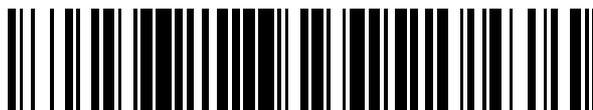


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 510**

51 Int. Cl.:

C07D 221/22 (2006.01)

A61K 31/439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2009 E 09760526 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2364299**

54 Título: **Ésteres de bis[O-(14-benzoilacoina-8-ilo)]**

30 Prioridad:

01.12.2008 EP 08170379

01.12.2008 US 118673 P

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

07.03.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

(100.0%)

146, rue Léo-Saignat

33076 Bordeaux Cedex, FR

72 Inventor/es:

BOSC, JEAN-JACQUES;

JARRY, CHRISTIAN;

CHODOEVA, AINURA;

GUILLON, JEAN;

FORFAR, ISABELLE y

ROBERT, JACQUES

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 397 510 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

Ésteres de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)].

5 La presente invención se refiere a unos compuestos nuevos que son alcaloides relacionados con el grupo [O-(14-benzoilaconina-8-ilo)].

La invención se refiere además a un procedimiento para la producción de estos compuestos, a los medicamentos que contienen estos compuestos, y a su uso en el tratamiento del cáncer.

10 A pesar de la gran variedad de fármacos antineoplásicos disponibles actualmente, el estudio y la identificación de nuevas sustancias naturales extraídas de las plantas y que presentan una actividad antiproliferativa sigue siendo una prioridad. A este respecto, sólo se han estudiado un pequeño número de plantas disponibles, y la biodiversidad natural ofrece un terreno ilimitado para el descubrimiento de potenciales fármacos antineoplásicos.

15 Además, se debe señalar que actualmente en la medicina tradicional se utilizan muchos extractos de plantas cuyos principios activos nunca se han aislado e identificado. Entre los nuevos fármacos, se ha descrito que los productos naturales y los derivados semisintéticos de los alcaloides presentan una actividad antiproliferativa.

20 Un ejemplo de estos fármacos naturales es una planta medicinal tradicional que crece en la República de Kirguistán y de la que se ha realizado un cribado preliminar. Para ser más exactos, esta planta pertenece al género *Aconitum*, familia de las Ranunculáceas y se ha seleccionado para una investigación detallada debido a que en este país se ha utilizado tradicionalmente durante muchos años contra el cáncer. De hecho, las raíces de la *Aconitum karakolicum* se han utilizado en algunas prescripciones contra el cáncer en la medicina tradicional kirguís.

25 *Aconitum karakolicum* Rapcs es una planta herbácea perenne que presenta un tallo largo con hojas (70-130 cm) con unas flores zigomorfas violetas o azules en largos racimos compactos. La parte subterránea de la planta presenta unos tubérculos de forma cónica que miden 2,0-2,5 x 0,7-1,0 cm, y que crecen enganchándose unos a otros. La planta *Aconitum karakolicum* es endémica de Asia Central.

30 Todas las partes de las especies de las *Aconitum* contienen alcaloides del grupo diterpenoide. El contenido máximo de alcaloides se ha encontrado en los tubérculos después del periodo de vegetación (Agosto-Octubre).

Los principales alcaloides identificados en esta planta son:

- 35
- aconitina (0,8-1%), que como es bien sabido presenta una toxicidad elevada y produce unos efectos tanto centrales como periféricos mediante un mecanismo que evita el cierre normal de los canales de sodio,
 - karakolina (0,05%)
 - karakolidina (0,05%)

40

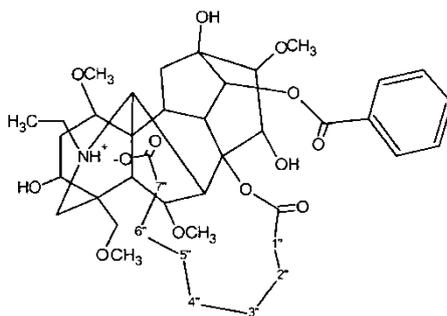
 - zongorina (0,1%), y
 - zongoramina (0,01%).

También se han identificado nopalina, aconifina, acetilnopalina y karakonitina.

45 Pero se ha encontrado que ninguno de estos compuestos presenta una actividad antiproliferativa, mientras que los extractos de plantas sí.

50 Por consiguiente, se ha llevado a cabo un estudio para aislar e identificar los compuestos presentes en los extractos de las raíces de *A. Karakolicum*, que son los responsables de esta actividad y se ha descrito con detalle en la publicación de A. Chodoeva et. al., titulada "8-O-Azeloil-14-benzoylconine: A new alkaloid from the roots of *Aconitum karakolicum* Rapcs and his proliferative activities"; *Bioorg. Med. Chem.* (2005), 13, 6403-6501.

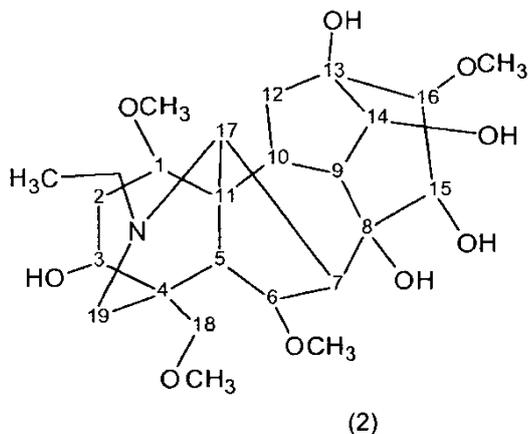
De hecho, esta publicación da a conocer un nuevo compuesto: 8-O-azeloil-14-benzoilaconina, que presenta la estructura siguiente (1):



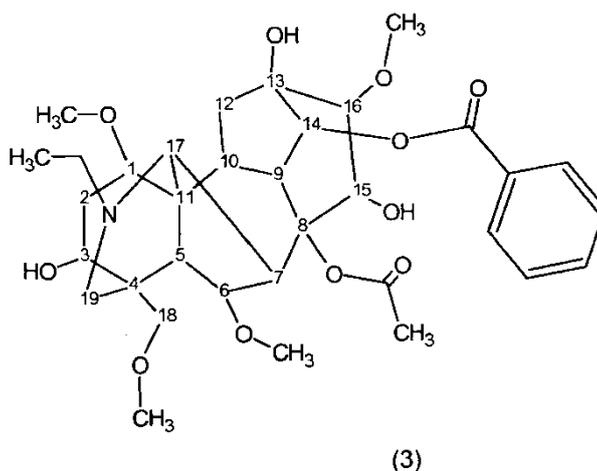
(1)

El compuesto 8-O-azeloil-14-benzoilaconina no se había descrito nunca antes en la literatura sobre química, aunque sí que se habían descrito previamente varios ésteres grasos de aconina en Wie, X; Xie, H; Liu, M; Ge, X., *Heterocycles* (2000), 53, 2027.

- 5 La aconina, que por sí misma está desprovista de actividad antiproliferativa, presenta la estructura siguiente (2):



- 10 La aconitina, que se ha mencionado anteriormente, es un derivado de la aconina y presenta la estructura siguiente (3):



- 15 El compuesto 8-O-azeloil-14-benzoilaconina con la fórmula general $C_{41}H_{59}NO_{13}$ es un derivado de la aconitina, porque es el resultado de la sustitución del grupo acetilo por un grupo acilo azelaídico en el carbono 8 del esqueleto de la aconitina.

- 20 Una característica del compuesto 8-O-azeloil-14-benzoilaconina reside en su estructura zwitteriónica entre la carga negativa de la función carboxilato en el extremo de la cadena del ácido azelaico y la carga positiva del amonio cuaternario que se forma en el átomo de nitrógeno del compuesto heterocíclico. Dada la longitud de la cadena azelaica, se puede postular un enlace iónico interno entre estos dos grupos.

- 25 Con respecto al ácido azelaico, se ha demostrado que es un inhibidor de las oxidoreductasas mitocondriales en las células tumorales (Picardo, M.; Passi, S.; Sirlanni, M. C.; Fiorilli, M.; Russo, G. D.; Cortesi, E.; Barile, G.; Breathnach, A. S.; NazzaroPorro, M.; *Biochem. Pharmacol.* (1985), 34, 1653).

- 30 Como consecuencia, el ácido azelaico se propuso como un agente antitumoral general (Breathnach, A. S., *Med. Hypotheses*, (1999), 52, 221).

No se ha ensayado nunca el ácido azelaico en un panel de cribado *in vitro* del NCI, pero se han realizado algunos experimentos *in vivo* en tumores en ratones, que han finalizado con una ausencia total de la actividad antitumoral.

- 35 La actividad antiproliferativa observada en 8-O-azeloil-14-benzoilaconina no se puede, por consiguiente, atribuir a la

actividad de sus constituyentes individuales.

Sin embargo, según la publicación mencionada anteriormente A. Chodoeva et. al., se ha descubierto que 8-O-azeloil-14-benzoilaconina es la responsable de la actividad antiproliferativa *in vitro* frente a tres líneas de células tumorales humanas en cultivos, que eran:

- HTC-15 (cáncer de colon)
- A549 (cáncer de pulmón)
- MCF-7 (cáncer de mama)

Su CI_{50} fue de aproximadamente 10-18 μM en estas tres líneas celulares, lo cual concuerda con la actividad de los fármacos antineoplásicos más importantes pertenecientes a varias clases (es decir, antimetabolitos, agentes alquilantes, compuestos de platino, inhibidores de la topoisomerasa).

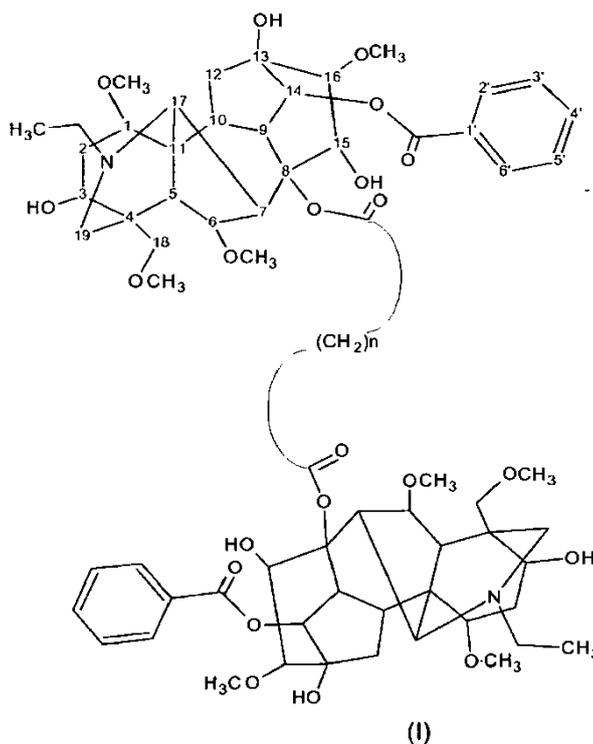
Tal como se ha indicado anteriormente, se están buscando intensamente nuevos compuestos que presenten actividad antiproliferativa frente a las células tumorales humanas.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención era mejorar el diseño de 8-O-azeloil-14-benzoilaconina, que ha demostrado poseer unas propiedades muy interesantes y prometedoras frente al cáncer y proporcionar unos compuestos nuevos que sean útiles en la quimioterapia contra el cáncer.

Según la invención, este objetivo se resuelve en primer lugar proporcionando unos compuestos nuevos útiles en la quimioterapia contra el cáncer, que son alcaloides relacionados con el grupo [O-(14-benzoilaconina-8-ilo)].

Más exactamente, estos compuestos nuevos son ésteres de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)].

Por consiguiente, según la invención, se proporcionan unos compuestos nuevos que presentan la estructura general siguiente (I):

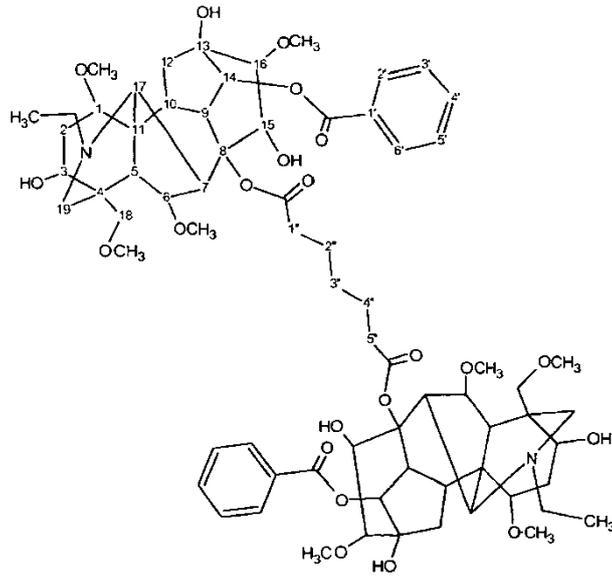


en la que n es igual a 5, 6 ó 7.

Por consiguiente, los compuestos preferidos según la invención son compuestos en los que:

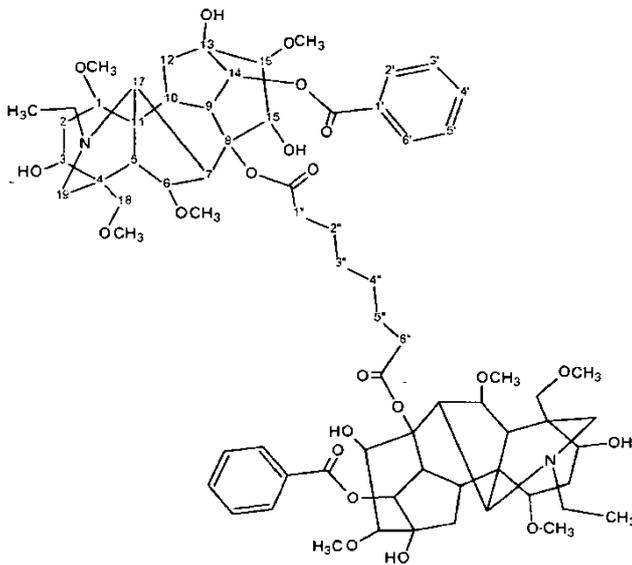
- n es 5, por lo que el compuesto es pimelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)], (es decir, PDD),
- n es 6, por lo que el compuesto es suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)], (es decir, SDD),
- n es 7, por lo que el compuesto es azelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)], (es decir, ADD).

Por consiguiente, el compuesto pimelato de bis[O-(14-benzoilacoinina-8-ilo)] presenta la estructura siguiente:



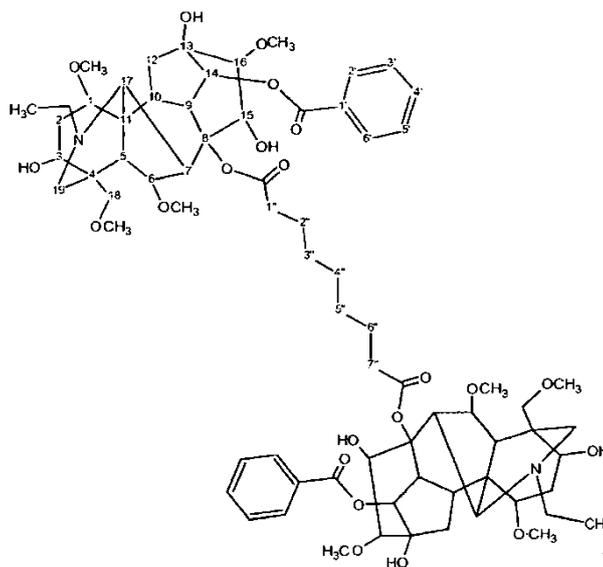
(5)

5 Por consiguiente, el compuesto suberato de bis[O-(14-benzoilacoinina-8-ilo)] (es decir, SDD) presenta la estructura siguiente:



(6)

10 Por consiguiente, el compuesto azelato de bis[O-(14-benzoilacoinina-8-ilo)] (es decir, ADD) presenta la estructura siguiente:



(7)

Otro objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un compuesto según la presente invención.

5 Los compuestos según la presente invención se obtienen mediante la transesterificación que se lleva a cabo en la funcionalidad del 8-acetilo que se encuentra en el grupo aconitina.

10 La reacción de aconitina se consigue a unos tiempos de reacción controlados y a una temperatura que impide la formación de productos de degradación y optimiza dicha reacción de transesterificación.

15 Esto conduce a los correspondientes ésteres de mono-[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] y bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)]. Por consiguiente, es necesaria una etapa de purificación para aislar los ésteres de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] según la presente invención.

Más exactamente, el procedimiento para la producción de un compuesto según la presente invención comprende las etapas siguientes:

- 20 a) agitar la aconitina con un ácido dicarboxílico a una temperatura igual o inferior a 80°C en un solvente como DMF,
 b) agitar la mezcla obtenida a temperatura ambiente de modo que se lleve a cabo la reacción de transesterificación,
 c) evaporar el solvente bajo una presión reducida,
 25 d) purificar el residuo oleoso obtenido al final de la etapa c) para aislar el compuesto según la presente invención.

Más preferentemente, el ácido dicarboxílico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en ácido pimélico, ácido subérico o ácido azelaico.

30 La agitación de la etapa a) se puede realizar a una temperatura comprendida entre 70°C y 80°C, y durante un tiempo suficiente para que la reacción tenga lugar, más preferentemente durante 7 horas.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la agitación de la etapa b) se realiza durante 16 horas para optimizar la reacción.

35 Más preferentemente, la evaporación del solvente en la etapa c) se realiza a una temperatura inferior a 70°C. En una forma de realización preferida de la presente invención, la purificación de la etapa d) se realiza mediante una cromatografía líquida semipreparativa de alta presión.

40 Las condiciones de esta cromatografía líquida semipreparativa de alta presión pueden ser las siguientes:

- Solvente A: ácido trifluoroacético/agua; en una proporción de 1/1000;

- Solvente B: ácido trifluoroacético/acetonitrilo, en una proporción de 1/1000.

Las condiciones de elución pueden consistir en una inyección de un volumen de 0,5 ml; gradiente de entre 25% de B a 100% en 30 minutos.

La absorbancia se controla a una longitud de onda de 234 nm.

Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención.

La composición farmacéutica puede comprender además un diluyente o una sustancia que actúe como vehículo adecuada farmacéuticamente aceptable.

Según la invención, la composición farmacéutica mencionada anteriormente puede estar presente en forma de comprimidos, cápsulas, gotas y supositorios, preparaciones para inyección o infusiones para su uso por vía oral, rectal o parenteral. Estas formas de administración y sus productos son conocidos por los expertos en la materia.

Además, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la presente invención para la fabricación de un medicamento.

Más exactamente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según la invención en el que el medicamento se utiliza para el tratamiento de enfermedades tumorales. Las enfermedades tumorales pueden ser cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de mama.

Los ejemplos siguientes ilustran con mayor detalle la presente invención.

Para empezar, se detallan las condiciones de las diferentes técnicas, que son:

- HPLC,
- espectroscopia de masa, y
- RMN.

Para todos los ejemplos, las condiciones utilizadas para la purificación mediante HPLC fueron las siguientes:

Columna utilizada: Ultrasep ES 10, RP 186.0 µm en fase inversa, columna C18, 250x10 mm (Bischoff, Alemania).

Solventes utilizados:

- A: ácido trifluoroacético/agua; en una proporción de 1/1000;
- B: ácido trifluoroacético/acetonitrilo; en una proporción de 1/1000.

Condiciones de la elución: inyección de un volumen de 0,5 ml ; gradiente de entre 25% de B a 100% en 30 minutos.

La absorbancia se controla a una longitud de onda de 234 nm.

Para todos los ejemplos, las condiciones de la espectroscopia de masa fueron las siguientes:

Las mediciones de la espectroscopia de masa ESI de alta resolución se realizaron en un espectrómetro de Applied Biosystems QStar mass que está provisto de una fuente de electrospray en modo positivo.

La aguja del electrospray se mantuvo a 5000 V y funcionó a temperatura ambiente.

Las muestras se introdujeron mediante inyección a través de un bucle de muestra de 10 µl a un flujo de 200 µl/minuto de metanol desde la bomba de CL.

Los análisis de MS² se realizaron con una energía de colisión dentro de un intervalo desde 30 a 50 y el gas de colisión CAD en un intervalo desde 5 a 10.

Para todos los ejemplos, las condiciones de la resonancia magnética nuclear (RMN) fueron las siguientes:

Los experimentos de RMN 1D y 2D se realizaron en un espectrómetro Bruker DPX400 a 400,13 y 100,6 MHz para los experimentos ¹H y ¹³C, respectivamente, provisto de una sonda de banda ancha de 5 mm y gradientes Bo. Todos los espectros se registraron utilizando 9 mg de una sustancia disuelta en 0,7 ml de CDCl₃. Se proporcionan los

cambios químicos en ppm en relación a la TMS. Los espectros bidimensionales de correlación (COSY) del cambio ^1H - ^1H se obtienen utilizando la secuencia de pulso COSY 90. Se hace referencia a Picardo, M.; Passi, S.; Sirlanni, M. C.; Fiorilli, M.; Russo, G. D.; Cortesi, E.; Barile, G.; Breathnach, A. S.; Nazzaro-Porro, M.; *Biochem. Pharmacol.* (1985), 34, 1653.

El tipo de carbono está definido por 2 experimentos 1D (DEPT 90 y 135). El espectro de la correlación del cambio químico (HMQC) de un enlace ^1H - ^{13}C se obtuvo según la secuencia Bax que utiliza los pulsos de gradiente Bo para la selección de ^1H acoplados a los carbonos ^{13}C . Se hace referencia a Breathnach, A. S. *Med Hypoth.* (1999), 52, 221.

El espectro de la correlación heteronuclear de enlaces múltiples de ^1H (HMBC) detectado se registró utilizando la secuencia de pulsos propuesta por Bax y Summers que implica un filtro Jn de paso bajo (3,8 ms) y un retraso para observar el acoplamiento de rango amplio (60 ms) como en el experimento de HMQC, los pulsos de gradiente Bo se aplicaron para seleccionar los ^1H acoplados al núcleo ^{13}C . Los espectros de gradiente NOESY seleccionados se adquirieron con un programa de pulso NOESYGPPH Broker.

A continuación, se detallan la síntesis y las características de tres compuestos según la presente invención.

A) pimelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (PPD)

Síntesis del compuesto:

Se mezclaron mediante agitación aconitina (200 mg, 0,30 mmol) y ácido pimélico (24 mg, 0,15 mmol) en DMF (5 mL) durante 7 horas a una temperatura 80°C. La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, el solvente se evaporó bajo presión reducida a una temperatura inferior a 70°C. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía líquida semipreparativa de alta presión.

Características RMN del compuesto obtenido:

Polvo blanco: espectro RMN ^1H (400,13 MHz CDCl_3) mostró δ : 8,1 (d, 4H, J = 7,6, H-2'/H-6'), 7,71 (t, 2H, J = 7,4, H-4'), 7,58 (t, 4H, J = 7,6, H-3'/H-5'), 5,04 (d, 2H, J = 4,4, H-14), 4,63 (d, 2H, J = 5,2, H-15), 4,44 (br s, 2H, H-3), 4,27 (br d, 2H, H-6), 3,92 (m^a, 2H, H-19b), 3,95 (s, 6H, 16-OCH₃), 3,67 (s, 2H, H-18b^a), 3,64 (m, 2H, H-1), 3,53 (s, 6H, 1-OCH₃), 3,48 (s, 2H, H-17), 3,47 (s, 6H, 18-OCH₃), 3,41 (s, 2H, 18a^a), 3,39 (br d, 2H, H-16), 3,36 (s, 6H, 6-OCH₃), 3,31 (m^a, 2H, H-19a), 3,33 (m^a, 4H, N-CH₂-CH₃), 3,08 (m^a, 2H, H-9), 3,06 (s, 2H, H-5), 2,74 (br d, 2H, H-7), 2,58 (br s, 2H, H-2b), 2,51 (br d, 2H, H-12b), 2,49 (m^a, 2H, H-10), 2,07 (d, 2H, J = 10, H-12a), 1,87 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)¹b, 8-CO₂-(CH₂)⁶b), 1,60 (m, 10H, 8-CO₂-(CH₂)¹a, 8-CO₂-(CH₂)⁵a, N-CH₂-CH₃, H-2a^a), 1,12 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)²b, 8-CO₂-(CH₂)⁴b), 0,95 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)²a, 8-CO₂-(CH₂)⁴a), 0,72 (quint, 2H, J = 7,2, 8-CO₂-(CH₂)³). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 174,9 (8-COO, 8-COO^{''}), 165,76 (C-7'), 133,8 (C-4'), 129,9 (C-2'/C-6'), 129,5 (C-1'), 129 (C-3'/C-5'), 90 (C-16), 89,98 (C-8), 82,48 (C-6), 79,83 (C-1), 78,12 (C-15), 78,45 (C-14), 75,79 (C-18), 74,02 (C-13), 69,9 (C-3), 63,12 (C-17), 62,01 (16-OCH₃), 59,3 (18-OCH₃), 59,05 (6-OCH₃), 55,36 (1-OCH₃), 50,63 (C-19), 50,42 (C-11), 50,38 (N-CH₂-CH₃), 45,0 (C-5), 43,42 (C-4), 43,47 (C-9), 41,91 (C-7), 40,09 (C-10), 35,01 (C-12), 34,27 (C-1', C-5''), 29,49 (C-2'', C-4''), 28,02 (C-2), 23,86 (C-3''), 10,99 (N-CH₂-CH₃).

B) suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (SDD)

Síntesis del compuesto:

Se mezclaron mediante agitación aconitina (200 mg, 0,30 mmol) y ácido subérico (26 mg, 0,15 mmol) en DMF (5 mL) durante 7 horas a una temperatura de 80°C. La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, el solvente se evaporó bajo presión reducida a una temperatura inferior a 70°C. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía líquida semipreparativa de alta presión.

Características del compuesto obtenido:

Polvo blanco: el espectro RMN ^1H (400,13 MHz CDCl_3) mostró δ : 8,00 (d, 4H, J = 7,8, H-2'/H-6'), 7,58 (t, 2H, J = 7,32, H-4'), 7,46 (t, 4H, J = 7,66, H-3'/H-5'), 5,04 (d, 2H, J = 4,9, H-14), 4,64 (d, 2H, J = 5,36, H-15), 4,43 (br s, 2H, H-3), 4,28 (d, 2H, J = 6,1, H-6), 3,97 (d, 2H, J = 12,96, H-19b), 3,94 (s, 6H, 16-OCH₃), 3,67 (s, 2H, H-18b^a), 3,64 (m, 2H, H-1), 3,53 (s, 6H, 1-OCH₃), 3,47 (s, 2H, H-17), 3,43 (s, 6H, 18-OCH₃), 3,41 (s, 2H, 18aa), 3,39 (d, 2H, J = 5,4, H-16), 3,36 (s, 6H, 6-OCH₃), 3,31 (d, 2H, J = 12,96, H-19a), 3,30 (ma, 4H, N-CH₂-CH₃), 3,10 (m, 2H, H-9), 3,07 (s, 2H, H-5), 2,74 (d, 2H, J = 6,1, H-7), 2,58 (br s, 2H, H-2b), 2,51 (br d, 2H, H-12b), 2,49 (m, 2H, H-10), 2,07 (d, 2H, J = 9,9, H-12a), 1,94 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)¹b, 8-CO₂-(CH₂)⁶b), 1,63 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)¹a, 8-CO₂-(CH₂)⁶a), 1,60 (t, 6H, J = 6,98, N-CH₂-CH₃), 1,56 (br d, 2H, H-2aa), 1,24 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)²b, 8-CO₂-(CH₂)⁵b), 1,09 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)²a, 8-CO₂-(CH₂)⁵a), 0,83 (m, 4H, 8-CO₂-(CH₂)³, 8-CO₂-(CH₂)⁴), RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 175,1 (8-COO, 8-COO^{''}), 165,8 (C-7'), 133,8 (C-4'), 129,9 (C-2'/C-6'), 129,5 (C-1'), 129 (C-3'/C-5'), 90 (C-16), 89,97 (C-8), 82,51 (C-6), 79,82 (C-1), 78,82 (C-15), 78,40 (C-14), 75,75 (C-18), 74,01 (C-13), 70 (C-3), 63,13, (C-17), 61,95 (16-OCH₃), 59,26 (18-OCH₃), 59,01 (6-OCH₃), 55,29 (1-OCH₃), 50,64 (C-19), 50,51 (C-11), 50,28 (N-CH₂-CH₃), 45,0 (C-5), 43,43 (C-4), 43,40 (C-9), 41,87 (C-7), 40,06 (C-10), 35,0 (C-12), 34,49 (C-1', C-6''), 29,50 (C-2), 28,54 (C-3'', C-4''), 24,05 (C-2'', C-5''), 10,94 (N-CH₂-CH₃).

Además, se realizó un espectro ESI del suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)]. En este espectro se observaron dos picos: uno grande a m/z 673,3 que corresponde a una masa con carga doble y uno pequeño a m/z 1345,7 que corresponde a un pico con una sola carga, este espectro nos permite tener una confirmación.

5 También se realizaron mediciones de masa de alta resolución para confirmar la fórmula del compuesto sintetizado. La masa experimental obtenida en el pico con carga simple es de 1345,6829. La masa teórica para la fórmula $C_{72}H_{101}N_2O_{22}$ es 1345,6840 (masa de alta resolución).

10 También se realizaron experimentos MS^2 . Estas mediciones se realizaron con el pico de una sola carga y con el pico con carga doble. La fragmentación de m/z 1346,7 (pico con una sola carga) produce un pico de fragmentación grande a m/z 760 que corresponde a la pérdida de una unidad de aconitina. La fragmentación de m/z 673 (pico con carga doble) produce más fragmentos que corresponden al mecanismo de fragmentación de la unidad de aconitina.

15 **C) azelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (ADD)**

Síntesis del compuesto:

Se mezclaron mediante agitación aconitina (200 mg, 0,30 mmol) y ácido azelaico (29 mg, 0,15 mmol) en DMF (5 mL) durante 7 horas a una temperatura de 80°C. La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, el solvente se evaporó bajo presión reducida a una temperatura inferior a 70°C. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía líquida semipreparativa de alta presión.

Características del compuesto obtenido:

Polvo blanco: el espectro RMN^1H (400,13 MHz $CDCl_3$) mostró δ : 8,03 (d, 4H, $J = 7,2$, H-2'/H-6'), 7,56 (t, 2H, $J = 7,4$, H-4'), 7,45 (t, 4H, $J = 7,2$, H-3'/H-5'), 5,09 (d, 2H, $J = 5$, H-14), 4,51 (d, 2H, $J = 5,2$, H-15), 4,30 (br s, 2H, H-3), 4,12 (d, 2H, $J = 6,1$, H-6), 4,06 (d, 2H, $J = 11,91$, H-19b), 3,79 (s, 6H, 16-OCH₃), 3,52 (s, 2H, H-18b^a), 3,47 (m, 2H, H-1), 3,36 (s, 6H, 1-OCH₃), 3,29 (s, 2H, H-17), 3,27 (s, 6H, 18-OCH₃), 3,24 (s, 2H, 18a^a), 3,22 (br s, 2H, H-16), 3,19 (s, 6H, OCH₃), 3,11 (d, 2H, $J = 11,9$, H-19a), 3,16 (m, 4H, N-CH₂-CH₃), 2,90 (m, 2H, H-9), 2,86 (s, 2H, H-5), 2,55 (d, 2H, $J = 6,1$, H-7), 2,34 (br s, 2H, H-2b), 2,28 (br d, 2H, H-12b), 2,24 (m, 2H, H-10) 2,02 (be d, 2H, H-12a), 1,82 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)¹"b, 8-CO₂-(CH₂)⁷"b, 1,50 (m, 2H, 8-CO₂-(CH₂)¹"a, 8-CO₂-(CH₂)⁷"a, 1,42 (t, 6H, $J = 7,01$, N-CH₂-CH₃), 1,35 (br s, 2H, H-2a^a), 1,13 (m, 4H, 8-CO₂-(CH₂)²"b, 8-CO₂-(CH₂)³"b, 8-CO₂-(CH₂)⁵"b, 8-CO₂-(CH₂)⁶"b), 1,04 (m, 4H, 8-CO₂-(CH₂)²"a, 8-CO₂-(CH₂)³"a, 8-CO₂-(CH₂)⁵"a, 8-CO₂-(CH₂)⁶"a), 0,87 (m, 2H, 8-CO₂(CH₂)⁴". $RMN^{13}C$ ($CDCl_3$) δ : 175,1 (8-COO, 8-COO"), 166 (C-7"), 134 (C-4"), 130 (C-2'/C-6"), 129,7 (C-1"), 129,3 (C-3'/C-5'), 90,3 (C-16), 90,1 (C-8), 82,9 (C-6), 80,1 (C-1), 79,0 (C-15), 78,7 (C-14), 76,0 (C-18), 74,3 (C-13), 70,3 (C-3), 63,4 (C-17), 60,9 (16-OCH₃), 59,5 (18-OCH₃), 59,06 (6-OCH₃), 55,6 (1-OCH₃), 50,7 (C-19), 50,51 (C-11), 50,50 (N-CH₂-CH₃), 45,4 (C-5), 43,7 (C-4), 43,40 (C-9), 41,9 (C-7), 40,5 (C-10), 35,3 (C-12), 34,49 (C-1", C-7"), 28,8 (C-2", C-6"), 26,54 (C-3", C-5"), 24,05 (C-4"), 11 (N-CH₂-CH₃).

40 **Evaluación de los alcaloides azelato (ADD), suberato (SDD) y pimelato (PDD) de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)]:**

Prueba de citotoxicidad *in vitro* frente a las líneas celulares tumorales humanas

Materiales y Métodos.

45 Las líneas celulares tumorales humanas A549 (cáncer de pulmón), HCT-15 (cáncer de colon) y MCF-7 (cáncer de mama) se obtuvieron del Developmental Therapeutics Program del National Cancer Institute (Rockville, MD, EE.UU.). Las células se hicieron crecer de forma habitual con un medio RPMI 1640 con un suplemento de un 10% de suero bovino fetal, ambos obtenidos de Biochrom AG (Berlín, Alemania). Se hicieron crecer en placas Petri (Nunc, Dinamarca) a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂. Las células se replicaron cada 4 días y el medio se cambió una vez dentro de este periodo.

La citotoxicidad se evaluó en células que habían crecido exponencialmente durante 24 horas en presencia de los compuestos que se evaluaban. En resumen, se sembraron 4.000 células en placas de 96 pocillos con 200 μ L de medio completo; 24 horas después, el medio se suplementó con unas series de concentraciones diferentes de compuestos y el contacto se mantuvo durante 24 horas. Los compuestos se disolvieron en agua purificada y se esterilizaron utilizando filtros de membrana de policarbonato de 0,22 μ m (Millipore, Molsheim, Francia). Después, se permitió que las células volvieran a crecer durante 48 horas; las células viables y metabólicamente activas se evaluaron cuantitativamente mediante coloración con un tinte MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan), Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin-Fallavier, Francia). La cantidad de sustancia que permite una disminución del 50% en el número de células es indicativa de la citotoxicidad y representa el CI_{50} del compuesto.

La Tabla 1 siguiente muestra los efectos de citotoxicidad de azelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (ADD), suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (SDD) y pimelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (PDD).

65 Más exactamente, la Tabla 1 resume los valores de CI_{50} (μ M) de:

- Azelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (ADD)
- Suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (SDD)
- Pimelato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (PDD), y
- 8-O-azeloilo-14-benzoilaconina (Comparación 1), y
- cuatro fármacos antineoplásicos importantes (Comparación 2), tal como aparecen en la base de datos del Development Therapeutic Program del National Cancer Institute, y que son:
-
- fluorouracilo (es decir, 5-FU),
- cisplatino,
- etopósido,
- mefalán.

evaluados en las líneas celulares tumorales humanas:

- A549,
- HCT-15, y
- MCF-7.

		Valores de CI_{50} de las sustancias, en μM		
		A549	HCT-15	MCF-7
	ADD	19,13	22	15,45
	SDD	18,7	3,7	3,7
	PDD	3,76	3,76	7,5
Comparación 1	8-O-azeloilo-14-benzoilaconina	16,8	19,4	10,3
Comparación 2	5-FU	2,11	5,69	1,75
	Cisplatino	3,08	7,21	3,01
	Etopósido	3,61	17,6	5,73
	Mefalán	28,7	39,4	11,1

Tabla 1: valores de CI_{50} (μM) de varios compuestos estudiados en las líneas celulares tumorales humanas A549, HCT-15 y MCF-7.

En la Tabla 1 se puede observar que todos los compuestos según la invención muestran efectos inhibidores. Los mejores resultados se encontraron en SDD y PDD con valores comparables a los de los cuatro fármacos antineoplásicos principales (Comparación 2). Por otro lado, ADD mostró un efecto inhibitor bastante similar a los correspondientes con 8-O-azeloilo-14-benzoilaconina.

A continuación se describen los estudios que se realizaron sobre el suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)] (SDD) más potente de estos tres compuestos según la invención.

Coefficientes de partición: log D (pH 7,4) de SDD

Los coeficientes de partición entre agua/alcohol permiten evaluar la proporción de solubilidad en agua/liposolubilidad del compuesto. Esto juega un papel principal en la determinación de los parámetros farmacocinéticos como la penetración de diferentes barreras biológicas y la distribución dentro del organismo vivo.

El log D relativo (pH 7,4) en este estudio se evaluó mediante el procedimiento HPLC micro que se da a conocer en un procedimiento de HPLC a microescala para la evaluación de coeficientes de partición de octanol-agua en unas series de 2-amino-2oxazolininas nuevas Pehourcq, F.; Thomas, J.; Jarry, C., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. (2000), 23, 443-453.

Estas determinaciones se llevaron a cabo con un aparato de cromatografía (Spectra Series, San Jose, EE.UU.). Se utilizó una columna de fase inversa: una columna Stability RP18 (4,6 x 150 mm; con un tamaño de partícula de 5 μm) con una fase móvil que consiste en acetonitrilo (+1% de ácido trifluoroacético) – agua (+1% de ácido trifluoroacético) (40:60 v/v).

El compuesto se repartió entre n-octanol (pureza HPLC) y un tampón de fosfato (pH= 7,4). El octanol se presaturó con el tampón, y a la inversa. Se disolvió la cantidad de 1 mg del compuesto en un volumen adecuado de metanol para conseguir la concentración de 1 mg/ml de solución madre. Después, se disolvió una alícuota apropiada de esta solución metanólica en un tampón para obtener una concentración final de 100 $\mu g/ml$. Bajo las condiciones de cromatografía descritas anteriormente, se inyectaron 20 μl de esta fase acuosa en el cromatógrafo, lo que llevó a la determinación de un área de pico antes de la partición (W0).

Después, en tubos con tapones de rosca, se añadieron 2.000 µl de la fase acuosa (V_{ac}) a 10 µl de *n*-octanol (V_{oct}) a un pH= 7,4. La mezcla se agitó mediante rotación mecánica durante 30 minutos. La centrifugación se consiguió a 3.000 rpm en 15 minutos. Se inyectó una cantidad de 20 µl de la fase baja en la columna de cromatografía. Esto condujo a la determinación de un área de pico después de la partición (W_1). El log D se calculó a partir de la fórmula:

$$\log D = \log [(W_0 - W_1)V_{ac}/W_1V_{oct}].$$

Con respecto al compuesto SDD, se encontró un valor de 2,86 de log D (pH 7,4), que corresponde a una liposolubilidad relativamente elevada, favorable para una penetración trans-membrana de diferentes barreras biológicas y para la distribución en organismos vivos, según la siguiente publicación: Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P. J., *Adv. Drug Delivery Rev.* (1997), 23, 3-25.

Los enfoques experimentales y computacionales para calcular la solubilidad y la permeabilidad en el descubrimiento de fármacos y el marco del desarrollo, en los que se da a conocer una escala empírica de liposolubilidad.

Efecto de suberato de bis[O-(14-benzoilacoinina-8-ilo)] (SDD) en la detención del ciclo celular de diferentes líneas celulares tumorales.

Procedimiento

Se sembraron 10^6 células de las líneas celulares de A549, HCT-15 y MCF-7 en placas Petri con medio RPMI-1640. A las 24 horas, el SDD se disolvió en agua a una concentración de 20 µM y se añadió directamente al medio de cultivo. El contacto se mantuvo durante 72 horas. Después, las células se separaron mediante tripsinización, se recogieron y se lavaron con PBS y se contaron en un hemocitómetro. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm, después, se resuspendieron en un volumen definido de PBS para obtener $2,5 \times 10^6$ células/ml. Se digirieron en los núcleos 100 µl de la suspensión celular mediante tripsina durante 10 minutos. Después, se añadió a la suspensión celular una solución que contenía inhibidor de la tripsina y ARNasa y se dejó en contacto durante 10 minutos. Finalmente, las células se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron con un aparato de citometría de flujo. Se determinó la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo mediante el procedimiento dado a conocer en: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Vindelov, L.; Christensen, I.; Nissen, N., *Cytometry* (1983), 3, 323-327.

En la siguiente Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos:

- G0G1: célula en la fase de G0G1
- G2M: células en la fase de G2M
- S: células en la fase de síntesis de ADN
- Sub G1: células apoptóticas
- SUP G2M: células diploides

Líneas de células tumorales		Control (células no tratadas)	SDD (20 µM)
A549	TODAS %	100	100
	G0G1 %	76,28	53,04
	G2M %	9,15	16,42
	S %	12,42	25,49
	SubG1 %	1,74	3,34
	SUP G2M %	0,72	2,09
HCT-15	TODAS %	100	100
	G0G1 %	69,83	30,67
	G2M %	11,94	15,72
	S %	15,19	26,35
	SubG1 %	2,29	23,65
	SUP G2M %	0,81	2,59
MCF-7	TODAS %	100	100
	G0G1 %	66,01	58,73
	G2M %	13,51	16,96
	S %	16,56	21,44
	SubG1 %	2,96	2,05
	SUP G2M %	0,87	1,72

Tabla 2. Influencia de la SSD sobre los porcentajes de paro del ciclo celular tumoral de la población celular total.

La Tabla 3 siguiente resume los porcentajes de supervivencia celular en diferentes tipos de ciclos celulares.

	A549		HCT-15		MCF-7	
	Control	SDD	Control	SDD	Control	SDD
G0G1 %	77,96	55,86	72,01	42,16	68,7	60,46
G2M %	9,35	17,29	21,32	21,61	14,07	17,46
S %	12,7	26,84	15,67	36,23	17,23	22,08

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia celular en diferentes ciclos celulares.

Resultados

5 Tal como se muestra en la Tabla 2, el SDD, a una dosis de 20 μ M, conduce a una acumulación significativa de células A549 y HT-15 una acumulación moderada de células MCF-7 en las fases G2M y S, que es característico de un paro del ciclo celular en estas etapas de desarrollo. El número de células apoptóticas (Sub G1) aumentó significativamente en el ensayo con las líneas celulares HCT-15.

10 Es importante destacar que la cantidad de células en la fase G2M aumenta respectivamente en un 85% y un 75% en las líneas celulares A549 y HCT-15, y la cantidad de células detenidas en la fase S aumentó en más de 100% en ambos tipos celulares en comparación con el control.

15 En cuanto al tratamiento con el SDD, se observó una tendencia de acumulación similar en las fases G2M y S en las células MCF-7 pero a un nivel inferior. El efecto en el ciclo celular no está correlacionado con la citotoxicidad del SDD: la distribución celular de A549 en el ciclo celular se alteró a una concentración del SDD cercana a CI_{50} , mientras que la distribución celular de MCF-7 en el ciclo no se alteró a una concentración del SDD 5 veces superior a la de CI_{50} . Esto nos hace suponer la existencia de múltiples mecanismos de acción, no sólo limitados a la inhibición de la síntesis de ADN y al bloqueo de la fase G2M.

Estudio del efecto de SDD sobre la actividad de fragmentación de la Topoisomerasa-I

25 La ADN topoisomerasa 1 (es decir, Top 1) es una enzima nuclear esencial implicada en la regulación de la topología del ADN asociada con la mayoría de transacciones del ADN, incluyendo la replicación, la transcripción, la recombinación y el remodelación de la cromatina. Su papel es introducir roturas transitorias de una sola hebra en las cadenas dobles del ADN a través de la formación de un enlace covalente entre el 3'-fosfato de la cadena segmentada y la enzima. En el complejo covalente Top 1-ADN complejo, la rotación de la hebra rota alrededor de la cadena completa no fragmentada da como resultado una relajación del ADN superenrollado. La continuidad del ADN se restablece después mediante una religación catalizada por Top1 del 5'-hidroxil terminal. El veneno de la Top 1, como la Camptotecina (CPT) estabiliza el complejo Top 1-ADN y, consecuentemente, inhibe la religación del ADN.

30 La influencia del SDD se ha estudiado a concentraciones diferentes en la actividad de fragmentación de Top 1 en comparación con la Camptotecina.

35 El procedimiento consiste en una incubación de los nucleótidos marcados 3' con la enzima Top 1, o Top 1 + CPT o Top 1 + SDD. La Top1 forma un enlace covalente con la 3' terminal de la rotura de la hebra simple de ADN y después se religa el ADN, que se muestra como una hebra simple, la Camptotecina, como control positivo estabiliza el complejo Top1 -DNA, que inhibe la religación del ADN, de este modo, se muestra como hebra doble.

Procedimiento

Marcaje del oligonucleótido

45 El marcaje del extremo 3' terminal de la cadena escindida se realizó como se ha descrito anteriormente en la publicación. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. Pommier, Y.; Jenkins, J.; Kohlhagen, G.; y Leteurtre, F., *Mutat. Res.* (1995), 337, 135-145.

50 Por consiguiente, se incubaron 10 pmol de desoxinucleotidiltransferasa en un tampón marcado (100 nM de cacodilato potásico, pH 7, $CaCl_2$, 2 mM, 200 μ M DTT) durante 1 hora a una temperatura de 37°C.

55 La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de centrifugado Sephadex G-25 mediante centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos para extraer el exceso de nucleótido no incorporado.

60 El oligonucleótido marcado en 3' se mezcló con la misma cantidad de hebra complementaria no marcada en el tampón de anillado (es decir, Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, Na2EDTA 100 mM) y se anilló por calentamiento de la mezcla de la reacción durante 5 minutos a una temperatura de 95°C seguida de un enfriamiento lento y gradual a temperatura ambiente.

Ensayos de fragmentación catalizada por Top1

Los ensayos de fragmentación catalizados por Top1 se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos dobles totales u oligonucleótidos de doble hebra parciales, referidos como sustratos suicidas.

5 Para cada reacción, se incubaron 20 fmol de sustrato marcado en 3' a una concentración de 10 μM con 0,2 pmol de Top1 recombinante humana purificada en un tampón que contiene Tris-HCL 10 mM, pH 7,5, KCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, 15 μg de albúmina sérica bovina, DTT 0,2 μM y CPT 10 μM con o sin SDD durante 15 minutos a temperatura ambiente.

10 Las reacciones se pararon mediante la adición de SDS al 0,5%, tampón de carga (es decir, formamida al 80%, NaOH 10 μM , Na_2EDTA 0,1 μM , xilencianol al 0,1%, azul de bromofenol al 0,1%) a una proporción de (3:1) y las muestras se resolvieron en unos gels de acrilamida para la secuenciación del ADN al 16 ó 20% que contienen urea 7 M.

15 La captación de la imagen y la cuantificación de los productos de fragmentación se realizó utilizando un Typhoon Phosphorimager (Amersham Biosciences) como se describe en Inhibition of Topoisomerase I cleavage activity by thiol-reactive compounds. Montaudon, D.; Palle, K., Rivory, L.; Robert, J.; Douat-Casassus, C.; Quideau S.; Bjornsti M.; Pourquier P; *J. Biol. Chem.* (2007), 282, 14403-14412.

Resultados

20 El SDD utilizado a cuatro concentraciones diferentes: 1, 10, 100 y 1000 μM no ha mostrado actividad inhibitoria de la Top 1 en comparación con la camptotecina.

Evaluación del efecto de SDD sobre la actividad catalítica de la topoisomerasa II

25 Está aceptado generalmente que la enzima nuclear ADN topoisomerasa II (Topo II) es la diana habitual de diferentes fármacos antineoplásicos, incluyendo antraciclinas, acridinas, epipodofilotoxinas y elipticinas. A pesar del hecho de que todos estos fármacos inducen la formación y la estabilización de complejos terciarios ADN-fármaco-Topo II, los dominios y mecanismos de los enlaces específicos parecen no ser los mismos para los diferentes grupos químicos, lo que determina las características farmacológicas de los fármacos como la eficacia y la resistencia.

30 Se ha realizado una prueba para revelar el posible efecto inhibitor de SDD sobre la actividad catalítica de la Topo II mediante el desencadenado de un sustrato de ADN encadenado que se origina a partir de los cinetoplastos de *Trypanosoma* (kADN, TopoGen) en formas de ADN relajado.

Procedimiento

35 Se elaboró la siguiente mezcla de reacción estándar que contenía Tris 40 mM/HCl pH 7,4, MgCl_2 10 mM, ditiotreitól 0,5 mM, ATP 1 mM y kADN a 0,02 g/ml.

40 La reacción se inició mediante la adición de extracto nuclear de NaCl a 0,35 M y se detuvo después de 20 minutos de incubación a una temperatura de 37°C mediante la adición una solución de desnaturalización que contenía glicerol al 30%, SDS al 1%, azul de bromofenol a 0,5 mg/ml.

45 Después, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 40 mM de Tris/ácido acético, pH 8,0 que contenía EDTA a 2 mM y bromuro de etidio a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 45 minutos a 80V.

50 Un control positivo para el desencadenado fue un marcador de kADN desencadenado obtenido de TopoGen, que contenía una mezcla de dos especies de ADN relajado, ADN circular abierto y ADN circular cerrado covalentemente. El ADN encadenado no penetra en el gel, mientras que los círculos de ADN desencadenado entran en el gel y migran.

55 El ADN se visualizó a través de luz UV y se cuantificaron las diferentes formas de ADN mediante un análisis de escaneado densitométrico utilizando el dispositivo descrito anteriormente.

60 El etopósido se utilizó como control positivo, como se describe en la siguiente publicación: Differential stabilisation of topoisomerase-II-DNA cleavable complexes doxorubicine and etoposide in doxorubicin-resistant rat glioblastoma cells. Montaudon, D.; Pourquier, P.; Denois, F.; De Tinguy-Moreaud, E.; Lagarde, P; Robert, J., *Eur. J. Biochem.* (1997), 245, 307-315.

Resultados

65 El SDD utilizado a unas concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 μM provocó una inhibición relativamente moderada de la actividad de la Topo II en comparación con el etopósido independientemente de la dosis. Por consiguiente, es una inhibición insignificante de la Topo II, pero, no depende de las concentraciones de la SDD.

Determinación aguda de la toxicidad para la SDD (DL₅₀)

El estudio se ha realizado para evaluar la toxicidad sistémica aguda de la SDD en el ensayo preliminar en ratones.

El SDD se administró por vía intravenosa:

- en una primera etapa, a 1 hembra de ratón suizo con una sola dosis de 95 mg/kg p.c.,
- en una segunda etapa, a 1 hembra de ratón suizo con una sola dosis de 60 mg/kg p.c.,
- en una tercera etapa, a 1 hembra de ratón suizo con una sola dosis de 55 mg/kg p.c.,
- en una cuarta etapa, a un grupo de 2 hembras de ratón suizo con una sola dosis de 50 mg/kg p.c..

Se constató la muerte del animal tratado con 95 mg/kg p.c., inmediatamente después de la administración del producto del ensayo.

La muerte del animal tratado con 60 mg/kg p.c., se constató 3 horas después de la administración del producto del ensayo.

La muerte estuvo precedida por una disminución de la actividad espontánea asociada con una disminución del reflejo de Preyer, ausencia de reflejo de enderezamiento, disminución del tono muscular y oclusión parcial de los ojos.

La muerte del animal tratado con 55 mg/kg p.c., se constató 24 horas después de la administración del producto del ensayo. La muerte estuvo precedida por una disminución de la actividad espontánea asociada con una disminución del reflejo de enderezamiento.

No hubo fallecimientos en los animales tratados con 50 mg/kg peso corporal.

Una hora después de la administración del producto del ensayo, se registró una disminución de la actividad espontánea (2/2) (es decir, 2 ratones de 2) asociada con una disminución del reflejo de enderezamiento (1/2). Los animales recuperaron la actividad normal al segundo día del ensayo.

Se constató un edema al nivel de las colas de los ratones entre el primer día y el decimocuarto.

La evolución del peso corporal de los animales se mantuvo normal durante el ensayo. El examen macroscópico de los animales tratados con 50 mg/kg al final del ensayo no reveló cambios relacionados con el tratamiento.

Prueba principal

La SDD se administró por vía intravenosa a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal a un grupo de 5 hembras de ratón Swiss. El protocolo experimental se estableció a partir del estándar internacional NF EN ISO 10993-11 que hace referencia a la evaluación biológica de productos sanitarios: "Tests for systemic toxicity" ("Ensayos de toxicidad sistémica")

Durante el estudio, no se registraron fallecimientos. En los animales tratados, si se registró 1 hora después de la administración del producto del ensayo, una disminución de la actividad espontánea (5/5) asociada con una disminución del reflejo de enderezamiento (2/5) y la oclusión parcial de los ojos (2/5). Los animales recuperaron la actividad normal al segundo día de la prueba.

Se constató un edema al nivel de las colas de los ratones entre el primer día y el decimocuarto. La evolución del peso corporal de los animales se mantuvo normal durante el estudio. El examen macroscópico de los animales tratados con 50 mg/kg al final del estudio sólo reveló necrosis al nivel de la cola (3/5).

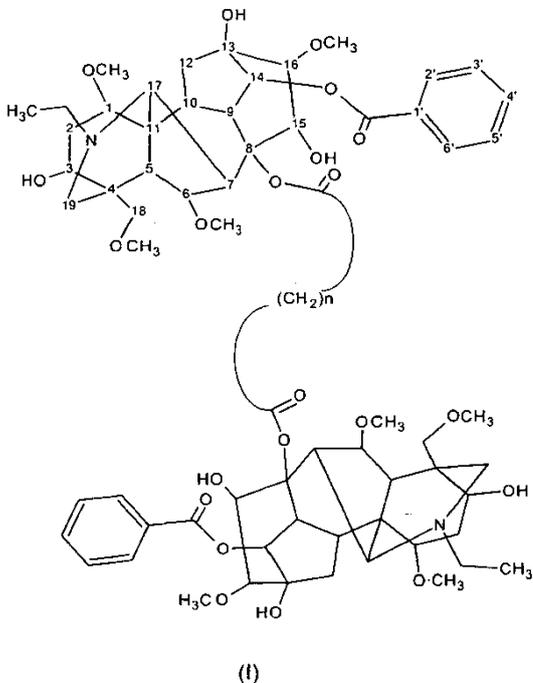
Conclusión:

Para concluir, la DL₅₀ en ratones para SDD se situó en unos valores superiores a 50 mg/kg del peso corporal, cuando se administra por vía endovenosa.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de estructura general (I):

5



en la que n es 5, 6 ó 7.

2. Compuesto según la reivindicación 1, que es el suberato de bis[O-(14-benzoilaconina-8-ilo)].

10

3. Procedimiento para la producción de un compuesto que presenta la estructura general (I), en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

15

- a) agitar la aconitina con un ácido dicarboxílico a una temperatura igual o inferior a 80°C en un solvente como DMF,
- b) agitar la mezcla obtenida a temperatura ambiente de forma que se lleve a cabo la reacción de transesterificación,
- c) evaporar el solvente bajo una presión reducida,
- d) purificar el residuo oleoso obtenido al final de la etapa c) para aislar dicho compuesto (I).

20

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el ácido dicarboxílico se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido pimélico, ácido subérico y ácido azelaico.

25

5. Composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además una sustancia de tipo vehículo o diluyente adecuada farmacéuticamente aceptable.

30

7. Utilización del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para la fabricación de un medicamento.

8. Utilización según la reivindicación 7, en la que el medicamento se utiliza para el tratamiento de las enfermedades tumorales.

35

9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el medicamento se utiliza para el tratamiento de cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de mama.