células NIH 3T3, privadas de alimento, se pretrataron con GFB durante 5 minutos antes de la estimulación con VEGF (50 ng/ml) o PDGF-BB (10 ng/ml) durante 10 min., respectivamente. Las células se cosecharon entonces y se lisaron, y las proteínas de los lisados se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se inmunotransfrieron entonces con anticuerpo anti-fosfo-VEGFR2 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) para Flk-1 activado, o con anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) para PDGFR activado. La fosfotirosina Flk-1 y PDGFR se cuantificaron usando un densitómetro formador de imágenes modelo GS-700 de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18:1065-70).

Estimulación mediada por el factor de crecimiento de la fosforilación de Erk1/2. Akt y STAT3

Células NIH 3T3 (PDGF-BB, bFGF), células NIH 3T3 que sobreexpresan EGFR (EGFR/NIH 3T3, EGF), Flk-1 (Flk-1/NIH 3T3, VEGF), e IGF-1R NIH 3T3 (IGF-1R/NTH 3T3, IGF-1), privadas de alimento, se pretrataron con la concentración indicada de GFB204 durante 5 minutos antes de la estimulación durante 10 minutos con PDGF-BB (10 ng/ml), EGF (100 ng/ml), bFGF (50 ng/ml), VEGF (50 ng/ml) e IGF-1 (50 ng/ml). Los lisados celulares se hicieron correr sobre geles de SDS-PAGE, después se transfirieron a nitrocelulosa y se realizó una transferencia Western con anti-Erk1/Erk2 fosforilado (Cell Signaling Technologies), anti-Akt fosforilado o anti-STAT3 fosforilado, como se describió previamente (Blaskovich, M.A. *et al.* Cáncer Res, 2003, 63:1270-9).

Unión de factores de crecimiento marcados con ^{125}I a sus receptores. El ensayo de unión de ^{125}I -VEGF, ^{125}I -PDGF y ^{125}I -EGF a sus receptores respectivos se llevó a cabo como se describió previamente (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18: 1065-70). De forma breve, células Flk-1/NIH 3T3, células NIH 3T3 y células EGFR/NIH 3T3 se incubaron con ^{125}I -VEGF, ^{125}I -PDGF y ^{125}I -EGF (50.000 cpm/pocillo), respectivamente, y con cantidades crecientes de GFB204. Las células se incubaron a 4°C durante 0,5 horas, después se lavaron tres veces con PBS y tres veces con 25 mM de Tris, pH 8,0, 1% de Triton-X-100, 10% de glicerol, y 1% de SDS antes de determinar los recuentos de ^{125}I en un contador gamma (Beckmann Inc.). Se usó un exceso de factores de crecimiento fríos para obtener niveles de unión no específica.

Formación de la red capilar. Se colocaron 200 μl de Matrigel en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos a 4°C, y se dejó que polimerizaran mediante incubación a 37°C como se describió previamente (Papadimitriou, E. *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282:306-13). Se sembraron células endoteliales de arteria cerebral central humana (5×10^4) en el Matrigel en 1 ml de EBM que contiene VEGF (20 ng/ml). Las células se incubaron en presencia o ausencia de GFB204 a las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura. Cada muestra se fotografió usando una lente de objetivo 10X, y se cuantificó la longitud total de las estructuras del tubo en cada fotografía usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetic, Inc., MD).

Ensayo de migración de células endoteliales del cerebro humano. La migración de células endoteliales de cerebro humano adultas se evaluó usando un ensayo de cámara de Boyden modificada (BD BioCoat Matrigel Invasión Chamber) (Papadimitriou, E. *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282:306-13). Las células se colocaron en placas a 4×10^4 ml sobre una membrana de 8 μm de tamaño de poros revestida con una capa delgada de matriz de membrana de basamento Matrigel. Se añadió GFB204 al medio en la cámara externa, y las células se cultivaron durante 18 horas en condición dependiente de VEGF en la cámara inferior (VEGF 20 ng/ml). Las células no invasoras se eliminaron de la superficie superior con un tapón de algodón. Los insertos membránicos se fijaron entonces con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con colorante de violeta de cristal. El número de células que migró a la subsuperficie de los filtros se cuantificó contando las células que migraron en los campos microscópicos seleccionados al azar (10X). Las muestras se analizaron en busca de diferencias significativas usando la prueba de la t de Student para muestras independientes.

Actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor de ratón atímico. Los ratones atímicos (Charles River, Wilmington, MA) se mantuvieron según los procedimientos y guías de Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Se cosecharon células A-549 y se resuspendieron en PBS, después se inyectaron s.c. en los flancos derecho e izquierdo (10×10^6 células por flanco) de ratones atímicos hembra de 8 semanas como se dio a conocer previamente (Sun, J. *et al.* Cáncer Res, 1999, 59:4919-26). Cuando los tumores alcanzaron alrededor de 100 mm^3 , los animales se dosificaron i.p. con 0,2 ml de disolución una vez al día. Los animales del control recibieron un vehículo, mientras que los animales tratados fueron inyectados con GFB204 (1 ó 5 mg/kg/día). Los volúmenes de los tumores se determinaron midiendo la longitud (l) y la anchura (w), y calculando el volumen ($V = lw^2/2$) como se describió previamente (Sun, J. *et al.* Cáncer Res, 1999, 59:4919-26). La significancia estadística entre los animales del control y los animales tratados se evaluó usando la prueba de la t de Student.

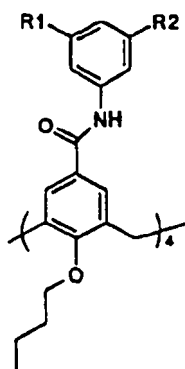
Estudio IHC. En el día de la terminación de los experimentos antitumorales, los tumores se extrajeron y se fijaron durante 6 horas en formalina tamponada neutra al 10%. Tras la fijación, las muestras tisulares se procesaron en bloques de parafina. Se obtuvieron secciones tisulares (4 μm de grosor) de los parabloques, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) usando técnicas histológicas estándar. También secciones tisulares se sometieron a inmunotinción por CD31 (BD Biosciences, San Diego, CA) usando la técnica del complejo de avidina-biotina-peroxidasa (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18:1065-70). Se usó anticuerpo monoclonal de ratón a una dilución 1:50, seguido de la recuperación del antígeno por microondas (cuatro ciclos de 5 minutos cada uno en alto en tampón de citrato 0,1 M).

Descripción detallada de la invención

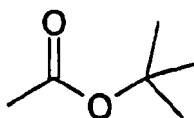
La presente invención se refiere a compuestos que se unen a factor de crecimiento. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos (tales como los mostrados en la Tabla 1) que se unen a factores de crecimiento tales como VEGF y/o PDGF, y son capaces de inhibir la unión de uno o más de estos factores de crecimiento a sus receptores de la superficie celular respectivos. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de estos compuestos, y a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, la presente invención se refiere a métodos para inhibir la unión de tales factores de crecimiento a células poniendo en contacto uno o más compuestos de la invención (o composiciones que comprenden uno o más de los compuestos) con las células *in vitro*. En otros aspectos, la presente invención incluye métodos para inhibir la fosforilación (*por ejemplo*, fosforilación de Erk1, Erk2, Akt, y/o STAT3) estimulada por factores de crecimiento; métodos para inhibir la angiogénesis; y métodos para inhibir el crecimiento de cánceres y/o de tumores poniendo en contacto uno o más compuestos o composiciones de la presente invención con células diana *in vitro*.

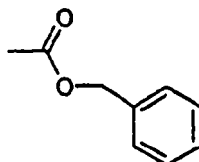
En una realización específica, la presente invención se refiere a un método útil para inhibir factores de crecimiento para que no se unan a células, para inhibir la fosforilación estimulada por factores de crecimiento, para inhibir la angiogénesis, para inhibir el crecimiento de cánceres y de tumores, o una combinación de los mismos, en el que el método comprende poner en contacto por lo menos un compuesto que se une a un factor de crecimiento, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los compuestos que se unen a un factor de crecimiento, con una célula *in vitro*, en el que los compuestos que se unen a un factor de crecimiento comprenden una pluralidad de grupos de ácido isoftálico acíclicos unidos a un armazón orgánico no peptídico; en el que cada uno de los compuestos que se unen a un factor de crecimiento, o la sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los compuestos que se unen a un factor de crecimiento, pueden o no ser portados en un vehículo farmacéuticamente aceptable, excepto para el compuesto que tiene la estructura general:



en la que cada R1 es:



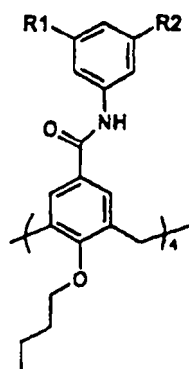
y cada R2 es:



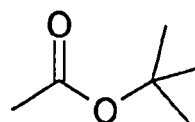
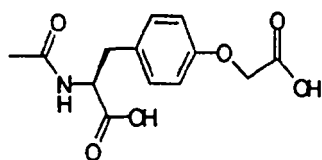
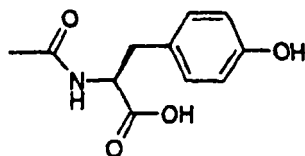
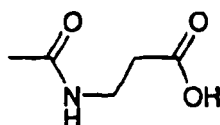
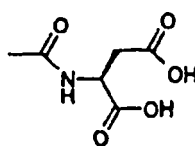
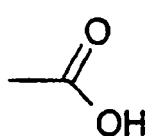
Todavía en otra forma de realización específica, una composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para ser administrada localmente o sistémicamente a un paciente para lograr la inhibición de la angiogénesis, la inhibición del crecimiento tumoral, y/o la inhibición del cáncer.

ES 2 339 951 T3

El compuesto que se une a factores de crecimiento de la presente invención tiene la estructura general:

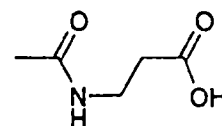
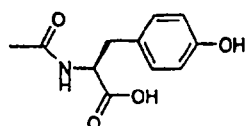
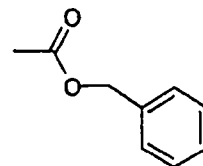
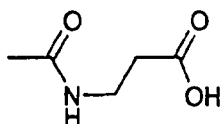
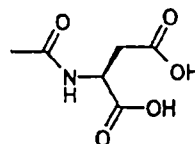
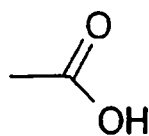


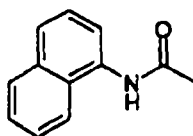
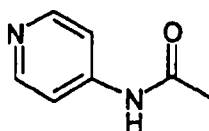
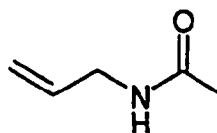
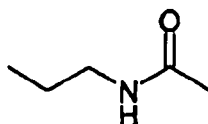
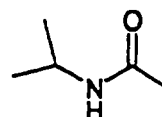
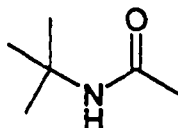
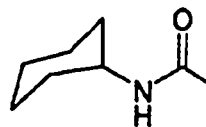
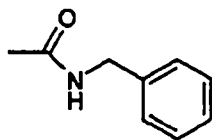
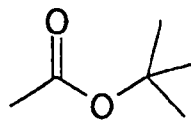
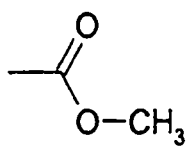
en la que cada R1 se selecciona independientemente de entre los siguientes grupos químicos:



;

y cada R2 se selecciona independientemente de entre los siguientes grupos químicos:





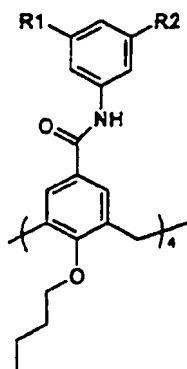
En formas de realización específicas, el compuesto de la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste en GFB201, GFB202, GFB203, GFB204, GFB205, GFB206, GFB207, GFB208, GFB209, GFB210, GFB211, GFB212, GFB213, GFB214, GFB215, GFB216, GFB217, GFB218, y GFB219 (como se establece en la Tabla 1).

Los factores de crecimiento que son seleccionados como dianas o sobre los que se actúan mediante los compuestos de la presente invención pueden incluir factores de crecimiento derivados de plaquetas, un factor de crecimiento endotelial vascular, o ambos.

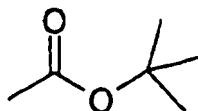
En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende por lo menos un compuesto de la invención, como se describe aquí, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de los compuestos de la invención en la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad que comprende exceso de proliferación celular, exceso de angiogénesis, un tumor, o una combinación de cualquiera de los anteriores, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto o composición de la invención. En una realización específica, el tumor puede expresar cantidades elevadas de un factor de crecimiento, tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, o ambos. También niveles elevados de PDGF y VEGF podrían provenir del microentorno del tumor debido a células endoteliales y vasos angiogénicos.

Todavía en otra forma de realización específica, la presente invención proporciona el uso de los compuestos de la invención en la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad que comprende exceso de proliferación celular, exceso de angiogénesis, un tumor, o una combinación de cualquiera de los anteriores, en el que el método comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica, en el que la composición farmacéutica comprende por lo menos un compuesto que se une a un factor de crecimiento, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los compuestos que se unen a un factor de crecimiento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable; o uno o más compuestos que se unen a un factor de

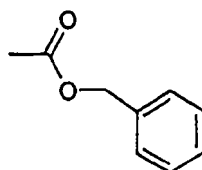
crecimiento, en el que los compuestos que se unen a un factor de crecimiento comprenden una pluralidad de grupos de ácido isoftálico acíclicos unidos a un armazón orgánico no peptídico excepto para el compuesto que tiene la estructura general:



en la que cada R1 es:



y cada R2 es:



Las formulaciones (también denominadas aquí como composiciones) incluyen aquellas adecuadas para la administración oral o sistémica, tal como la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica) y pulmonar. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria, y se pueden preparar mediante cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, saquitos o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del ingrediente activo; o como una emulsión líquida de aceite en agua, una emulsión líquida de agua en aceite, o como un suplemento en una disolución acuosa, por ejemplo un té. El ingrediente activo también se puede presentar como un bolo, electuario, o pasta.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, que comprenden el ingrediente activo en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las composiciones farmacéuticas para administración tópica según la presente invención se pueden formular como un ungüento, crema, suspensión, loción, polvo, disolución, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Como alternativa, una formulación puede comprender un parche o un vendaje tal como una venda o esparadrapo impregnado con ingredientes activos, y opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica al ojo también incluyen colirios en los que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el agente.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

La formulación adecuada para administración vaginal se puede presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización que contienen, además del agente, vehículos que son conocidos en la técnica como apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo bastante que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra de una manera en la que se esnifa, *es decir*, mediante inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para administración mediante nebulizador incluyen disoluciones acuosas u oleosas del agente.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor al que se destina; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes, liposomas u otros sistemas de micropartículas que se diseñan para dirigir específicamente el compuesto a componentes de la sangre o uno o más órganos. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes cerrados herméticamente de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como, por ejemplo, ampollas y viales, y se puede almacenar en una condición liofilizada, requiriendo sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las disoluciones o suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o, subdosis diaria unitaria, como se explica aquí anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, de un agente. Se debería entender que, además de los ingredientes mencionados particularmente antes, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica considerando el tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir agentes adicionales tales como edulcorantes, espesantes, y agentes saborizantes. También se pretende que los agentes, composiciones y métodos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas.

Se conocen diversos sistemas de suministro, y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, *por ejemplo*, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas o endocitosis mediada por receptores. Los métodos de suministro incluyen las vías intraarterial, intramuscular, intravenosa, intranasal, y oral. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar localmente al área que necesita tratamiento; tal administración local se puede lograr, por ejemplo, mediante infusión local durante cirugía, mediante inyección, o por medio de un catéter.

Las cantidades terapéuticas se pueden determinar empíricamente, y variarán con la patología que se esté tratando, el sujeto que se esté tratando, y la eficacia y toxicidad del agente. De forma similar, las formulaciones farmacéuticas adecuadas y métodos de administración de los agentes se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquiera de una variedad de vías, tal como oralmente, intranasalmente, parenteralmente, o mediante terapia por inhalación, y pueden tomar forma de comprimidos, pastillas para chupar, gránulos, cápsulas, tabletas, ampollas, supositorios, o forma de aerosol. También pueden tomar la forma de suspensiones, disoluciones, y emulsiones del ingrediente activo en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, gránulos o polvos. Además de un compuesto de la presente invención, las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos o una pluralidad de compuestos de la invención.

Idealmente, el agente se debería administrar para lograr concentraciones pico del compuesto activo en sitios de la enfermedad. Las concentraciones pico en los sitios de la enfermedad se pueden lograr, por ejemplo, inyectando intravenosamente el agente, opcionalmente en disolución salina, o administrando oralmente, por ejemplo, un comprimido, cápsula o jarabe que contiene el ingrediente activo.

Ventajosamente, las composiciones se pueden administrar simultánea o secuencialmente con otros fármacos o agentes biológicamente activos, tales como agentes anticáncer. Los ejemplos incluyen antioxidantes, agentes depuradores de radicales libres, péptidos, factores de crecimiento, antibióticos, agentes bacteriostáticos, inmunosupresores, anticoagulantes, agentes tamponantes, agentes antiinflamatorios, antipiréticos, aglutinantes de liberación en el tiempo, anestésicos, esferoides y corticosteroides.

Preferentemente, la administración se lleva a cabo oralmente, parenteralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, intraarterialmente, transdérmicamente o vía una membrana mucosa.

El término “cáncer” quiere decir cualquier neoplasia celular maligna cuyo único rasgo es la pérdida de controles normales lo que da como resultado el crecimiento desregulado, falta de diferenciación, y capacidad para invadir tejidos

locales y metastatizarse. El cáncer se puede desarrollar en cualquier tejido de cualquier órgano, más específicamente, cáncer pretende incluir, sin limitación, cáncer de próstata, leucemia, cánceres dependientes de hormonas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer epidérmico, cáncer hepático, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer del cerebro, y cáncer del riñón.

Los términos “tratamiento”, “tratar”, y similares, quieren decir obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, *por ejemplo*, inhibición del crecimiento de células cancerosas, o inducción de apoptosis de una célula cancerosa. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o sus síntomas, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se usa aquí, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que ocurra una enfermedad o afección (*por ejemplo* prevenir el cáncer) en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad (*por ejemplo*, detener su desarrollo); o (c) aliviar la enfermedad (*por ejemplo*, reducir los síntomas asociados con la enfermedad).

La expresión “actividad anticancerígena” quiere decir una actividad que es capaz de inhibir sustancialmente, ralentizar, interferir, suprimir, prevenir, retrasar y/o detener un cáncer y/o una metástasis del mismo (tal como la iniciación, el crecimiento, la diseminación, y/o su progresión de tal cáncer y/o metástasis).

Los términos “administrar”, “administración”, y “poner en contacto” quieren decir un modo de suministro, incluyendo, sin limitación, oral, rectal, parenteral, subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, transdérmicamente o vía una membrana mucosa. El más preferido es el oral. La administración se puede llevar a cabo localmente, en un sitio o sitios dianas, o sistémicamente. Un experto en la técnica reconoce que formas adecuadas de formulación oral incluyen un comprimido, una pastilla, una cápsula, una pastilla para chupar, un polvo, un comprimido de liberación sostenida, un líquido, una suspensión líquida, un gel, un jarabe, una lechada y una suspensión. Por ejemplo, una dosis diaria se puede dividir en una, dos o más dosis en una forma adecuada para ser administrada una, dos o más veces durante un período de tiempo.

La expresión “terapéuticamente eficaz” quiere decir una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para mejorar sustancialmente algún síntoma asociado con una enfermedad o una afección médica. Por ejemplo, en el tratamiento de cáncer, un compuesto que disminuyera, evitara, retrasara, suprimiera o detuviera cualquier síntoma de la enfermedad sería terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto no se requiere para curar una enfermedad, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad, de forma que el comienzo de la enfermedad se retrase, se vea impedido, o se evite, o se mejoren los síntomas de la enfermedad, o la duración de la enfermedad cambia o, por ejemplo, es menos grave, o la recuperación se acelera en un individuo.

El término “independientemente” quiere decir que cada uno de los cuatro sustituyentes R1 y cada uno de los cuatro sustituyentes R2 de los compuestos que se unen a un factor de crecimiento de la presente invención pueden cada uno ser el mismo sustituyente, o pueden cada uno ser un sustituyente diferente.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran en terapias de combinación con otros agentes, se pueden administrar secuencial o concurrentemente a un individuo. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden estar comprendidas por una combinación de un compuesto de la presente invención, como se describe aquí, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico y ácidos grasos.

Las sales también se pueden formar con bases. Tales sales incluyen sales derivadas de bases inorgánicas u orgánicas, por ejemplo sales de metales alcalinos tales como sales de magnesio o calcio, y sales de aminas orgánicas, tales como sales de morfina, piperidina, dimetilamina o dietilamina.

Como se usa aquí, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes (tales como tampones de disolución salina tamponada con fosfato, agua, disolución salina), medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en un número de fuentes que son bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (Martin EW (1995) Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19ª edición) describe formulaciones que se pueden usar en relación con la presente invención.

Como se usan aquí, los términos “individuo” y “paciente” se usan de forma intercambiable para referirse a cualquier especie vertebrada, tales como seres humanos y animales. Preferentemente, el paciente es de una especie mamí-

fera. La especie mamífera que se beneficiará de los métodos descritos incluye, pero no se limita a, gorilas, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; animales domesticados (*por ejemplo*, mascotas) tales como perros, gatos, cobayas, hámsters, cerditos enanos, conejos, y urones; animales de granja domesticados, tales como vacas, búfalos, bisonte, caballos, burro, cerdo, ovejas, y cabras; animales exóticos encontrados típicamente en zoológicos, tales como oso, leones, tigres, panteras, elefantes, hipopótamos, rinocerontes, jirafas, antílopes, oso perezoso, gacelas, cebras, ñues, perritos de la pradera, koalas, canguro, zarigüeyas, mapaches, pandas, hienas, focas, leones marinos, elefantes marinos, nutrias, marsopas, delfines, y ballenas. Los pacientes animales humanos o no humanos pueden variar en edad desde neonatos hasta ancianos.

Según otra forma de realización de la presente invención, se proporciona el uso de compuestos de la invención en la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar cáncer, que comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención.

Preferentemente, un cáncer a tratar según una realización de la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de próstata, leucemia, cánceres dependientes de hormonas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer epidérmico, cáncer hepático, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer del cerebro, y cáncer del riñón.

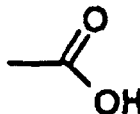
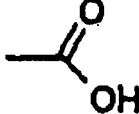
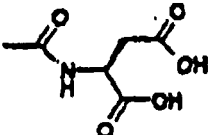
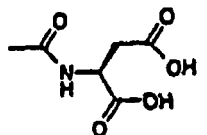
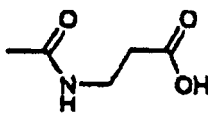
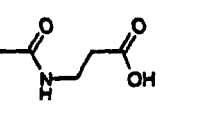
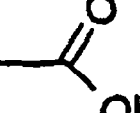
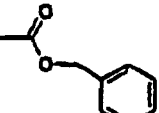
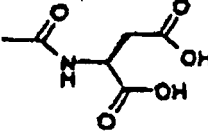
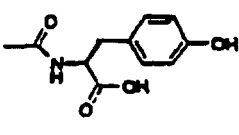
Ejemplo 1

Identificación de GFB204, un derivado de calixareno que inhibe potentemente la estimulación por VEGF y PDGF de la fosforilación de tirosina del receptor de Flk-1 y PDGF

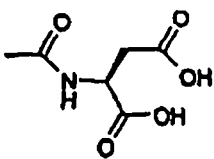
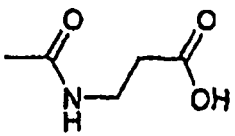
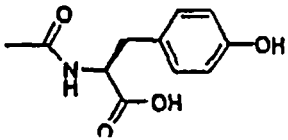
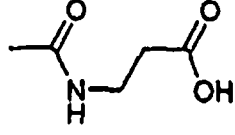
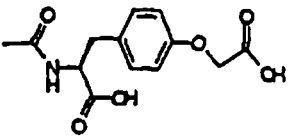
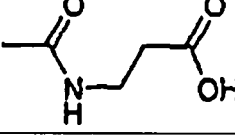
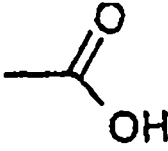
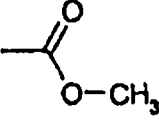
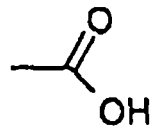
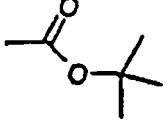
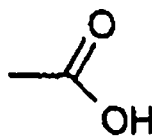
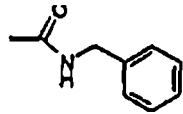
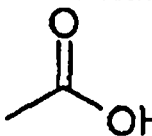
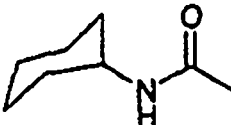
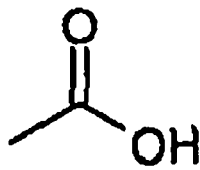
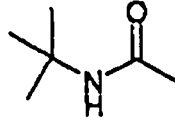
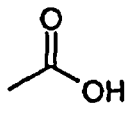
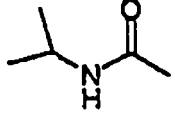
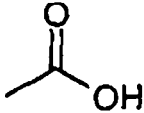
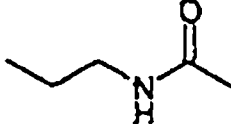
Este enfoque inicial para interrumpir interacciones proteína-proteína biológicamente significativas tales como aquellas que implican factores de crecimiento con sus receptores consiste en diseñar moléculas que contienen cuatro bucles peptídicos sintéticos unidos a un armazón de calix[4]areno (Figura 1, reacción (a)) (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18:1065-70). Los componentes del bucle peptídico se basaron en un hexapéptido cíclico en el que dos restos se sustituyen por el dipéptido mimético 3-aminometilbenzoato modificado con un grupo 5-amino para proporcionar la unión a la cavidad calixarénica. Este diseño permitió la síntesis de una librería de derivados de calixareno que tienen diferentes secuencias peptídicas en los bucles y grandes áreas superficiales capaces de unirse a superficies de proteínas. Uno de los miembros de la librería, GFB111, se unió a PDGF y bloqueó su unión a PDGFR en concentraciones sub μ M, y selectivamente con relación a otros factores de crecimiento (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18:1065-70). Los cuatro bucles peptídicos en GFB111 contenían restos negativos e hidrófobos en la secuencia GDGY (Figura 1, reacción (a)), que concuerdan bien con los aminoácidos positivos e hidrófobos en los bucles I, II y III del PDGF homodimérico, que son críticos para la unión a PDGFR (Oefner, C. *et al.* Embo J, 1992, 11:3921-6; Andersson, M. *et al.* Growth Factors, 1995, 12:159-64). GFB111 y compuestos similares se describen en la Solicitud publicada U.S. n° 2003/0118589, presentada el 21 de marzo de 2001, y en la Solicitud Publicada Internacional n° WO 01/70930, presentada el 21 de marzo de 2001. Para mejorar este diseño, se ha diseñado una librería de segunda generación en la que, en lugar de los simples bucles peptídicos, se unen al armazón de calix[4]areno grupos de ácido isoftálico acíclicos funcionalizados con un amplio intervalo de grupos ácidos e hidrófobos (R₁, y R₂; Figura 1, reacción (b); y Tabla 1).

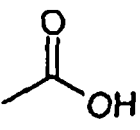
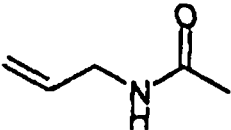
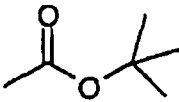
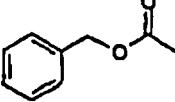
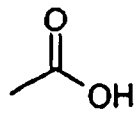
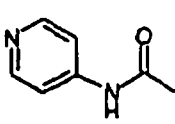
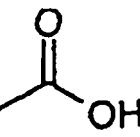
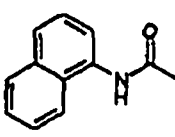
(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

Compuesto	R1	R2	IC ₅₀ (μM)	
			PDGFR	VEGFR
GFB201			2,62±0,5	4,96±0,34
GFB202			1,39±0,38	11,3±2,90
GFB203			5,79±0,72	19,83±2,9
GFB204			0,19±0,06	0,48±0,31
GFB205			3,1 ±0,71	5,86±0,68

ES 2 339 951 T3

GFB206			2,58±0,21	>10 >30
GFB207			3,47±1,87	18,43±2,72
GFB208			0,84±0,06	>30 >10
GFB209			2,91±2,05	5,58±4,11
GFB210			0,35±0,31	4,54±0,55
GFB211			1,34±0,32	12,95±0,49
GFB212			0,29±0,08	>10 >10 >10
GFB213			0,57±0,06	0,85±0,44
GFB214			0,17±0,02	>10 >10 >10
GFB215			0,21±0,13	>10 >10 >10

GFB216			0,15±0,01	>10 >10 >10
GFB217			>10 >10	>10 >10 >10
GFB218			0,54±0,15	>10 >10 >10
GFB219			0,53±0,15	>10 >10 >10

Para evaluar esta librería en busca de moléculas capaces de evitar la unión de PDGF y VEGF a sus receptores, se determinó en primer lugar su capacidad para interrumpir la fosforilación de tirosina del receptor estimulada por PDGF y VEGF, como se describe en Materiales y Métodos. De los 19 compuestos en la librería, GFB204 se identificó (en el que R₁ es un ácido carboxílico y R₂ es un éster bencílico) como un potente inhibidor de la fosforilación de tirosina tanto de VEGFR como de PDGFR (Tabla 1), con valores IC₅₀ de 190 nM (PDGF) y 480 nM (VEGF). Todos los miembros de la librería que tienen por lo menos cuatro grupos carboxílicos, inhibieron la señalización de PDGF a concentraciones bajas de μM (IC₅₀ $\leq$ 6 μM), mientras que el único compuesto que carece de grupos ácidos (GFB217) no tuvo una actividad significativa. El análisis de los datos en la Tabla 1 reveló que todos los potentes inhibidores (que tienen IC₅₀ $\leq$ 0,6 M) contienen R₁ = COOH y R₂ = éster hidrófobo o amida. GFB211, en el que R₂ = bencilamida, tiene una actividad sólo ligeramente menor (IC₅₀ = 1,34 $\pm$ 0,32 μM) que GFB204, mientras que GFB209 (R₂ = éster metílico) es menos potente (IC₅₀ = 2,9 $\pm$ 2,05 μM). Estos datos sugieren que la estructura de los sustituyentes hidrófobos no es crucial para la inhibición de la señalización de PDGF, en tanto que sean más grandes que un grupo metilo. Los compuestos que tienen grupos aromáticos y alifáticos son igualmente activos, y las amidas más estables tienen actividad similar a sus análogos de éster.

Por el contrario, los derivados de calixareno que contienen sustituyentes aminoácidos (*es decir*, GFB202, GFB203, GFB205, GFB206, GFB207 y GFB208), muestran en general menor actividad (IC₅₀ en el intervalo 1-6 μM). Esto puede ser debido a un cambio en la relación de grupos iónicos a hidrófobos en el armazón (estos derivados tienen 8-16 ácidos carboxílicos y sólo 0-4 sustituyentes hidrófobos), o a una distancia no óptima entre ellos. Además, la presencia de grupos ácidos en el espaciador isoftálico parece ser más importante que la presencia de sustituyentes hidrófobos: GFB201, GFB202, GFB203, y GFB206 carecen de grupos hidrófobos en las posiciones R₁ y R₂ pero son más potentes que GFB217, el cual no tiene grupos carboxilato. Posiblemente, los propios grupos de ácido isoftálico proporcionan un área hidrófoba que interacciona con las regiones hidrófobas del dominio de unión de PDGF a los receptores.

Finalmente, es importante señalar que los compuestos más activos en el estudio tienen exactamente un ácido carboxílico y un grupo hidrófobo en los cuatro componentes isoftálicos dentro del armazón, consistente con estudios previos que condujeron a la identificación de GFB111 (Blaskovich, M.A. *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18:1065-70). Los estudios de relación estructura-actividad (SAR) también revelaron que las características necesarias en esta serie para la inhibición de la fosforilación de tirosina de Flk-1 estimulada por VEGF son mucho más restrictivas. De hecho, aparte de GFB204 (IC₅₀ = 0,48 $\pm$ 0,31 μM), sólo otro compuesto potente, GFB213, inhibió la fosforilación de tirosina de Flk-1 con un valor IC₅₀ de 0,85 $\pm$ 0,44 μM (Tabla 1). Los factores que determinan la inhibición de la actividad con respecto a la señalización de VEGF son difíciles de inferir a partir de los datos en la Tabla 1.

GFB204 se une tanto a PDGF como a VEGF. La capacidad de GFB204 para unirse tanto a VEGF como a PDGF se demostró mediante curvas de valoración mediante fluorescencia. Tanto VEGF como PDGF contienen triptófanos que fluorescen a 334 nM cuando se excitan a 294 nM. Las Figuras 2D y 2E muestran que concentraciones crecientes de GFB-204 disminuyeron, de una manera dependiente de la concentración, la capacidad de PDGF y VEGF para fluorescer.

Ejemplo 2

GFB204 inhibe VEGF y PDGF pero no la unión de EGF a sus receptores respectivos

La capacidad de GFB204 para inhibir la fosforilación de tirosina del receptor estimulada por PDGF y VEGF sugirió que GFB204 interrumpe la unión de ligando/receptor, la dimerización del receptor o la actividad de tirosina cinasas receptoras. Por lo tanto, se determinó si GFB204 inhibe la interacción entre PDGF y VEGF y sus receptores respectivos pero no otros factores de crecimiento. Para este fin, se evaluó la capacidad de GFB204 para bloquear la unión de [I-125]-PDGF, [I-125]-VEGF y [I-125]-EGF a su receptor en células NIH 3T3 (PDGF), células NIH 3T3 que sobreexpresan Flk-1 (VEGF) humano y EGFR (EGF) humano, como se describe en Materiales y Métodos. GFB204 inhibió eficazmente la unión de [I-125]PDGF e [I-125]-VEGF a sus receptores, con valores IC_{50} de $154 \pm 1,0$ nM y 469 ± 94 nM, respectivamente (Figuras 2A-2C). Por el contrario, la unión de [I-125]EGF a su receptor no se vio afectada por GFB204 con concentraciones tan elevadas como $100 \mu M$. De este modo, GFB204 es más selectivo para PDGF y VEGF con respecto a EGF.

Ejemplo 3

GFB204 interrumpe la estimulación por PDGF y VEGF, pero no por EGF, bFGF o IGF-1, de la fosforilación de Erk1, Erk2, Akt y STAT3

Para documentar adicionalmente la selectividad de GFB204 por PDGF y VEGF con respecto a otros factores de crecimiento, se determinó la capacidad de GFB204 para bloquear la estimulación por factores de crecimiento de las cinasas Erk1, Erk2 y Akt, así como el transductor de señal y activador de la transcripción STAT3. Para este fin, células NIH 3T3 (PDGF y bFGF) o células NIH 3T3 que sobreexpresan Flk-1 (VEGF), EGFR (EGF) o IGF-IR (IGF-1) se privaron de alimento y se estimularon con el correspondiente factor de crecimiento en presencia o ausencia de GFB204, y las células se procesaron para la inmunotransferencia Western con anti-fosfotirosina (PDGF y VEGF) y para anti-fosfo-Erk1/2, Akt y STAT3 (PDGF, VEGF, EGF, bFGF e IGF-1), como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 3A muestra que, como se describe en la Tabla 1, el tratamiento de células privadas de alimento con PDGF o VEGF dio como resultado la potente estimulación de la fosforilación de tirosina del receptor, y que el tratamiento con GFB204 inhibió esta estimulación con valores IC_{50} de 190 nM y 480 nM, respectivamente. De forma similar, la estimulación por PDGF y VEGF de Erk1 y Erk2 también se inhibió con valores IC_{50} similares. Adicionalmente, esta inhibición fue selectiva por cuanto GFB204 bloqueó la estimulación por PDGF y VEGF, pero tuvo poco efecto sobre la estimulación por EGF, bFGF e IGF-1, de la fosforilación de Erk1, Erk2, Akt y STAT3 (Figura 3B).

Ejemplo 4

GFB204 inhibe la angiogénesis in vitro e in vivo, y suprime el crecimiento de tumores humanos en ratones atímicos

La capacidad de GFB204 para inhibir potente y selectivamente la unión del ligando PDGF y VEGF al receptor y la señalización subsiguiente alentó a determinar si este agente podría inhibir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* e inhibir subsiguientemente el crecimiento tumoral. En primer lugar, se determinó si GFB204 podría inhibir la angiogénesis *in vitro* evaluando su capacidad para suprimir la formación de redes capilares endoteliales de cerebro humano inducida por VEGF, como se describe en Materiales y Métodos. GFB204 fue altamente eficaz inhibiendo la formación de redes capilares inducida por VEGF, con un valor IC_{50} de 700 nM (Figura 4C). Después se determinó la capacidad de GFB204 para inhibir la migración de células endoteliales de cerebro humano como se describe en Materiales y Métodos. GFB204 inhibió la migración de células endoteliales inducida por VEGF a través de poros de matrigel en la cámara inferior, con un valor IC_{50} de 600 nM (Figura 4B).

La capacidad de GFB204 para inhibir la unión de VEGF y PDGF a sus receptores y la señalización subsiguiente, acoplado con su capacidad para inhibir la migración de células endoteliales y la formación de redes capilares inducidas por VEGF, sugirió que GFB204 puede inhibir la angiogénesis y la tumorigénesis en animales completos. Por lo tanto, a continuación se evaluó si GFB204 es capaz de suprimir el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo* implantando subcutáneamente células A-549 de cáncer de pulmón humano en ratones atímicos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100 mm^3 , los ratones se trataron con vehículo o GFB204, y 3 semanas más tarde los tumores se retiraron y se procesaron para inmunotinción con CD31 para determinar los efectos antiangiogénicos de GFB204 como se describe en Materiales y Métodos. Los tumores de los animales del control crecieron hasta un tamaño medio de $749 \pm 111 \text{ mm}^3$ (Figura 6). Por el contrario, los tumores de animales tratados con GFB204 crecieron hasta un tamaño medio de sólo $650 \pm 114 \text{ mm}^3$ (GFB204; 1 mg/kg), y $284 \pm 108 \text{ mm}^3$ (GFB204; 5 mg/kg), respectivamente. De este modo, el tratamiento con GFB204 dio como resultado una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del crecimiento tumoral a 5 mg/kg (73%), pero no a 1 mg/kg (15%). Las secciones tumorales de animales tratados con GFB204 muestran una inhibición significativa de la tinción con CD31 (Figuras 5A-5C). La cuantificación de los microvasos a un aumento de campo (400X) indicó que los tumores de ratones tratados con vehículo contenían $11,3 \pm 1,9$ microvasos, mientras que los de los ratones tratados con GFB204 (5 mg/kg) tuvieron sólo $2,6 \pm 0,9$ microvasos. Tomados en conjunto, los resultados demuestran claramente que GFB204 inhibe el crecimiento tumoral y angiogénesis *in vivo* de xenoinjertos A-549.

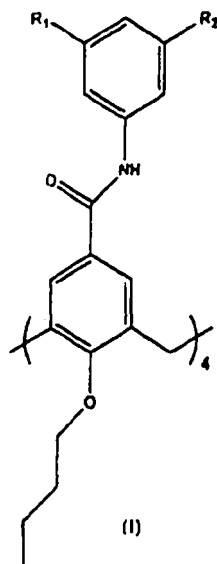
El estricto requisito y la dependencia restrictiva del crecimiento tumoral con la angiogénesis ha alentado a muchos investigadores a diseñar estrategias para la terapia contra el cáncer interrumpiendo la angiogénesis, dando como resultado la privación de nutrientes a las células del cáncer, y esencialmente la muerte por falta de alimentos del tumor (Zhang, W. *et al.* *Angiogenesis*, 2002, 5:35-44; Ferrara, N. *Semin Oncol*, 2002, 29:10-4; Jain, R.K. *Semin Oncol*, 2002, 29:3-9; Morin, M.J. *Oncogene*, 2000, 19:6574-83; Miao, R.Q. *et al.* *Blood*, 2002, 100:3245-52; Laird, A.D. *et al.* *Cáncer Res*, 2000, 60:4152-60; Wedge, S.R. *et al.* *Cáncer Res*, 2000, 60:970-5; Relf, M. *et al.* *Cáncer Res*, 1997, 57:963-9; Huang, J. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:7785-90; Blaskovich, M.A. *et al.* *Nat Biotechnol*, 2000, 18:1065-70). Aunque la selección de la angiogénesis como diana como un enfoque para la terapia contra el cáncer se sugirió hace décadas, sólo muy recientemente la FDA ha aprobado el primer fármaco diseñado para seleccionar como diana una etapa en el proceso complejo de la angiogénesis (Ferrara, N. *Semin Oncol*, 2002, 29:10-4). De hecho, AVASTINA, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado, ha mostrado actividad frente a cáncer de colon metastásico. Aunque esencial para proporcionar la prueba de concepto para la selección de la angiogénesis como diana en seres humanos, este enfoque no se ha explotado completamente. Una mejora que se busca es diseñar estrategias que se dirijan simultáneamente contra diferentes etapas en el proceso angiogénico (Bergers, G. *et al.* *J Clin Invest*, 2003, 111:1287-95; Relf, M. *et al.* *Cáncer Res*, 1997, 57:963-9; Huang, J. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:7785-90). Se ha desarrollado un nuevo agente farmacológico sintético que inhibe la función tanto de VEGF como de PDGF, factores de crecimiento que se ha mostrado que median la iniciación y mantenimiento de nuevos vasos sanguíneos, respectivamente (Bergers, G. *et al.* *J Clin Invest*, 2003, 111:1287-95; Dvorak, H.F. *J Clin Oncol*, 2002, 20:4368-80; Ferrara, N. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:1-30; Dvorak, H.F. *et al.* *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:97-132; Eriksson, U. y Alitalo, K. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 237:41-57). Éste es el primer informe de un agente que inhibe la unión tanto de VEGF como de PDGF a sus receptores y suprime subsiguientemente la fosforilación de tirosina y las rutas de señalización aguas abajo (Erk, Akt y STAT3). GFB204 también bloqueó potentemente la capacidad de las células endoteliales para migrar ($IC_{50} = 600$ nM), así como su capacidad para formar capilares *in vitro* ($IC_{50} = 700$ nM). El tratamiento s.c. *in vivo* de ratones que poseen tumores humanos condujo a la inhibición de la formación de vasos sanguíneos alrededor de la masa tumoral, así como a la inhibición del crecimiento del tumor. Aunque GFB204 inhibió potentemente la unión tanto de VEGF como de PDGF a sus receptores (200-500 nM), no fue un interruptor no específico de toda la unión ligando/receptor, puesto que la unión de EGF a su receptor no se vio afectada a dosis tan elevadas como 100 μ M. Un apoyo adicional para la selectividad se proporcionó demostrando que GFB204 inhibió la activación de Erk1, Erk2, Akt y STAT3 por PDGF y VEGF, pero no por EGF, bFGF o IGF-1.

La identificación de derivados de calix[4]areno capaces de bloquear la unión tanto de VEGF como de PDGF a sus receptores es un enfoque completamente nuevo para seleccionar como diana a la señalización de tirosina cinasas receptoras. Aunque el anticuerpo anti-VEGF AVASTINA también bloquea la unión de VEGF a su receptor (Zhang, W. *et al.* *Angiogenesis*, 2002, 5:35-44; Ferrara, N. *Semin Oncol*, 2002, 29:10-4), aparentemente no hay ningún otro agente que bloquee la unión tanto de PDGF como de VEGF a sus receptores. Además, la ventaja de GFB204 con respecto a AVASTINA es que GFB204 es una molécula mucho más pequeña que se puede sintetizar fácilmente a un bajo coste, a diferencia de los métodos laboriosos y caros implicados en la generación de anticuerpos con fines terapéuticos. Aunque antes de este documento no había inhibidores duales de la unión de VEGF y PDGF a sus receptores, se han obtenido inhibidores duales de tirosina cinasas receptoras de VEGF y PDGF, y algunos están en ensayos clínicos (Kerbel, R.S. *Carcinogenesis*, 2000, 21:505-15; Jain, R.K. *Semin Oncol*, 2002, 29:3-9; Morin, M.J. *Oncogene*, 2000, 19:6574-83; Miao, R.Q. *et al.* *Blood*, 2002, 100:3245-52; Laird, A.D. *et al.* *Cáncer Res*, 2000, 60:4152-60; Wedge, S.R. *et al.* *Cáncer Res*, 2000, 60:970-5).

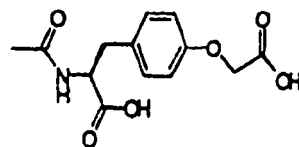
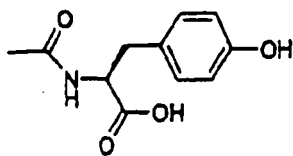
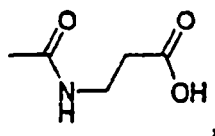
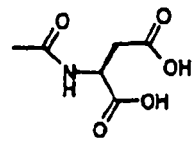
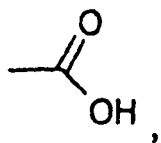
Hay diferencias marcadas entre estos imitadores de ATP y GFB204. Mientras que la diana para GFB204 es la interacción ligando/receptor que se produce extracelularmente en la superficie exterior de la célula, los imitadores de ATP seleccionan como diana los dominios de tirosina cinasas de los receptores, que son intracelulares. Por lo tanto, a diferencia de GFB204, los inhibidores de cinasas deben entrar en las células para alcanzar su diana. Además, la mayoría de los inhibidores de tirosina cinasas seleccionan como diana el sitio de unión de ATP, cuyas variaciones son ubicuas en las células. Por lo tanto, el resultado de tratar pacientes con GFB204 puede ser muy diferente de aquél de tratar pacientes con un imitador de ATP que selecciona como diana tirosina cinasas receptoras tanto de PDGF como de VEGF. Ya se están preparando estudios preclínicos avanzados para una aplicación de IND para el ensayo de fase I de GFB204 en seres humanos.

REIVINDICACIONES

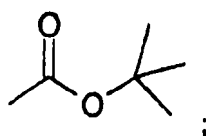
1. Compuesto que se une a un factor de crecimiento según la estructura calixarénica (I):



en la que cada R1 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en:

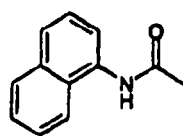
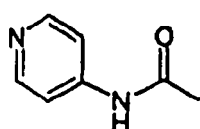
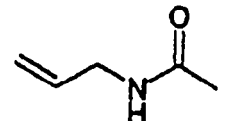
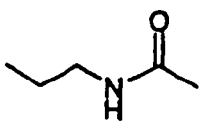
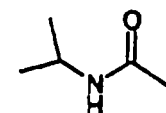
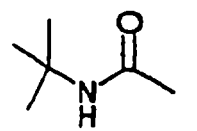
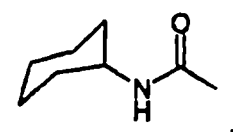
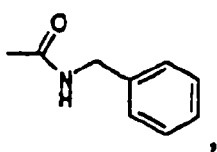
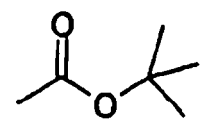
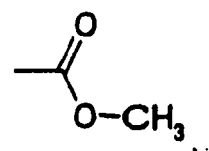
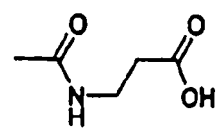
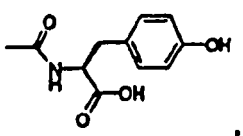
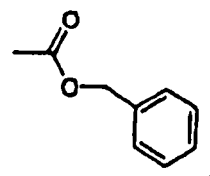
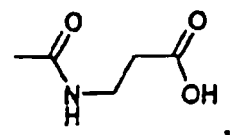
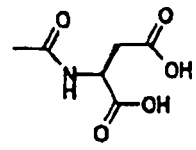
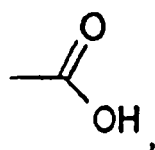


y



ES 2 339 951 T3

en la que cada R2 se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en:

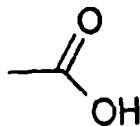


2. Compuesto que se une a factores de crecimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto selecciona como dianas a factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento endoteliales vasculares, o una mezcla de los mismos.

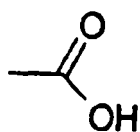
ES 2 339 951 T3

3. Compuesto que se une a un factor de crecimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto es un compuesto según la estructura (I), en la que:

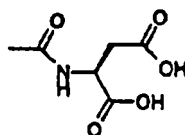
cada R1 es



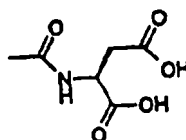
y cada R2 es



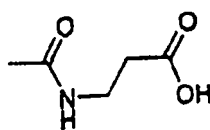
cada R1 es



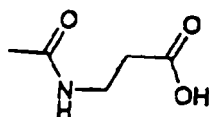
y cada R2 es



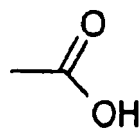
cada R1 es



y cada R2 es

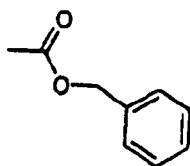


cada R1 es

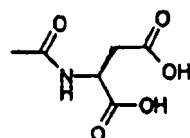


ES 2 339 951 T3

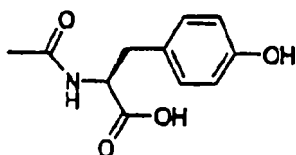
y cada R2 es



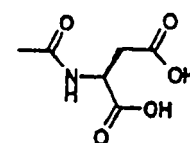
cada R1 es



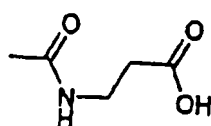
y cada R2 es



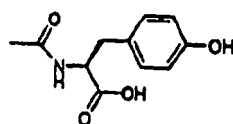
cada R1 es



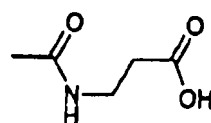
y cada R2 es



cada R1 es

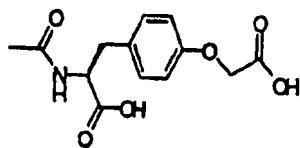


y cada R2 es



cada R1 es

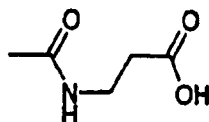
5



10

y cada R2 es

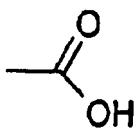
15



20

cada R1 es

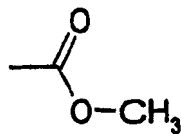
25



30

y cada R2 es

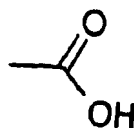
35



40

cada R1 es

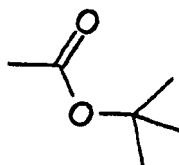
45



50

y cada R2 es

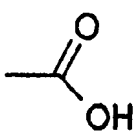
55



60

cada R1 es

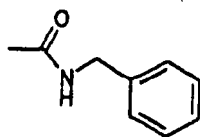
65



ES 2 339 951 T3

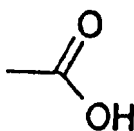
y cada R2 es

5



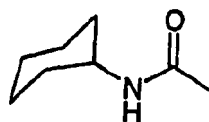
10 cada R1 es

15



20 y cada R2 es

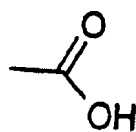
20



25

30 cada R1 es

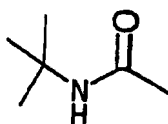
30



35

40 y cada R2 es

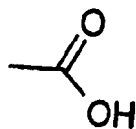
40



45

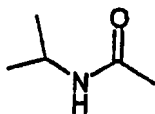
50 cada R1 es

50



55 y cada R2 es

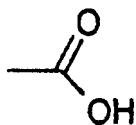
60



65

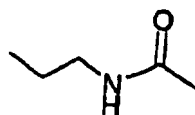
cada R1 es

5



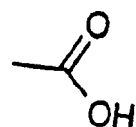
10 y cada R2 es

15



cada R1 es

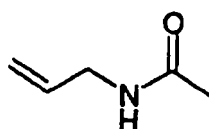
20



25

y cada R2 es

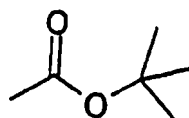
30



35

cada R1 es

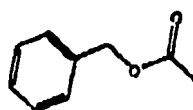
40



45

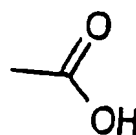
y cada R2 es

50



cada R1 es

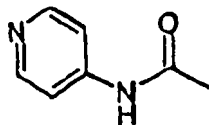
55



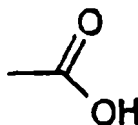
60

65

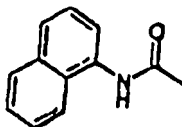
y cada R2 es



cada R1 es

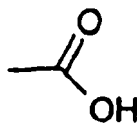


y cada R2 es

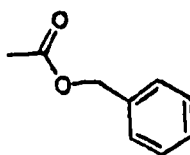


4. Compuesto que se une a un factor de crecimiento según la reivindicación 3, en el que:

cada R1 es



y cada R2 es



5. Composición farmacéutica que comprende el compuesto que se une a un factor de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Compuesto que se une a un factor de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

7. Uso de un compuesto que se une a un factor de crecimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que comprende exceso de proliferación celular, exceso de angiogénesis, un tumor, cáncer, o una combinación de los mismos.

8. Método *in vitro* para inhibir la unión de factores de crecimiento a las células, para inhibir la fosforilación estimulada por factores de crecimiento, para inhibir la angiogénesis, para inhibir el crecimiento de cánceres y de tumores, o una combinación de los mismos, que comprende la etapa de: poner en contacto el compuesto que se une a un factor de crecimiento según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable.

9. Método *in vitro* según la reivindicación 8, en el que se inhibe la fosforilación de Erk1, Erk2, Akt, o STAT3.

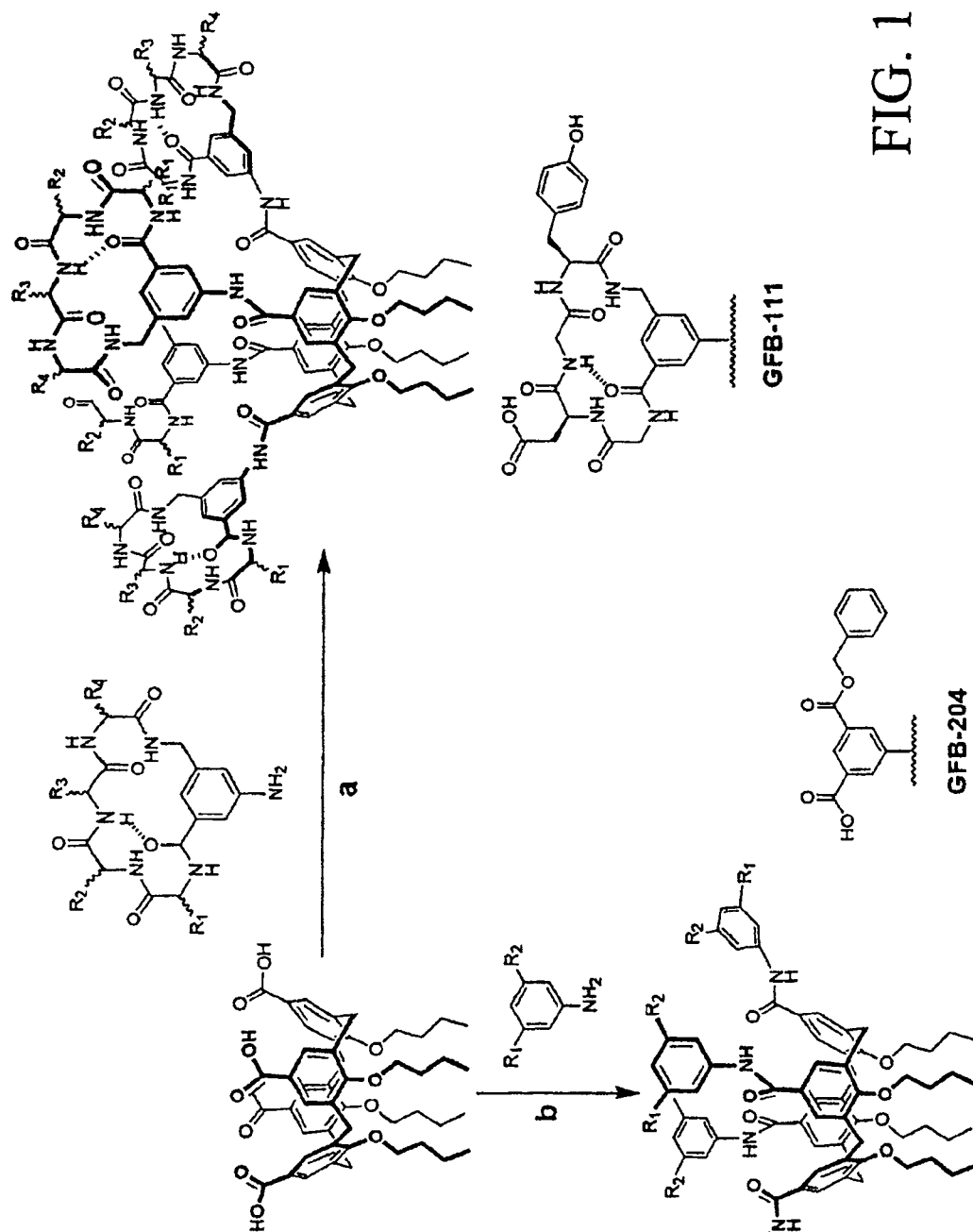


FIG. 1

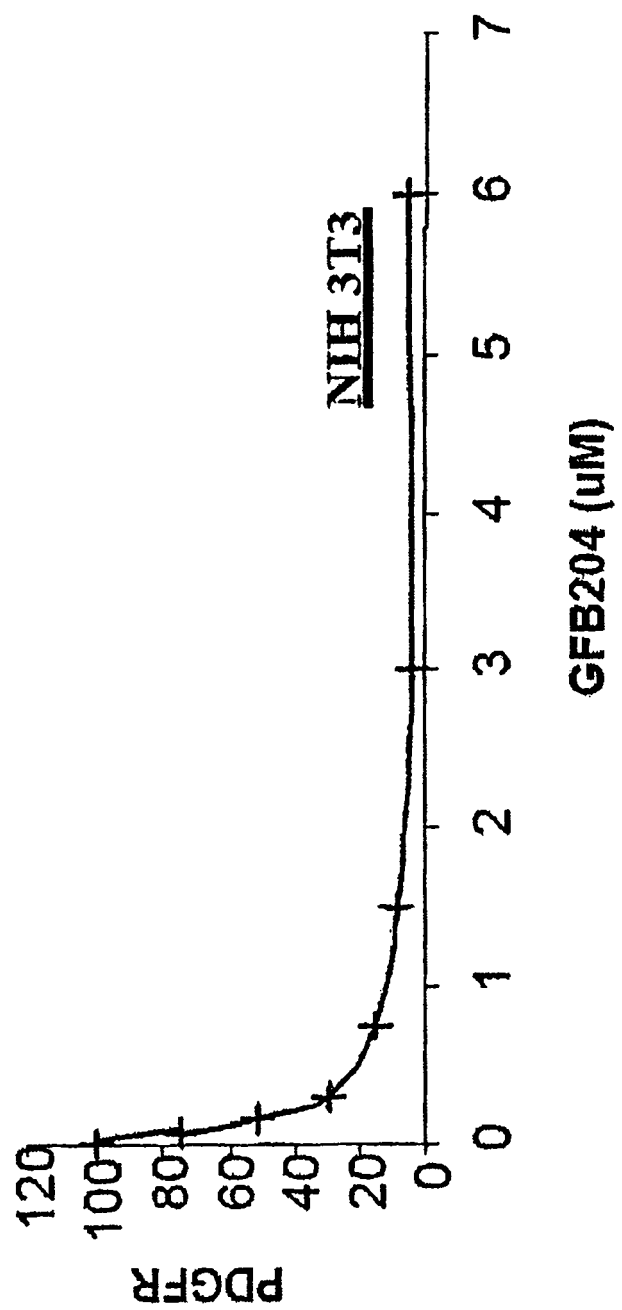


FIG. 2A

FIG. 2B

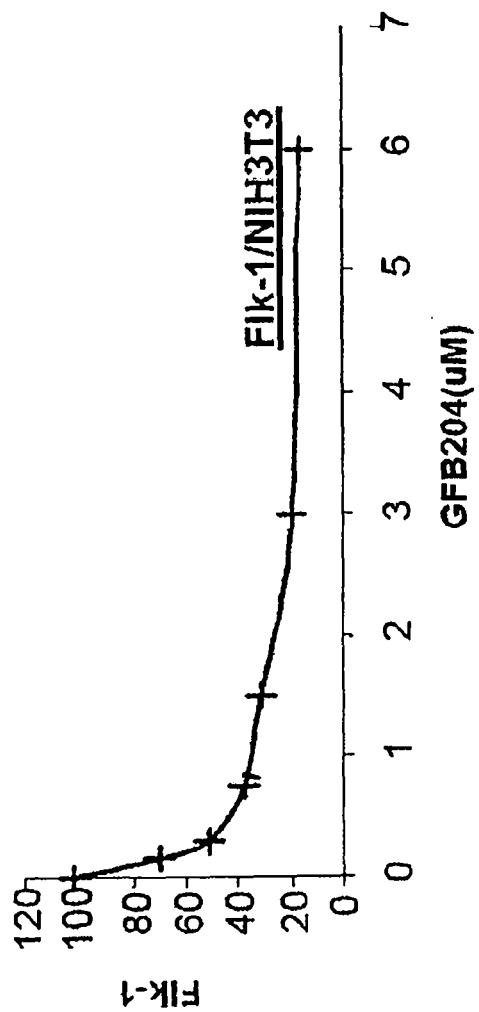
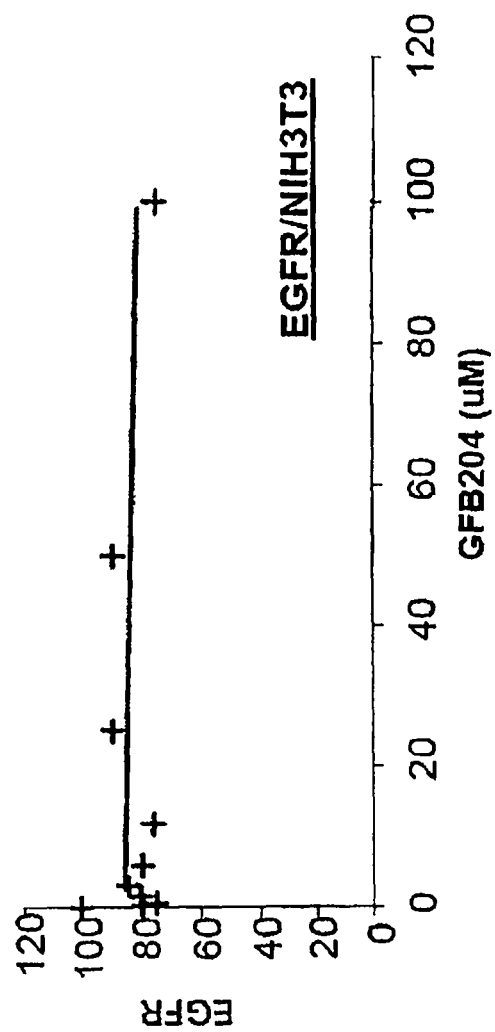


FIG. 2C



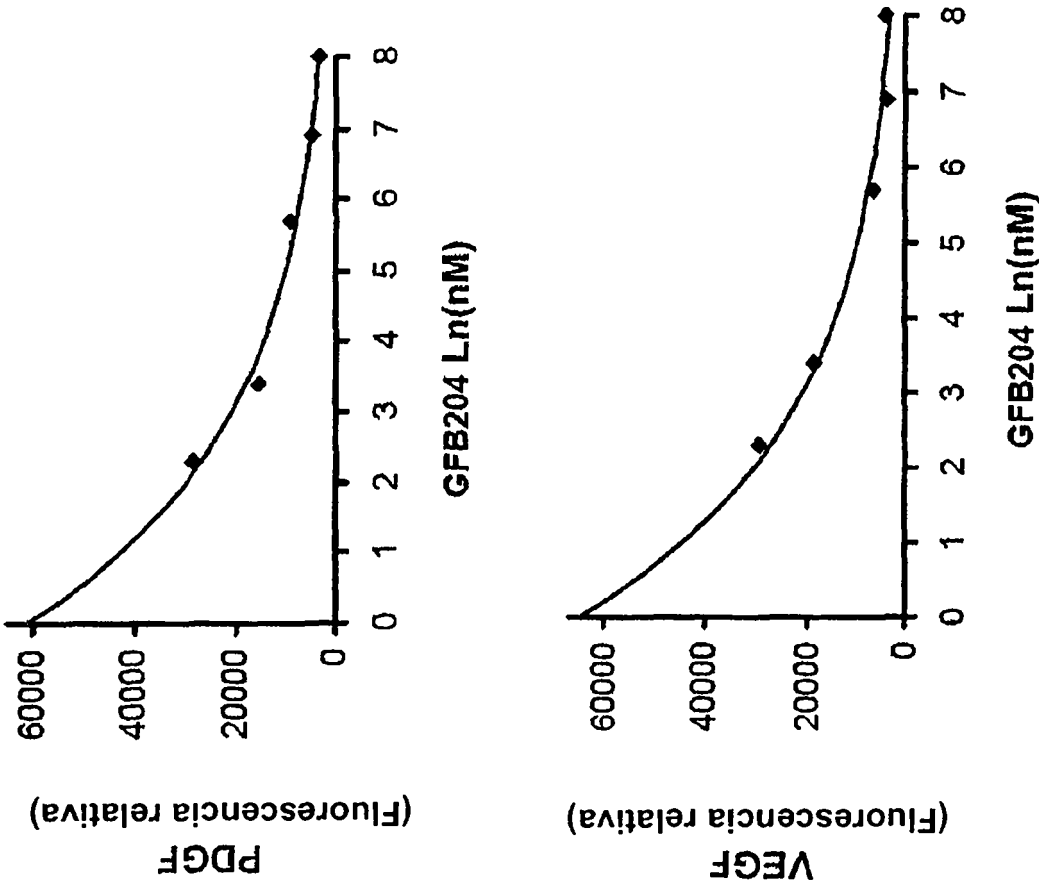


FIG. 2D

FIG. 2E

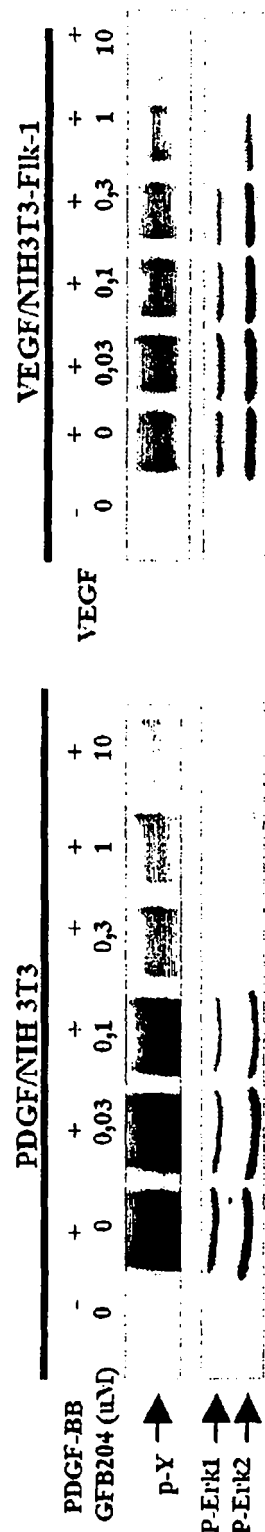


FIG. 3A

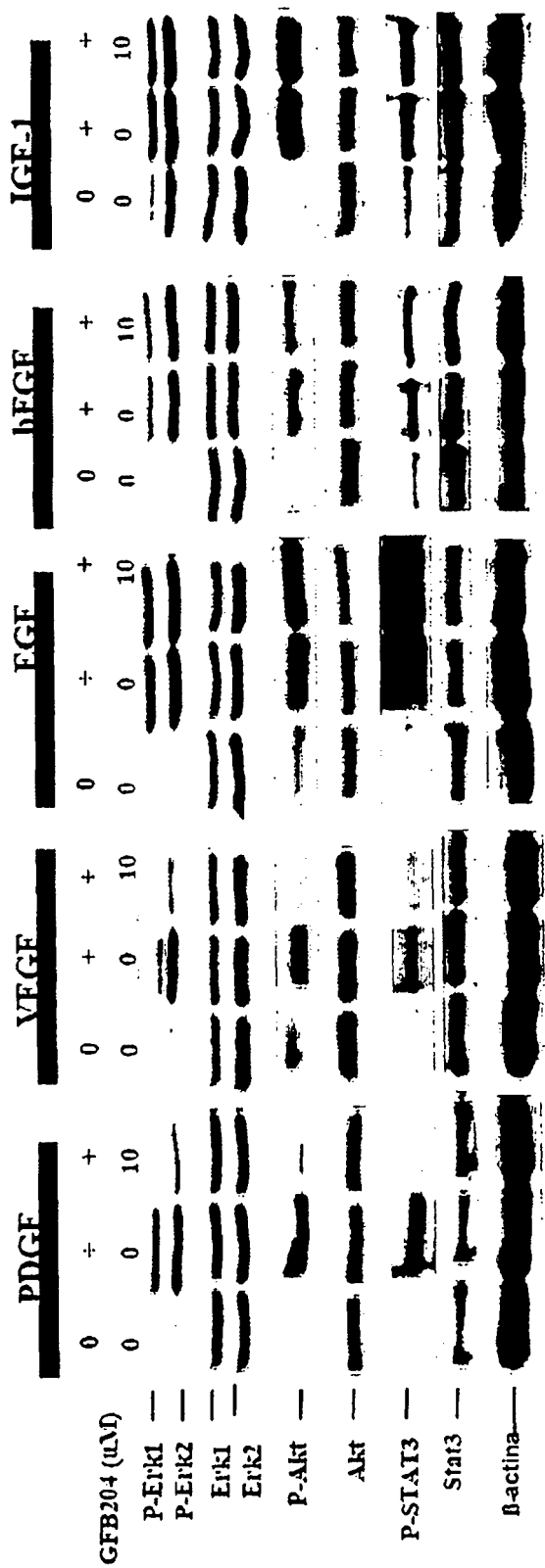


FIG. 3B

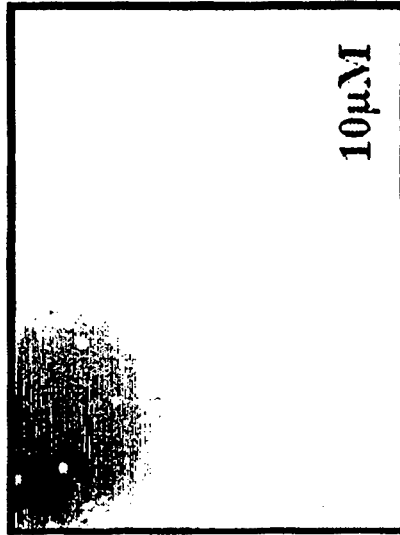


FIG. 4B

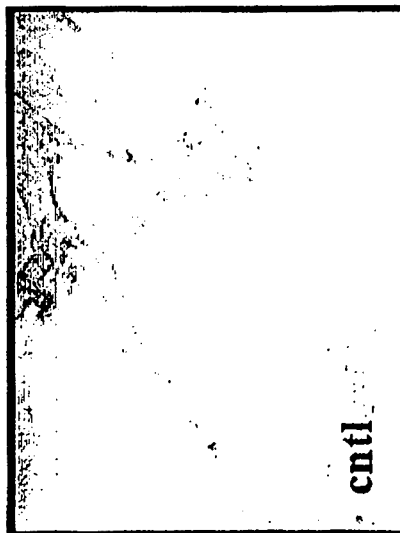


FIG. 4A

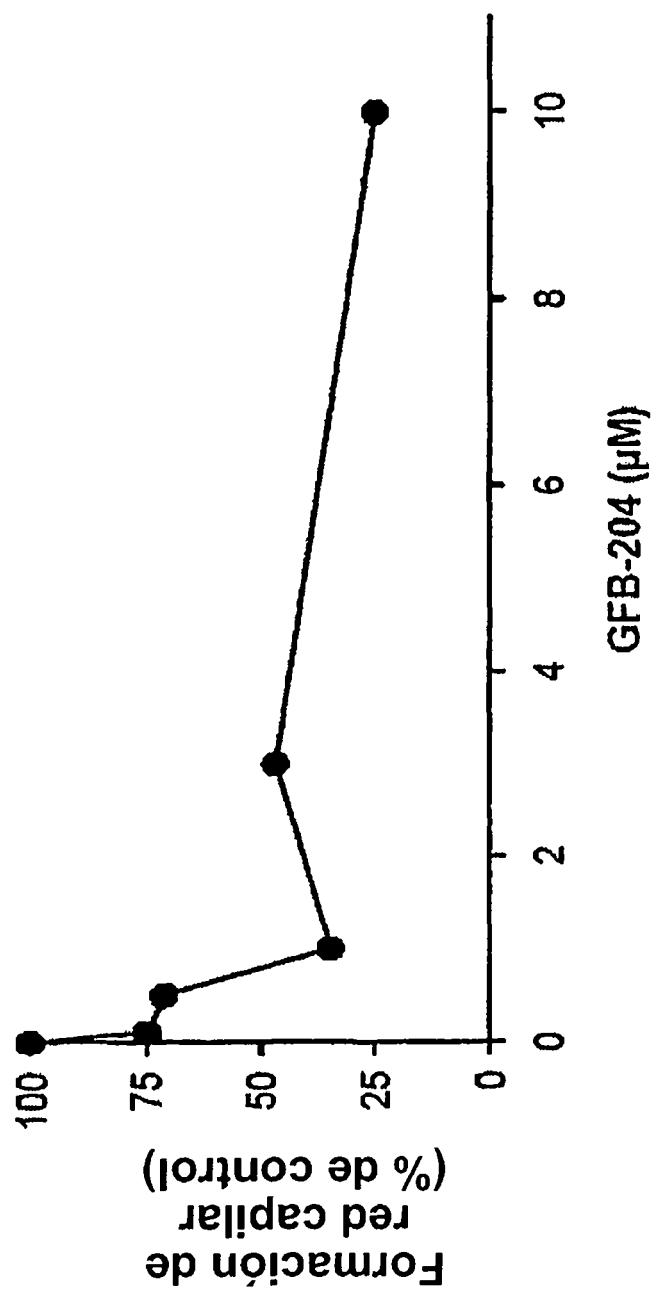


FIG. 4C

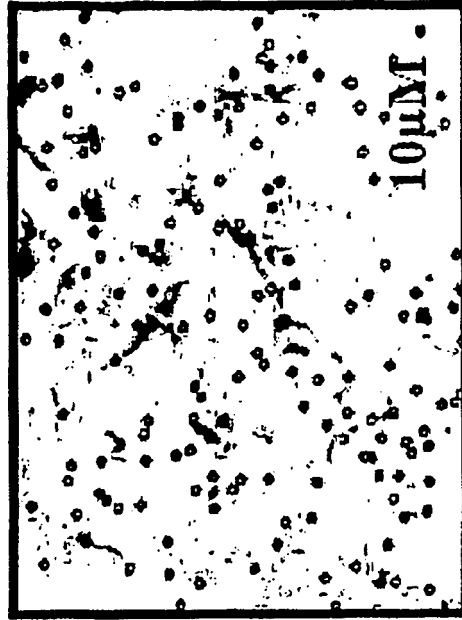


FIG. 5B



FIG. 5A

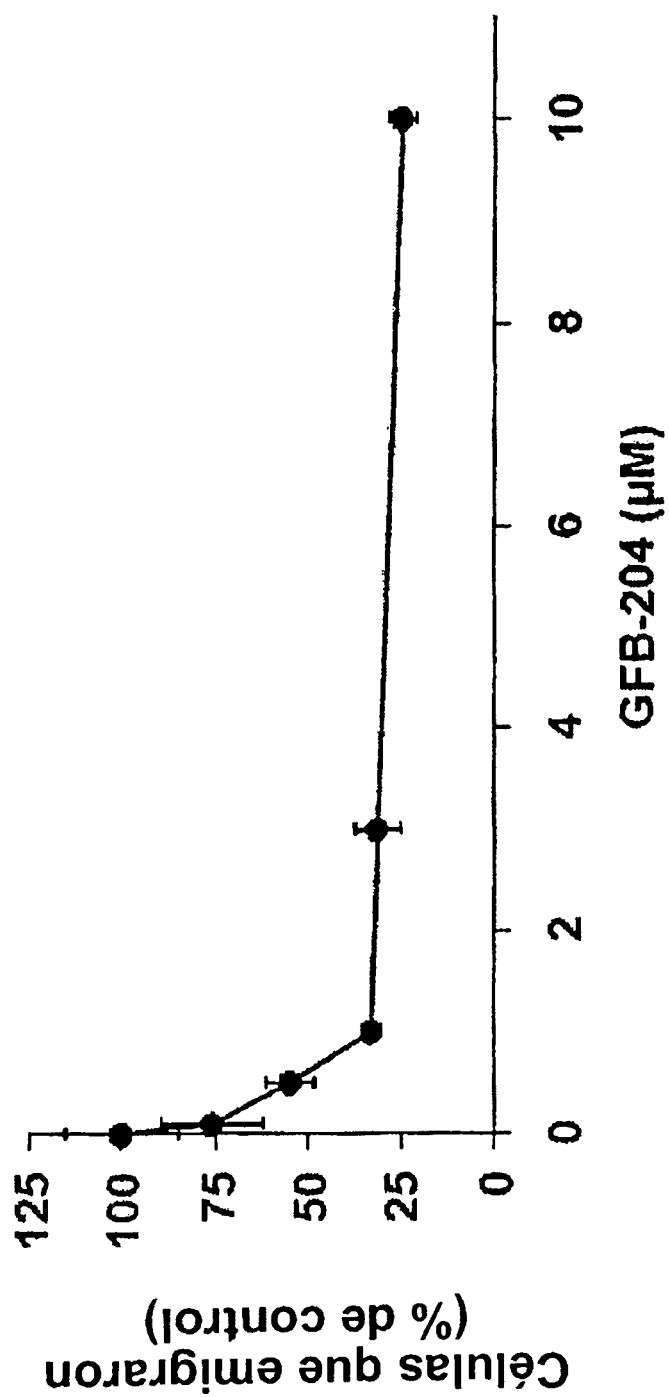


FIG. 5C

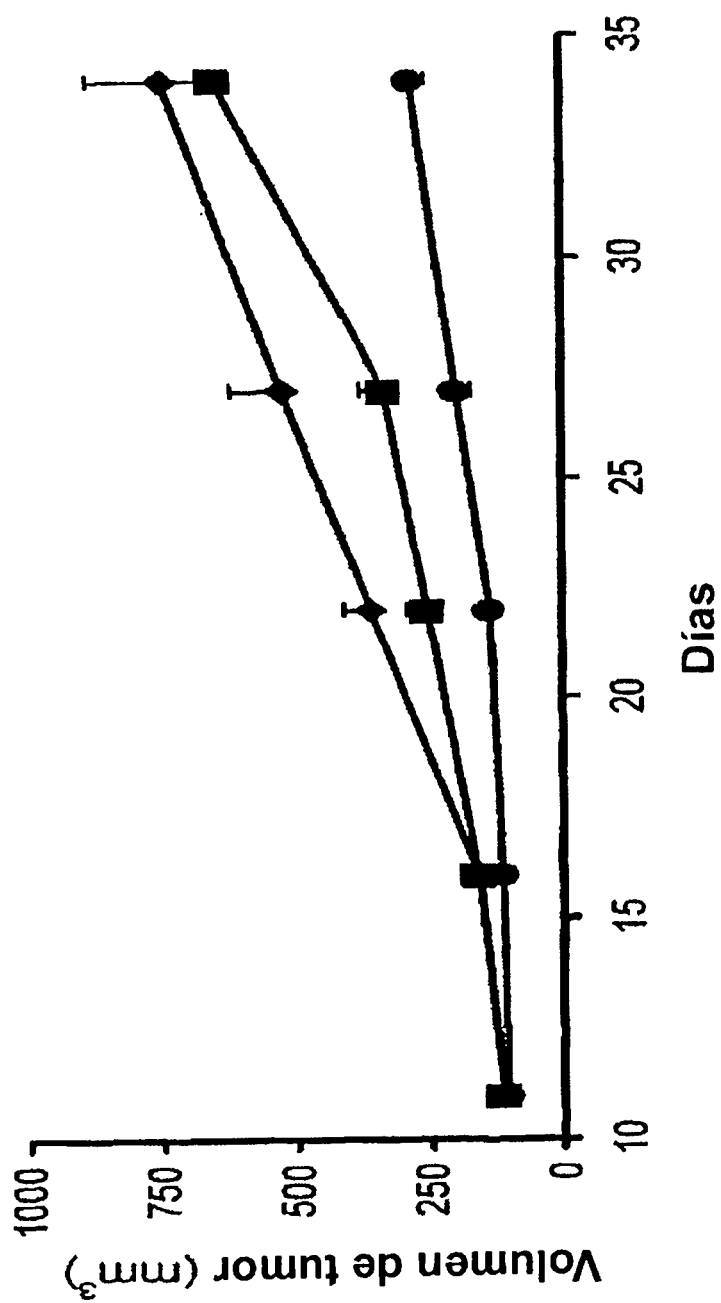


FIG. 6



FIG. 7B



FIG. 7A