

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 196**

51 Int. Cl.:

C07D 493/10 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/36 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2009 E 09823863 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2363400**

54 Título: **Nuevo compuesto con un entramado de carbonos quiral y espiro, método para la preparación del mismo y composición farmacéutica que lo contiene**

30 Prioridad:

31.10.2008 KR 20080107821

30.10.2009 KR 20090104124

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

18.09.2013

73 Titular/es:

SNU R&DB FOUNDATION (100.0%)

San 56-1, Sillim-dong Gwanak-gu

Seoul 151-742, KR

72 Inventor/es:

KANG, HEON-JOONG;

RHO, JUNG-RAE;

HONG, JEONG-HO;

PARK, SEUNG-BUM;

SHIN, CHAN-SOO;

LEE, JAE-HWAN;

HONG, JUN-YOUNG;

KIM, EUN-O;

KIM, JEONG-AH y

OH, SANG-MI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 423 196 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

Nuevo compuesto con un entramado de carbonos quiral y espiro, método para la preparación del mismo y composición farmacéutica que lo contienen

[Campo técnico]

- 5 El presente invento se refiere a un nuevo compuesto con un entramado de carbonos quiral y espiro, a un método para la preparación del mismo y a una composición farmacéutica que contiene el mismo.

[Técnica de antecedentes]

- 10 El reciente crecimiento económico rápido y el desarrollo médico condujeron a una hipernutrición y a un aumento en la población anciana, dando como resultado una obesidad y un repentino aumento en el número de pacientes con hígado graso debido a la obesidad y a un aumento en el número de las personas que padecen osteoporosis debido a la edad.

- 15 Durante un largo período de tiempo se ha creído que el tejido adiposo protege al tejido corporal y conserva el calor del cuerpo, y que es un sitio de almacenamiento de energía para la actividad física. Sin embargo, muchos recientes resultados de estudios están demostrando que el tejido adiposo desempeña un cometido importante en la fisiología y la génesis del cuerpo humano. En particular, se han encontrado los hechos de que unos materiales capaces de regular diversas actividades fisiológicas, tales como equilibrar la energía, controlar el nivel de azúcar en sangre, regular la sensibilidad a la insulina, generar vasos sanguíneos y similares, se segregan por ejemplo, TNFa, leptina, etc., en adipocitos, unos tras de otros, y por lo tanto se ha pensado que los adipocitos son un centro para regular el metabolismo del cuerpo humano.

- 20 Por otro lado, puesto que unas graves enfermedades sociales eran causadas por la obesidad, se está realizando activamente el desarrollo de medicaciones para inhibir la formación de los adipocitos. Sin embargo, incluso aunque un rápido aumento en el número de los pacientes de hígado graso no alcohólicos debidos a la obesidad amenaza gravemente la salud de la población moderna, y hasta el momento no se ha desarrollado ninguna medicación para tratar de manera efectiva a ésta.

- 25 La osteoporosis es el resultado de un aplastamiento del equilibrio osteogénico entre la capacidad de formación de hueso de los osteoblastos y la capacidad de absorción de hueso de los osteoclastos. Se ha conocido que la generación de los osteoblastos y de los osteoclastos es regulada a la vista de hormonas, nutrientes externos y genes, pero no se han encontrado todavía muchos genes que sean causantes directamente de una enfermedad de los huesos.

- 30 La mayor parte de las medicaciones actualmente usadas en métodos de tratamiento inhiben la capacidad de absorción de hueso de las células óseas para equilibrar la formación de células óseas. Sin embargo, tales medicaciones tienen unos graves efectos colaterales y unos insignificantes efectos clínicos, y por lo tanto se necesitan desarrollar medicaciones con nuevos conceptos. Incluso aunque muchos investigadores han intentado desarrollar unas medicaciones que sean capaces de favorecer la formación de células óseas, es decir la activación de osteoblastos, todavía no se han desarrollado unas medicaciones que tengan efectos beneficiosos.

35 [Divulgación]

[Problema técnico]

- 40 Un objeto del presente invento es el de proporcionar un nuevo compuesto que tenga una muy superior capacidad de diferenciación en osteoblastos. Otro objeto del presente invento es el de proporcionar un nuevo compuesto que tenga una excelente capacidad de inhibir la diferenciación en adipocitos.

Todavía otro objeto del presente invento es el de proporcionar un nuevo compuesto que tenga una actividad selectiva contra un receptor hepático X (LXR, acrónimo de Liver X Receptor) y una excelente actividad antagonista para éste.

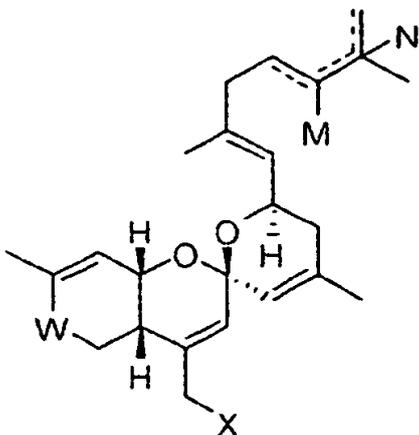
- 45 Todavía otro objeto del presente invento es el de proporcionar nuevo compuesto que inhiba la biosíntesis y la absorción de grasa en el hígado.

Todavía otro objeto del presente invento es el de proporcionar una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la osteoporosis, del hígado graso o de la obesidad, que contenga el nuevo compuesto como un componente activo.

[Solución técnica]

En un aspecto general se proporcionan un compuesto de la fórmula 1 siguiente, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[Fórmula 1]

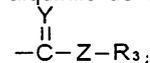


5

en donde:

W es CO o CHOR₁**X** es N₃, NHR₂, OR₂, SR₂, SeR₂ o TeR₂;

10

R₁ y **R**₂ se seleccionan, independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20, heteroarilo de C4-C20, o**Y** es O, S o NR₄;**Z** es un enlace simple, NH, O, S, Se o Te;

15

R₃ y **R**₄ se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20 o heteroarilo de C4-C20, y**M** y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

20 En otro aspecto general se proporciona un método de preparación del compuesto de fórmula 1, incluyendo el método:

(a) cortar y secar la esponja *Phorbas* sp., seguido por una extracción usando un alcohol de C1-C4;

(b) repartir el extracto obtenido a partir de la etapa (a) por uso de agua y de cloruro de metileno, y luego eliminar el disolvente de la capa orgánica, seguido por repartir de nuevo por uso de n-hexano y de una solución en una mezcla de metanol y agua; y

25

(c) eliminar el disolvente de la capa alícuota de metanol, obtenida a partir de la etapa (b) y luego obtener una parte alícuota por cromatografía usando sílice como la fase estacionaria y usando una solución en metanol como el eluyente, conteniendo o no la solución en metanol 20 % en peso o menos de agua basado en el peso total de la misma.

30 En todavía otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la osteoporosis que incluye un compuesto de Fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo aceptable farmacéuticamente y un agente activo.

35 En todavía otro aspecto general se proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento del hígado graso, que incluye un compuesto de Fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

40 En todavía otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la obesidad, que incluye un compuesto de Fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

En todavía otro aspecto general, se proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en antagonizar a un receptor hepático X (LXR), que incluye un compuesto de Fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

5 [Efectos ventajosos]

El compuesto de Fórmula 1 de acuerdo con el presente invento tiene una muy superior capacidad de diferenciación en osteoblastos, y por consiguiente se espera que el compuesto del presente invento pueda desempeñar un cometido muy innovador en el tratamiento de la osteoporosis. Además, el compuesto de Fórmula 1 de acuerdo con el presente invento tiene una fuerte eficacia antagonista contra receptores hepáticos X para inhibir la síntesis de
10 grasa y la absorción de grasa en el hígado, y por lo tanto se espera que el compuesto del presente invento pueda ser muy eficaz en el tratamiento del hígado graso.

Además, el compuesto de Fórmula 1 de acuerdo con el presente invento tiene una excelente capacidad inhibidora de la diferenciación en adipocitos, y por lo tanto se espera que el compuesto del presente invento se pueda usar en el tratamiento de una obesidad.

15 [Descripción de los dibujos]

Los/las anteriores y otros/otras objetos, características y ventajas del presente invento resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de formas preferidas de realización que se dan en conjunción con los dibujos anejos, en los que:

20 La FIG. 1 muestra la correlación de hidrógeno (líneas negritas) y la correlación de HMBC (flechas que presentan visualmente la correlación de la fijación desde núcleos de hidrógeno a núcleos de carbono) obtenidas por el experimento COSY (a), y muestra las estructuras de los compuestos 1 hasta 4 del presente invento (b);

La FIG. 2 muestra los espectros dicroicos circulares exhibidos por los compuestos 1 y 2 del presente invento;

25 La FIG. 3 muestra una imagen que representa los resultados de la medición de la capacidad de diferenciación en osteoblastos de una parte alícuota 116V del extracto y de los compuestos 1 hasta 4 del presente invento (Ejemplo experimental 1);

La FIG. 4 muestra los datos de una RT-PCR que verifican los grados de transcripción de factores de marca de diferenciación en osteoblastos (Runx2, osteocalcina, Msx2, etc.) mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (RTPCR, acrónimo de real time PCR), después de haber tratado unos linajes de células C3H/10T1/2 con los compuestos 1 hasta 4 del presente invento durante 6 días (Ejemplo experimental 1);

30 La FIG. 5 muestra los datos de transferencia de bórñon Western que verifican la expresión de proteínas de un factor de marca de diferenciación en osteoblastos, TAZ, usando un bórñon de transferencia Western, después de haber tratado unos linajes de células C3H/10T1/2 con los compuestos 1 hasta 4 del presente invento durante 6 días (Ejemplo experimental 1);

35 La FIG. 6 muestra unos datos de bórñon de transferencia Western que verifican la expresión de proteínas de factores de marca de diferenciación en osteoblastos, TAZ y Runx2, usando un bórñon de transferencia Western, después de haber tratado unos linajes de células C3H/10T1/2 con los compuestos 1 hasta 4 del presente invento durante 6 días (Ejemplo experimental 1);

La FIG. 7 muestra una imagen que representa el resultado de la medición de la capacidad de diferenciación en osteoblastos del compuesto 5 del presente invento en el Ejemplo experimental 1;

40 La FIG. 8 muestra una imagen que representa los resultados de la medición de la capacidad de diferenciación en adipocitos (C3H/10T1/2) de la parte alícuota del extracto 116V y de los compuestos 1 hasta 4 del presente invento en el Ejemplo experimental 2;

La FIG. 9 muestra una imagen que representa el resultado de la medición de la capacidad inhibidora de diferenciación en adipocitos (3T3-L1) del compuesto 1 del presente invento en el Ejemplo experimental 2;

45 La FIG. 10 muestra un gráfico que representa el resultado de la medición de la actividad antagonista del compuesto 1 del presente invento contra un receptor nuclear LXR en el Ejemplo experimental 3;

La FIG. 11 muestra un gráfico que representa el resultado de la medición de la actividad selectiva del compuesto 1 del presente invento para diversos receptores nucleares en el Ejemplo experimental 3;

50 La FIG. 12 muestra un gráfico que representa el resultado de la medición de la fijación directa del compuesto 1 del presente invento sobre la proteína del receptor nuclear LXR en el Ejemplo experimental 3 ;

La FIG. 13 muestra un gráfico que representa el resultado de la medición de la citotoxicidad del compuesto 1 del presente invento en células esplénicas de ratón en el Ejemplo experimental 4;

55 La FIG. 14 muestra unos gráficos que representan los resultados de la medición de la regulación de la expresión de genes del compuesto 1 del presente invento en células hepáticas (células AML12 y HepG2) en el Ejemplo experimental 5;

La FIG. 15 muestra un gráfico que representa los cambios en el peso corporal durante unos períodos de administración entre conjuntos en tratamiento y conjuntos testigos mientras que el compuesto 1 del presente invento se administraba a ratones en el Ejemplo experimental 6;

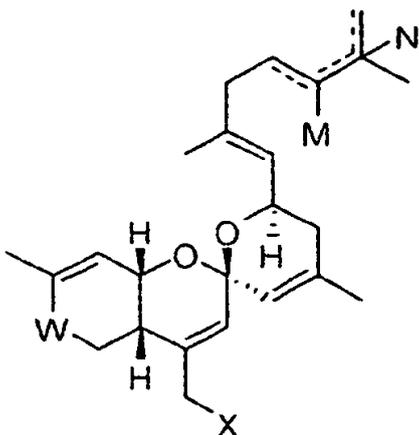
60 La FIG. 16 muestra un gráfico e imágenes que representan los resultados de la eficacia inhibidora del hígado graso del compuesto 1 del presente invento en un modelo de animal de una enfermedad en el Ejemplo experimental 6; y

La FIG. 17 muestra unos gráficos que representan los resultados de la medición de la eficacia de la regulación de expresión de genes exhibidos por el compuesto 1 del presente invento en el modelo de animal después de que fueron verificadas las eficacias antes mencionadas en estos animales por medio del Ejemplo experimental 6.

[Mejor modo]

- 5 El presente invento se dirige a un compuesto de fórmula 1 siguiente, a un estereoisómero del mismo, a un enantiómero del mismo, o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[Fórmula 1]

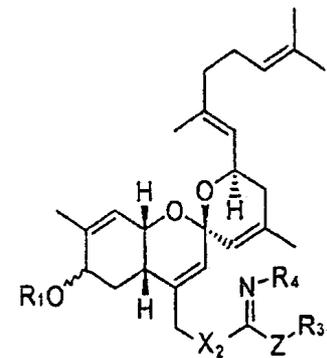
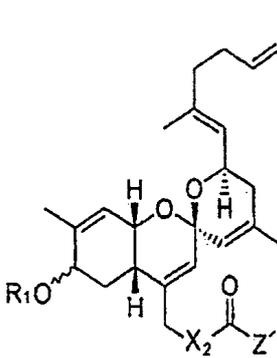
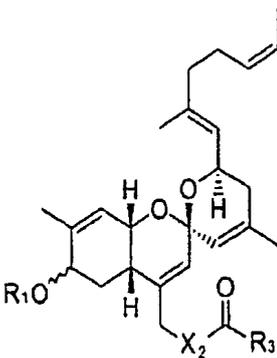
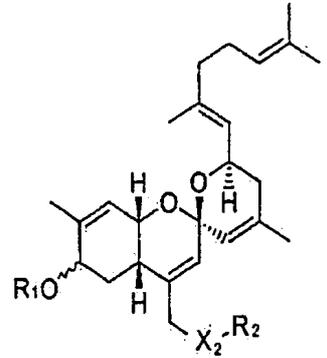
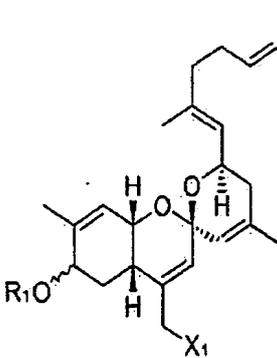
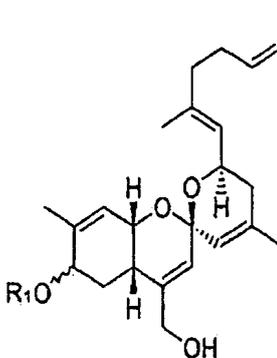
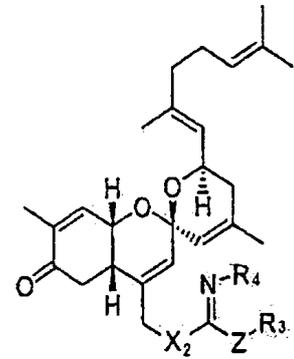
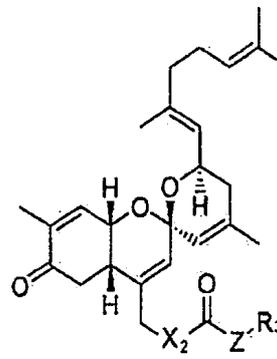
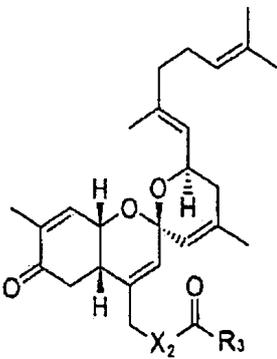
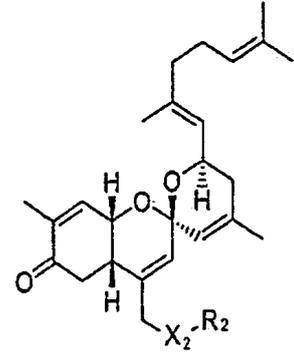
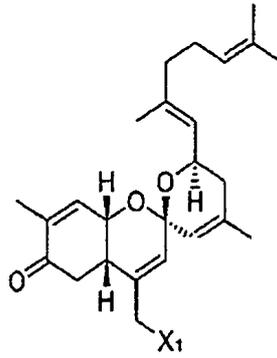
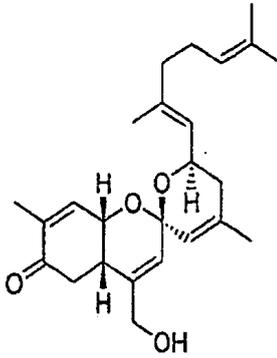


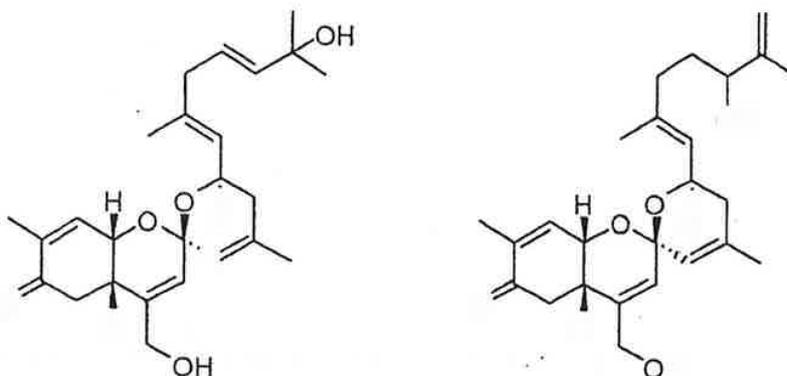
en donde:

- 10 **W** es CO o CHOR₁
X es N₃, NHR₂, OR₂, SR₂, SeR₂ o TeR₂;
R₁ y **R₂** se seleccionan, independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20, heteroarilo de C4-C20 o
- $$\begin{array}{c} \text{Y} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{Z}-\text{R}_3 \end{array}$$
- 15 **Y** es O, S o NR₄;
Z es un enlace simple, NH, O, S, Se o Te;
R₃ y **R₄** se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20 o heteroarilo de C4-C20, y
- 20 **M** y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

- 25 El compuesto de Fórmula 1 es separado de un material de extracto (KNUE116) a partir de la esponja *Phorbas* sp que habita en nuestro país, o es sintetizado usando el compuesto separado como un material de partida, y un nuevo compuesto que tiene un entramado de carbono quiral y espiro. El compuesto de Fórmula 1 favorece la diferenciación en osteoblastos de una manera innovadora, inhibe notablemente la capacidad de diferenciación en adipocitos, y suprime la síntesis de grasa y la absorción de grasa en el hígado. Por lo tanto, se espera que el compuesto de Fórmula 1 pueda desempeñar un cometido innovador en el tratamiento de la osteoporosis, en el tratamiento del
- 30 hígado graso y en el tratamiento de la obesidad.

Los compuestos de Formula 1 se ejemplifican específicamente de la siguiente manera:





En las fórmulas anteriores,

X₁ es N₃, NH₂, OH, SH, SeH o TeH;

X₂ es NH, O, S, Se o Te;

Z es un enlace simple, NH, O, S, Se o Te;

R₁ es hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo

de C3-C8, arilo de C6-C20, heteroarilo de C4-C20, o $\begin{matrix} Y \\ || \\ -C-Z-R_3 \end{matrix}$; y

los **R**₂, **R**₃ y **R**₄ son, cada uno de ellos, hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20 o heteroarilo de C4-C20.

En otro compuesto más preferido tomado entre los compuestos de la Fórmula 1 anterior, en donde

W es CO o CHOR₁; **X** es N₃, NHR₂, OR₂, SR₂, SeR₂ o TeR₂; **R**₁ y **R**₂ se seleccionan independientemente entre

hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8 lineal o ramificado, o $\begin{matrix} Y \\ || \\ -C-Z-R_3 \end{matrix}$;

Y es O, S o NR₄; **Z** es un enlace simple, NH, O o S; **R**₃ y **R**₄ se seleccionan cada uno de ellos independientemente entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8 o alquino de C2-C8, lineal o ramificado, y **M** y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen, en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de los enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

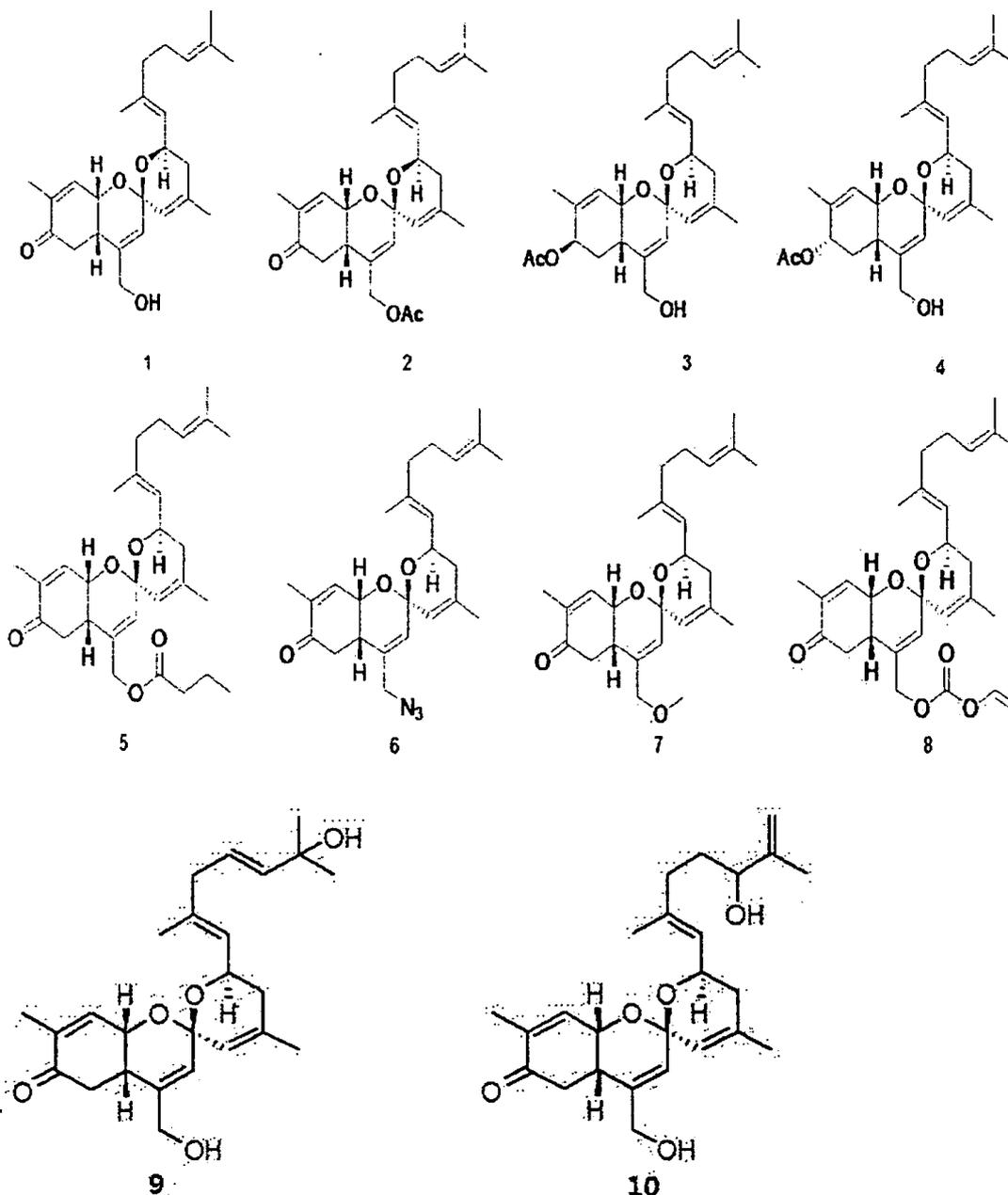
En otro compuesto más preferido tomado entre los compuestos de la Fórmula 1 anterior, en donde

W es CO o CHOR₁; **X** es N₃, OR₂ o SR₂; **R**₁ y **R**₂ se seleccionan cada uno de ellos independientemente entre

hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, o $\begin{matrix} Y \\ || \\ -C-Z-R_3 \end{matrix}$;

Y es O o S; **Z** es un enlace simple; **R**₃ se selecciona entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8 o alquino de C2-C8, lineal o ramificado; y **M** y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

Los compuestos de Fórmula 1 se ejemplifican específicamente como sigue.



Además, el presente invento proporciona un método de preparación del compuesto de Fórmula 1.

El método de preparación del presente invento incluye:

- 5 (a) cortar y secar la esponja *Phorbas* sp., seguido por una extracción usando un alcohol de C1-C4;
- (b) repartir el extracto obtenido a partir de la etapa (a) usando agua y cloruro de metileno y luego eliminar el disolvente de la capa orgánica, seguido por repartir de nuevo usando n-hexano y una solución en una mezcla de metanol y agua; y
- 10 (c) eliminar el disolvente de la capa alícuota en metanol obtenida a partir de la etapa (b) y luego obtener una parte alícuota por cromatografía usando sílice como fase estacionaria y usando una solución en metanol como el eluyente, conteniendo o no la solución en metanol 20 % en peso o menos de agua basado en el peso total del mismo.

También el método de preparación del presente invento puede incluir además (d) purificar la parte alícuota obtenida (c), después de esta etapa (c).

En la etapa (a) se puede usar una liofilización (= desecación por congelación) para la desecación y se puede usar metanol como el alcohol de C1-C4. La extracción se puede realizar a la temperatura ambiente y de manera preferible durante 2 horas o más.

5 En la etapa (b) la solución en una mezcla de metanol y agua puede contener 60-90 % en peso de metanol y 10-40 % en peso de agua basado en el peso total de la solución.

10 En la etapa (c) se puede realizar una cromatografía de evaporación súbita en fase inversa. La cromatografía se puede realizar una vez o más veces en el orden desde donde el eluyente tenga la más alta polaridad hasta donde el eluyente tenga la más baja polaridad, usando una mezcla de agua y metanol que tenga una polaridad más alta que el eluyente, antes de usar la solución en metanol que contiene o no 20 % en peso de agua, basado en el peso total del eluyente, como el eluyente. En particular una mezcla líquida de agua y metanol se puede usar como el eluyente.

En la etapa (d) la purificación se puede realizar por una cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC, acrónimo de high performance liquid chromatography) y como el eluyente, se puede usar una mezcla líquida de 50-80 % en peso de acetonitrilo (ACN) y de 20-50 % en peso de agua basado en el peso total del eluyente.

15 Por de pronto, los compuestos de Fórmula 1 del presente invento se pueden sintetizar usando los compuestos separados por medio de los anteriores métodos como material de partida y por un método tal como una reacción de esterificación, una reacción de sustitución de azida, una reacción de eterificación, u otra similar.

20 Además, el presente invento se dirige a una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la osteoporosis, del hígado graso y de la obesidad, que incluye un compuesto de fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

Además, el presente invento proporciona una composición farmacéutica destinada a su uso en antagonizar a un receptor hepático X (LXR), que incluye un compuesto de Fórmula 1, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

25 En la composición farmacéutica, la sal farmacéuticamente aceptable puede ser un vehículo o medio que es usable en la administración de medicaciones, y se puede usar sin ninguna limitación cualquier material que generalmente se use en la especialidad. Por ejemplo, se pueden usar agentes disolventes, dispersantes, materiales de carga, extendedores, aglutinantes, humectantes, desintegrantes, tensioactivos o similares.

30 La composición farmacéutica del presente invento se puede formular en un formato de formulación oral tal como un polvo, un gránulo, una tableta, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, un aerosol, o otra similar, de aplicación externa, supositorio, solución inyectable estéril u otra similar.

35 La dosificación del compuesto de Fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o el presente invento puede variar dependiendo de las condiciones, de los pesos corporales y la gravedad de enfermedad de los pacientes, de los tipos de formulación de las medicaciones, de las vías de administración y de los períodos de administración, pero se pueden seleccionar apropiadamente por parte de los expertos en la especialidad. Por ejemplo, se puede administrar una dosificación de 0,01 mg/kg a 200 mg/kg por cada día. La administración se puede realizar una vez por día o varias veces por día. Correspondientemente, la dosificación no limita el alcance del presente invento en ninguno de sus aspectos.

40 La composición farmacéutica del presente invento se puede administrar a mamíferos tales como ratas, ratones, reses de ganado, seres humanos y similares por medio de diversas rutas. Se pueden usar para la administración todos los tipos de administración conocidos con anterioridad, por ejemplo por vía rectal, o por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterinodural, o intracerebroventricular.

[Mejor modo]

45 Seguidamente se describirán con detalle formas de realización del presente invento con referencia a los dibujos anejos.

Ejemplo 1: Separación y purificación de nuevos compuestos

50 La esponja *Phorbis* sp. que habita en nuestro país se recogió mediante uso de barredoras de piel de buceo, se cortó a un tamaño de aproximadamente 10 cm o menos y se liofilizó durante 3 días, para producir unos materiales secados que tenían un peso en seco de aproximadamente 1 kg. Se añadieron 3,0 litros de metanol a los materiales secados y luego se realizó una extracción a la temperatura ambiente en total dos veces durante 2 días. El extracto

fue repartido usando agua y el disolvente cloruro de metileno, y luego el disolvente se eliminó desde la capa orgánica mediante una evaporación en vacío, seguido por un reparto usando n-hexano y una solución de mezcla de 85 % en peso de metanol y de 15 % en peso de agua. El disolvente se eliminó desde la capa alícuota con 85 % en peso de metanol, y se obtuvo una parte alícuota de aproximadamente 5 g. Una cromatografía de evaporación súbita con sílice en fase inversa se realizó con la parte alícuota obtenida. En el presente caso se usó una sílice de fase inversa C18 como fase estacionaria, y el eluyente se usó en el orden de desde una alta polaridad hasta una baja polaridad, es decir en el orden de 50 % de agua y 50 % metanol, 40 % de agua y 60 % metanol, 30 % de agua y 70 % de metanol, 20 % de agua y 80 % de metanol, 10 % de agua y 90 % metanol, 100 % de metanol, y 100 % de acetona. Se midió la capacidad de diferenciación en osteoblastos del material correspondiente a cada capa. Los resultados demostraron que la capacidad de diferenciación en osteoblastos se encontraba en una parte alícuota con 10 % de agua y 90 % de metanol (116V), y en una parte alícuota con 100 % metanol (116VI), cada una de estas dos partes alícuotas se obtuvo en una cantidad de aproximadamente 1 g.

Con el fin de purificar los compuestos con respecto de las dos partes alícuotas que tienen actividades, se realizó una HPLC semi-preparativa de fase inversa. En primer lugar, se realizó una cromatografía con la parte alícuota 116V en las siguientes condiciones, para obtener los compuestos 1, 9 y 10.

[Columna: YMC ODSC18, diámetro de partículas: 5 μm , tamaño de la columna: 250 x 10 mm (longitud x diámetro), velocidad de elución: 2,0 ml/min, detector: un detector del índice de refracción, eluyente: una mezcla líquida de 65 % en peso de acetonitrilo (ACN) y de 35 % en peso de agua]

Cuando se inyectaron 50 mg de esta parte alícuota líquida, unos componentes en forma de aceite coloreado de anaranjado se separaron en los tiempos de retención de aproximadamente 33 minutos (compuesto 1), 15 minutos (compuesto 9), y 40 minutos (compuesto 10) en unas cantidades de 25 mg, 1,5 mg, y 1,0 mg, respectivamente. La misma HPLC se usó también para la parte alícuota 116VI, pero se usaron unas diferentes condiciones del disolvente de revelado con el fin de separar otros componentes aditivos. En este caso, se usó una mezcla líquida de 70 % en peso de acetonitrilo y 30 % en peso de agua. El tiempo de revelado total de cada tanda ascendió a aproximadamente una hora y media. Una vez que se hubieron inyectado 5 mg de la parte alícuota líquida 116VI, un compuesto 2 que tenía la forma de un aceite coloreado de anaranjado, un compuesto 3 y finalmente un compuesto 4 fueron separados, purificados y obtenidos con unos tiempos de retención de aproximadamente 1 hora y 10 minutos, de aproximadamente 1 hora y 40 minutos, y finalmente de 1 hora y 57 minutos en unas cantidades de 0,5 mg, de 0,08 mg, y finalmente de 0,004 mg.

Ejemplo 2: Análisis de las estructuras químicas de los nuevos compuestos

En primer lugar, se midieron los espectros de resonancia magnética nuclear en hidrógeno de los compuestos 1 hasta 4, 9 y 10 obtenidos a partir de las partes alícuotas líquidas 116V y 116VI con el fin de comprobar las purezas de los mismos y luego se obtuvieron datos espectroscópicos por uso de los siguientes instrumentos. Se usó un espectrómetro de masas (espectrómetro JMS700 de Jeol Inc.) con el fin de medir los pesos moleculares de los respectivos compuestos, y luego se usó un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (espectrómetro VNMRS 500 de Varian Inc.) con el fin de analizar las estructuras químicas exactas de los mismos. Junto a esto, se usaron un espectrómetro Cary50 (de Varian Inc.) y un espectrómetro FT_IR 4100 (de JACSO Inc.) con el fin de medir las bandas de absorción de ultravioletas y las bandas de absorción de infrarrojos de las moléculas de los compuestos, respectivamente, y se usó un polarizador P1010 (de JASCO Inc.) con el fin de medir sus ángulos de polarización.

El compuesto 1 se separó en forma de un aceite coloreado de anaranjado pálido y los datos espectroscópicos de masas FAB de alto rendimiento ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 399,2533) identificaron que el compuesto 1 tiene la fórmula molecular de $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_4$. Se supuso que el compuesto 1 contenía un grupo hidroxilo y un grupo funcional carbonilo a partir de las bandas de absorción características mediante análisis de los espectros de infrarrojos a 3.433 cm^{-1} y 1.680 cm^{-1} . Se usaron los espectros de C^{13}RMN y HRMN para determinar la estructura del compuesto.

Los valores de los desplazamientos químicos para el compuesto 1 se recopilan en la Tabla 1 siguiente.

[Tabla 1]

N°	Compuesto 1 (116-3)	
	δ_c	δ_H (J en Hz)
1	38.8, t	α 2.43, dd (16.1, 13.7) β 2.57, dd (16.1, 3.9)
2	200.7, s	
3	139.5, s	
4	15.9, q	1.81, s
5	141.6, d	6.68, br d (5.4)
6	64.7, d	4.49, dd (5.4, 3.4)
7	34.7, d	2.59, ddd (13.7, 3.9, 3.4)
8	143.7, s	
9	63.8, t	4.03, d (14.7) 4.07, d (14.7)
10	124.7, d	5.54, br s
11	96.1, s	
12	123.0, d	5.28, br s
13	138.7, s	
14	22.8, q	1.75, s
15	36.4, d	α 1.85, dd (17.6, 3.4) β 2.01, dd (17.6, 11.3)
16	66.9, d	4.74, ddd (11.3, 7.8, 3.4)
17	125.8, d	5.22, br d (7.8)
18	142.0, s	
19	16.9, q	1.78, s
20	40.6, t	2.06, m
21	27.5, t	2.12, m
22	125.0, d	5.12, br t (7.4)
23	132.6, s	
24	17.8, q	1.61, s
25	25.9, q	1.68, s

- Un experimento ROESY se realizó con el fin de determinar la estructura estérea relativa de este compuesto. Se determinó que los anillos A y B están unidos en una configuración cis, a partir del NOE entre el hidrógeno (4,49 ppm) y el hidrógeno (2,59 ppm). La configuración estérea del anillo C se pudo determinar de acuerdo con la información del NOE entre el hidrógeno (a 5,28 ppm) y el hidrógeno (a 5,54 ppm) y entre el hidrógeno (a 5,28 ppm) y el hidrógeno (a 2,43 ppm). Finalmente se pudo suponer la configuración espacial del hidrógeno en C-16 a partir de las constantes de acoplamiento (11,3, 7,8, 3,4 Hz) entre átomos de hidrógeno contiguos, lo cual se demuestra indirectamente por el hecho de que el hidrógeno del metilo H-19 tiene unas relaciones de NOE con H-5 y H-6.
- La estructura estereoquímica absoluta del compuesto 1 se determinó mediante un análisis del espectro dicroico circular (CD). Las configuraciones estéreas absolutas en los centros quirales en ciclohexinona se determinaron de acuerdo con la regla del sector de Sneath. Cuando un centro quiral, C-7, en la ciclohexinona del anillo A, tiene una configuración estérea absoluta (S), el compuesto 1 exhibe una absorción positiva en la región de transición nn^* ($330\text{ nm}^{-1} - 350\text{ nm}^{-1}$) en el espectro dicroico circular. Puesto que el compuesto 1 exhibe una absorción positiva en $330\text{ nm}^{-1} - 350\text{ nm}^{-1}$, la configuración absoluta de C-7 en el compuesto 1 se determinó como la configuración estérea (S) (FIG. 2).
- Las estructuras químicas de los otros cinco compuestos se determinaron usando el método antes mencionado. Los datos de RMN en carbono y los datos de RMN en hidrógeno de los respectivos compuestos se representaron en las Tablas 2 hasta 4 siguientes y los datos físicos y espectroscópicos fueron tabulados en la Tabla 5.

[TABLA 2]

	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 9	Compuesto 10
1	38.7, t	29.5, t	29.3, t	38.8, t	38.8, t
2	200.3, s	71.1, d	73.2, d	200.7, s	200.7, s
3	139.6, s	138.5, s	141.5, s	139.5, s	139.5, s
4	15.9, q	21.12, q	19.0, q	15.9, q	15.9, q
5	141.4, d	127.2, d	125.5, d	141.6, d	141.7, d
6	64.5, d	65.1, d	65.0, d	64.7, d	64.7, d
7	35.1, d	30.1, d	33.7, d	34.7, d	34.7, d
8	138.8, s	143.8, s	143.9, s	143.7, s	143.7, s
9	65.7, t	63.9, t	63.8, t	63.8, t	63.8, d
10	127.9, d	124.7, d	124.8, d	124.6, d	124.7, d
11	95.9, s	95.5, s	95.7, s	96.1, s	96.1, s
12	122.6, d	123.5, d	123.5, d	123.0, d	123.0, d
13	139.1, s	138.4, s	138.4, s	138.7, s	138.7, s
14	22.9, q	22.8, q	22.9, q	22.8, q	22.8, q
15	36.3, d	36.4, d	36.4, d	36.3, d	36.3, d
16	66.9, d	66.7, d	66.7, d	66.9, d	66.9, d
17	125.7, d	125.8, d	125.8, d	126.3, d	125.9, d
18	142.0, s	142.1, s	142.1, s	141.1, s	142.0, s
19	16.9, q				
20	40.6, t	40.6, t	40.6, t	43.2, t	36.6, t
21	27.5, t	27.5, t	27.5, t	125.1, d	34.3, t
22	125.0, d	125.0, d	125.0, d	141.4, d	76.2, d
23	132.6, s	132.6, s	132.6, s	71.1, s	148.8, s
24	17.8, q	17.8, q	17.8, q	29.9, q	111.5, d
25	25.9, q	25.9, q	25.9, q	29.9, q	17.7, q
OAc(C=O)	172.3, s	172.7, s	172.4, s		
OAc (Me)	20.7, q	21.07, q	20.9, q		

[TABLA 3]

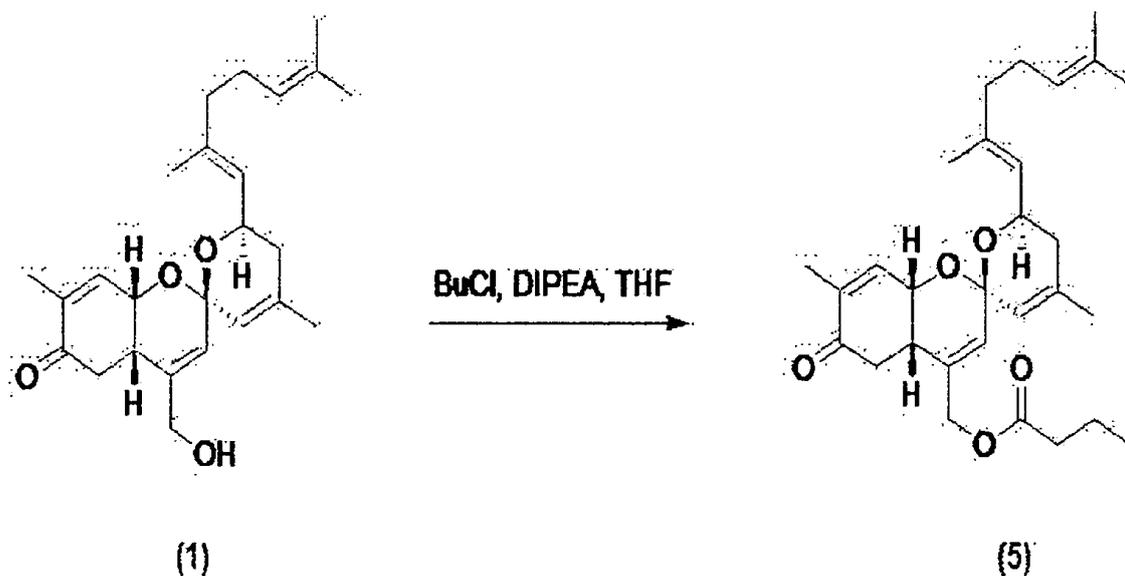
	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4
1	α 2.44, dd (14.2, 11.7) β 2.60, cd (14.2, 3.4)	α 1.72, ddd (14.2, 13.2, 3.9) β 1.96, ddd (14.2, 3.4, 2.0)	α 1.55, ddd (10.5, 11.5, 13.2) β 2.12, m
2		5.22, m	5.37, dd (10.5, 5.9)
4	1.81, s	1.75, s	1.72, s
5	6.69, dd (5.4, 1.5)	5.75, br d (5.4)	5.65, br d (5.1)
6	4.51, dd (5.4, 3.4)	4.33, m	4.27, m
7	2.57, ddd (11.7, 3.4, 3.4)	2.29, ddd (13.2, 3.4, 3.4)	2.17, br d (13.2)
9	4.54, dd (13.2, 1.5)	4.02, dd (14.2, 1.0)	4.03, dd (13.9, 1.2)
	4.65, dd (13.2, 1.5)	4.06, dd (14.2, 1.0)	4.08, dd (13.9, 1.2)
10	5.60, br s	5.51, d (1.0)	5.51, d (1.2)
12	5.28, br s	5.23, m	5.23, m
14	1.75, s	1.74, s	1.75, s
15	α 1.85, dd (17.1, 3.4) β 2.02, dd (17.1, 11.3)	α 1.83, dd (17.1, 3.4) β 2.00, dd (17.1, 11.3)	α 1.83, dd (17.4, 3.2) β 2.01, dd (17.4, 11.3)
16	4.73, ddd (11.3, 8.3, 3.4)	4.72, ddd (11.3, 8.3, 3.4)	4.72, ddd (11.3, 8.3, 3.2)
17	5.22, br d (8.3)	5.21, br d (8.3)	5.20, dd (8.3, 1.2)
19	1.77, d (1.5)	1.76, s	1.75, d (1.2)
20	2.05, m	2.05, m	2.05, m
21	2.13, m	2.12, m	2.11, m
22	5.12, br t (5.4)	5.11, br t (7.1)	5.11, br t (7.1)
24	1.51, br s	1.61, d (0.7)	1.60, d (0.7)
25	1.67, br s	1.67, d (0.7)	1.67, d (0.7)
QAc	2.06, s	2.06, s	2.07, s

[TABLA 4]

	Compuesto 9	Compuesto 10
1	α 2.43, dd (16.6, 13.9)	α 2.43, dd (16.6, 13.9)
	β 2.58, dd (16.6, 3.6)	β 2.58, dd (16.6, 3.7)
4	1.82, s	1.61, d (1.5)
5	6.71, ddd (4.1, 1.6, 1.6)	6.71, dd (5.9, 1.5)
6	4.50, m	4.50, dd (5.9, 3.4)
7	2.59, ddd (13.9, 3.6, 3.6)	2.60, dd (13.9, 3.4)
9	4.04, d (14.4)	4.04, d (14.2)
	4.07, d (14.4)	4.07, d (14.2)
10	5.53, br s	5.54, br s
12	5.29, m	5.29, br s
14	1.76, d (1.3)	1.75, s
15	α 1.86, dd (17.4, 3.4)	α 1.86, dd (17.4, 3.4)
	β 2.04, dd (17.4, 11.3)	β 2.03, dd (17.4, 11.3)
16	4.75, ddd (11.3, 8.3, 3.4)	4.75, ddd (11.3, 8.3, 3.4)
17	5.27, br d (8.3)	5.25, dd (8.3, 1.5)
19	1.75, d (1.2)	1.79, d (1.5)
20	2.75, d (6.4)	2.08, m
21	5.59, dd (16.5, 6.4)	1.65, td (7.8, 6.9)
22	5.65, d (16.5)	3.99, t (6.9)
24	1.28, s	4.82 brs; 4.92, br s
25	1.28, s	1.71, br s

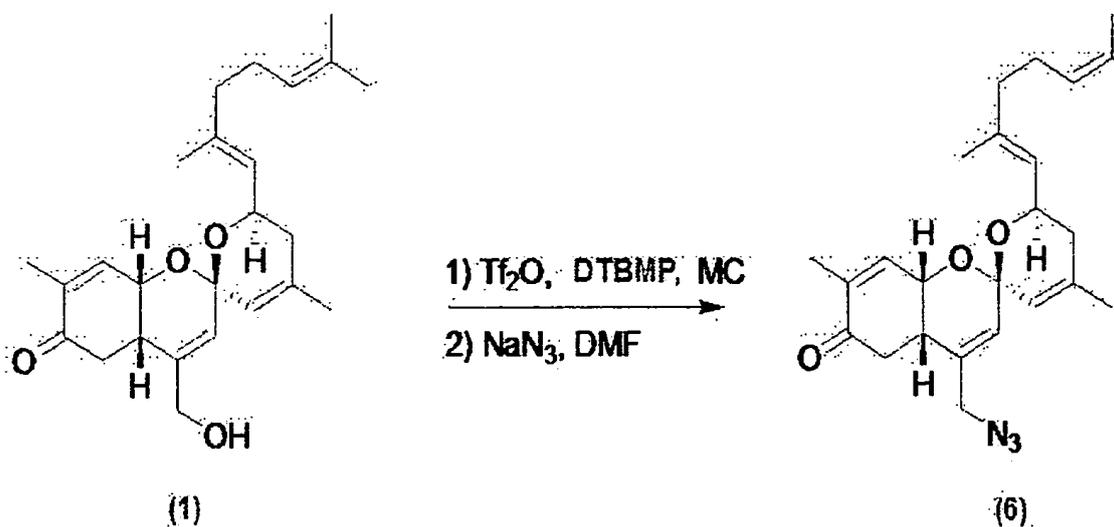
[TABLA 5]

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 9	Compuesto 10
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₃₄ O ₄	C ₂₇ H ₃₆ O ₅	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	C ₂₇ H ₃₈ O ₅	C ₂₅ H ₃₄ O ₅	C ₂₅ H ₃₁ O ₆
Peso molecular	398	440	442	442	414	414
Color	Anaranjado pálido	Anaranjado pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido
Banda de absorción de infrarrojos (cm ⁻¹)	3433, 2913, 1680, 1000	2920, 1743, 1681, 1225	3430, 2918, 1735, 1238	3387, 2914, 1673, 1000	3414, 2917, 1678	3413, 2925, 1678
Banda de absorción de Ultravioletas (nm)	203, 230	203, 229	203	203	203, 227	204, 225
Ángulo de polarización [α] _D ²⁵ en MeOH	-118,1 (c 0,15)	-63,9 (c 0,15)	-102,3 (c 0,15)	-148,7 (c 0,15)	-78,7 (c 0,15)	-57 (c 0,15)
Solubilidad	Fácilmente disuelta en un disolvente orgánico de acetona, metanol, DMSO, etc					

Ejemplo 3: Síntesis de un derivado del compuesto 1 mediante una reacción de esterificación

5 El compuesto 1 del presente invento se disolvió en tetrahidrofurano, y luego la temperatura se disminuyó a 0-5°C. Se añadieron secuencialmente a esto diisopropil-etil-amina y cloruro de butirilo. El material resultante se agitó a 0-5°C durante 1 hora y se extrajo por adición de acetato de etilo y agua y luego la capa de disolvente orgánico se separó y destiló. El material residual fue purificado mediante una cromatografía en columna de evaporación súbita para obtener el compuesto 5.

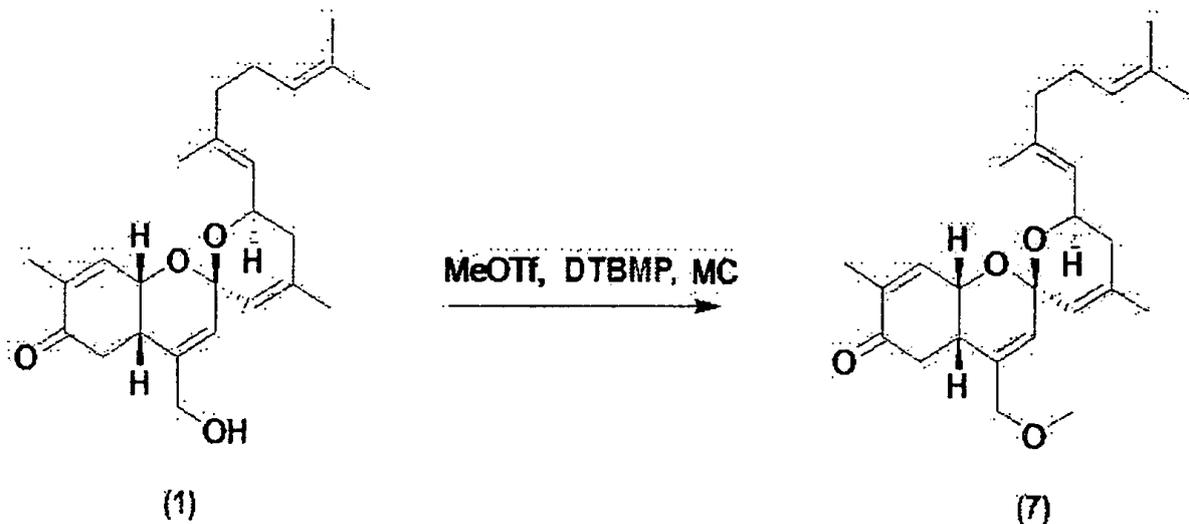
Compuesto 5 (C₂₉H₄₁O₅): [M+H]⁺ = 469,29

Ejemplo 4: Síntesis de un derivado del compuesto 1 mediante reacción de sustitución de azida

10 El compuesto 1 del presente invento se disolvió en cloruro de metileno, y luego la temperatura se disminuyó a 0-5°C, y se añadieron secuencialmente a esto di-terc.-butil-metil-piridina y anhídrido de ácido trifluorometanosulfónico. El material resultante se agitó durante 30 minutos, y se extrajo mediante la adición de cloruro de metileno y agua. La capa de disolvente orgánico se separó y destiló, y la totalidad del disolvente se evaporó. El material residual se disolvió de nuevo en dimetilformamida y se añadió a ello aziduro de sodio. El material resultante se agitó a la

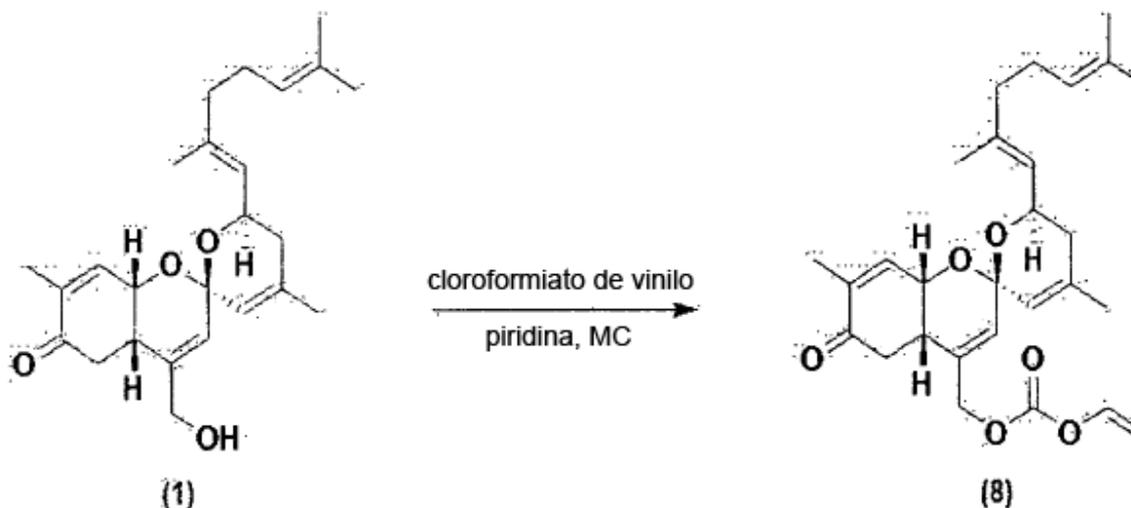
15 temperatura ambiente durante 3 horas, se diluyó mediante la adición de cloruro de metileno y luego se lavó con agua varias veces. La capa de disolvente orgánico se separó y destiló y luego el material residual se purificó mediante una cromatografía en columna de evaporación súbita para obtener el compuesto 6.

Compuesto 6 (C₂₅H₃₄N₃O₃): [M+H]⁺ = 424,26

Ejemplo 5: Síntesis de un derivado de éter del compuesto 1

El compuesto 1 del presente invento y la di-terc.-butil-metil-piridina se disolvieron en cloruro de metileno y luego se añadió a ello un trifluorometanosulfonato. El material resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 3 horas y luego el disolvente se evaporó. El material residual se purificó mediante una cromatografía en columna de evaporación súbita para obtener el compuesto 7.

Compuesto 7 (C₂₆H₃₇O₄) : [M+H]⁺ = 413,27

Ejemplo 6: Síntesis de un derivado de carbonato del compuesto 1

El compuesto 1 del presente invento se disolvió en cloruro de metileno y luego la temperatura se disminuyó a 0-5°C. La piridina y cloroformiato de vinilo se añadieron secuencialmente a éste. El material resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora, se diluyó con cloruro de metileno y luego se lavó con agua. La capa en disolvente orgánico se separó y destiló, y luego el material resultante se purificó mediante una cromatografía de columna de evaporación súbita para obtener el compuesto 8.

Compuesto 8 (C₂₈H₃₇O₆) : [M+H]⁺ = 469,26

Ejemplo experimental 1: Medición de la actividad de formación de osteoblastos de los nuevos compuestos (ensayo de deposición de calcio)

Unas células C3H/10T1/2, que son unas células progenitoras mesenquimales de ratón adquiridas de ATCC, fueron diluidas en un DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) que contenía HEPES 5,958 g/l, bicarbonato de sodio 3,7 g/l, y FBS (suero de bovino fetal) al 10%, y se cultivaron en unas placas de cultivo de 24 pocillos con una

densidad de 4×10^4 células/pocillo en la presencia de CO_2 al 5 % a 37°C durante 2 días. Las células cultivadas se hicieron crecer hasta una confluencia de 90-100 % en las placas de cultivo, las células se cultivaron en un medio DMEM que contenía FBS al 10 %, al que se habían añadido β -glicerofosfato 10 mM y ácido ascórbico 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la presencia de CO_2 al 5 % a 37°C durante 6 días, con el fin de inducir una diferenciación en osteoblastos. El medio se intercambiaba una vez cada dos días durante la diferenciación. El linaje de células C3H/10T1/2, en donde se había inducido una diferenciación en osteoblastos, se lavó con una PBS (solución salina tamponada con fosfato) una vez y se fijó con etanol al 70 % a 20°C durante 1 hora. Las células, después de la fijación fueron lavadas tres veces con PBS frío y se tiñeron con una solución 40 mM del colorante Rojo de Alizarina S a la temperatura ambiente durante 20 minutos. La solución de colorante se eliminó y las células se lavaron tres veces con agua destilada con el fin de observar selectivamente tan sólo las células que se habían diferenciado en los osteoblastos.

La parte alícuota 116V y la parte alícuota 116VI extraídas a partir de esponjas y repartidas se disuelven en el disolvente DMSO y se usan para tratar el linaje celular C3H/10T1/2 de células progenitoras mesenquimales, en unas concentraciones de 1, 2,5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como resultado se mostró que la capacidad de diferenciación para dar osteoblastos se había aumentado notablemente de una manera dependiente de la concentración y se observó una débil citotoxicidad en una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Desde entonces, se realizó el mismo experimento con el compuesto 1 (1163), el compuesto 2 (1162), el compuesto 3 (1161) y el compuesto 4 (1164), que fueron puramente separados desde las partes alícuotas 116V y 116VI, y como resultado de ello, se pudo confirmar que la capacidad de diferenciación en osteoblastos había aumentado en los compuestos 1, 3 y 4. Las concentraciones con las que se exhibía la máxima actividad eran un poco diferentes. El compuesto 3 (116-1) mostró la máxima actividad con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y su citotoxicidad era observable en las concentraciones que siguen a ésta. El compuesto 1 (116-3) mostró una actividad notablemente aumentada en las concentraciones hasta de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de una manera dependiente de la concentración y la citotoxicidad en la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de manera similar a la actividad de la parte alícuota 116V separada en forma impura. El compuesto 4 mostró la actividad máxima en la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la toxicidad del mismo se observó en las concentraciones que siguen a ésta (FIG. 3). Con el fin de estudiar el mecanismo con respecto a la capacidad de diferenciación en osteoblastos, los linajes celulares C3H/10T1/2 fueron tratados con el compuesto 1 y con el compuesto 4 durante 6 días, respectivamente. Se encontró que el grado de transcripción de los factores de marca de diferenciación (Runx2, Osteocalcina, Msx2, etc.) de los osteoblastos se había aumentado notablemente, usando una PCR en tiempo real (RT-PCR) (FIG. 4). También los linajes celulares C3H/10T1/2 fueron tratados con el compuesto 1 y con el compuesto 4 durante 6 días, respectivamente. Se encontró que la expresión de proteínas de Runx2 y TAZ había aumentado, usando una transferencia de borrón Western (FIGS. 5 y 6). Por lo tanto, se pudo encontrar que los compuestos del presente invento conducen a un aumento de las cantidades de las proteínas Runx2 y TAZ por medio de una regulación después de una transcripción y por lo tanto se podía favorecer una diferenciación en los osteoblastos. Además se pudo averiguar que la combinación de las proteínas Runx2 y TAZ aumentaba por tratamiento de los compuestos y por lo tanto aumentaba la actividad de una transcripción mediada por Runx2. El compuesto 5, que es un derivado de éster del compuesto 1 (1163), se sintetizó con el fin de preparar un material que tenía la bioactividad más excelente y se determinó de esta manera la estructura del compuesto 5. Además, mediante un ensayo de deposición de calcio acerca de la actividad fisiológica (capacidad de diferenciación en osteoblastos) del derivado obtenido se encontró que el compuesto 5, que es un derivado del compuesto 1, también favorece la diferenciación en osteoblastos en un grado similar al del compuesto 1 (FIG. 7). Por lo tanto se espera que los compuestos del presente invento y sus derivados favorezcan la diferenciación en osteoblastos y por lo tanto desempeñan un cometido innovador en el tratamiento de la osteoporosis.

Ejemplo experimental 2: Medición de la capacidad inhibidora de la diferenciación en adipocitos de los nuevos compuestos

Unas células C3H/10T1/2 que son células progenitoras mesenquimales de ratón adquiridas de ATCC, fueron diluidas en un DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) que contenía HEPES 5,958 g/l, bicarbonato de sodio 3,7 g/l, FBS (suero de bovino fetal) al 10 %, y se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos con una densidad de 4×10^4 células/pocillo en la presencia de CO_2 al 5 % a 37°C durante 2 días. Cuando las células cultivadas se hicieron crecer hasta una confluencia de 90-100 % en las placas de cultivo, las células fueron cultivadas en un medio DMEM que contenía FBS al 10 %, al que se añadieron insulina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dexametasona 1 μM y troglitazona 5 μM en la presencia de CO_2 al 5 % a 37°C durante 8 días, con el fin de inducir la diferenciación en adipocitos. El medio se intercambiaba una vez cada dos días durante la diferenciación. El linaje de células C3H/10T1/2 en donde se había inducido la diferenciación en los adipocitos, se fijó con formaldehído al 3,7 % a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Una solución en aceite rojo O disuelto en isopropanol en una concentración de 0,5 % se diluyó en agua destilada en una relación de 6:4, se filtró a través de un filtro de 0,2 μm , y se vertió en el linaje de células fijadas, que fue teñido durante 1 hora. Con el fin de observar solamente las células que se habían diferenciado en los adipocitos la solución de colorante se retiró y las células se lavaron dos veces con agua destilada.

Una muestra 116V extraída a partir de la esponja se disolvió en el disolvente DMSO y se dejó que tratase a los linajes celulares C3H/10T1/2, que son unas células progenitoras mesenquimales de ratón, en unas concentraciones de 1, 2,5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados mostraron que la capacidad de diferenciación en adipocitos había

disminuido notablemente de una manera dependiente de la concentración. Luego, después de que se hubieron obtenido muestras del compuesto 1 (1163), del compuesto 2 (1162), del compuesto 3 (1161), y del compuesto 4 (1164), que fueron separadas en estado puro a partir de las especies 116V y 116VI, se realizó el mismo experimento. Los resultados experimentales mostraron que las capacidades de diferenciación en adipocitos de los compuestos habían disminuido notablemente en la concentración de 10 µg/ml. En particular la muestra del compuesto 1 (116-3) exhibió una notable capacidad inhibitoria de la diferenciación en adipocitos incluso en una baja concentración (1 µg/ml), en comparación con la otra especie. No se observó ninguna citotoxicidad notable en cada una de las muestras durante la diferenciación en adipocitos (FIG. 8). Como resultado del ensayo de la eficacia de ensayo del compuesto 1 en células 3T3-L1, el compuesto 1 exhibió una muy superior capacidad inhibitoria de la diferenciación en adipocitos incluso en estas células (FIG. 9).

Ejemplo experimental 3: Medición de la eficacia antagonista y la selectividad de los nuevos compuestos con respecto al receptor hepático X (LXR)

El linaje de células de animal CV-1 se usó en una investigación de transfección. Las células fueron cultivadas en un medio DMEM dentro de un dispositivo de cultivo de células que contenía dióxido de carbono al 5 % a 37°C. El medio contenía FBS (suero de bovino fetal) al 19 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. En el día 1 del experimento, se sembraron células CV1 en placas de 96 pocillos a razón de 5.000 células/pocillo. En el día 2, las células sembradas fueron transfectadas con un plásmido que expresaba el GAL-hLXR, un plásmido que expresaba el gen de luciferasa, y un plásmido que expresaba la β-galactosidasa usando un reactivo de transfección, Superfect (de QIAGEN). Después de 16 horas, las células transfectadas fueron tratadas con el compuesto 1, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) por ciertas concentraciones, juntamente con el agonista, TO901317 (2,5 µM)). Unas células tratadas con dimetilsulfóxido que tenían una concentración final de 1% se usaron como un conjunto testigo negativo y unas células tratadas con TO901317 que tenían una concentración final de 500 nM se usaron como un conjunto testigo positivo. Las células fueron cultivadas durante 24 horas, y lisadas usando un tampón de lisis. Se añadió luciferina a las células con el fin de medir la actividad de luciferasa usando un luminómetro. La actividad de β-galactosidasa después de haber añadido un reactivo ONPG, se midió usando un aparato lector de ELISA. El valor de luciferasa medido fue corregido por el valor de la actividad de β-galactosidasa. Los resultados mostraron que el compuesto 1 tenía unos valores de CI_{50} de 18,7 y 20,4 nM en LXRα y LXRβ, respectivamente (FIG. 10). Además se midieron las actividades sobre diversos receptores nucleares usando el mismo método, con el fin de medir la selectividad para diversos receptores nucleares. Sin embargo el compuesto 1 nunca mostró una actividad sobre los otros receptores nucleares (FIG. 11). También un experimento con Biacore probó que el compuesto 1 se había unido directamente con la proteína LXR (FIG. 12).

Ejemplo experimental 4: Medición de la citotoxicidad de los nuevos compuestos

Se usaron unas células esplénicas de un ratón para la medición de la citotoxicidad en células anormales. Las células esplénicas del ratón fueron preparadas de la siguiente manera. El bazo de un ratón con 5-6 semanas de edad fue finamente cortado en trozos y solamente se filtraron las células esplénicas flotantes a través de una red que tenía un tamaño de poros de 100 µm. Los eritrocitos mezclados con las células esplénicas fueron lisados usando un tampón de lisis de eritrocitos y luego se retiraron por centrifugación, precipitación y lavado de las células. Las células esplénicas preparadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos en una concentración de 5×10^5 células/pocillo. Aquí, las células esplénicas fueron tratadas con el compuesto de Fórmula 1 para la medición de la toxicidad en función de las concentraciones. Al día siguiente, las células cultivadas durante 16-18 horas fueron tratadas con el sistema de ensayo Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (de Promega), y después de 10 minutos, se midió la viabilidad de las células usando el luminómetro. Se ha mostrado que el compuesto 1 tiene poca citotoxicidad sobre células normales al exhibir un valor de CI_{50} de la citotoxicidad de 63 µM en células esplénicas de ratón, que es 1.000 veces mayor o más comparado con una concentración del antagonista contra el LXR (FIG. 13).

Ejemplo experimental 5: Verificación de la función de la expresión de genes por nuevos compuestos en células hepáticas

Con el fin de verificar la eficacia del antagonista del receptor hepático X desarrollado, la función de regular la expresión del gen fue identificada en células hepáticas de ratón y en células hepáticas humanas. En el presente experimento, se usaron células hepáticas de ratón, células AML 12 y células hepáticas humanas, y células HepG2. Las células AML12 fueron cultivadas en un medio DMEM dentro de un aparato incubador de células con dióxido de carbono 5 % a 37°C. El medio contenía suero de bovino fetal (FBS) al 10 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. En el día 1 del experimento, se siembran células AML12 en placas de 6 pocillos. En el día 2, cuando las células se habían HECHO crecer hasta una confluencia de 80 %, el medio fue reemplazado por el medio DMEM que no contenía suero, y luego tres pocillos por cada conjunto en tratamiento fueron tratados con TO901317 y el antagonista de receptores hepáticos X desarrollados. Unos pocillos tratados con dimetilsulfóxido que tenían la concentración final de 0,2 % se usaron como conjunto testigo negativo, y unos pocillos tratados con TO901317 que tenían la concentración final de 500 nM se usaron como conjunto testigo positivo. El compuesto 1, que fue desarrollado para descubrir la eficacia del antagonista, se usó solamente en una concentración de 1 µM, o se usó juntamente con 500 nM de TO901317. A continuación de la incubación durante 18 horas, los ARN's de células

5 hepáticas totales se extrajeron usando un estuche RNeasy total RNA extraction kit (de QIAGEN). Los ARN's
extraídos fueron cuantificados, y se usó 1 µg de los ARN's por cada muestra en la síntesis de un ADNc
(cromosomal). Un estuche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (de Roche) se usó en la síntesis de ADNc.
Un análisis genético se realizó con los ADNc's de células hepáticas sintetizados usando una reacción en cadena de
10 la polimerasa en tiempo real. Los ADNc's sintetizados para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se
mezclaron con unos cebadores selectivos para el gen ACC1 o de actina y una mezcla QuantiTech Master Mix (de
QIAGEN). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, a 60°C
durante 15 segundos y 72°C durante 20 segundos. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en triplicado
para cada muestra de ADNc. Con el fin de comparar entre sí las cantidades expresadas de cada gen por cada
15 conjunto de tratamiento, se obtuvieron unos valores de Ct para cada muestra usando un software (programa lógico)
de análisis de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los valores de Ct por cada grupo de
tratamiento fueron comparados con los valores de Ct del conjunto testigo negativo y se calcularon las diferencias en
la cantidad expresada de genes. La diferencia en la cantidad expresada del gen que interesaba por cada grupo de
tratamiento se corrigió por la diferencia en la cantidad expresada del gen de GAPDH. Los resultados experimentales
mostraron que el compuesto 1 inhibía de una manera muy efectiva la expresión de genes de biosíntesis de ácidos
grasos causantes del hígado graso, SREBP1c, ACC y FAS, (FIG. 14).

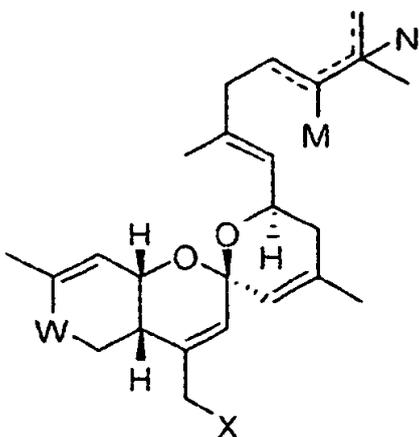
Ejemplo experimental 6: Medición de la eficacia inhibidora del hígado graso de los nuevos compuestos en modelos con animales experimentales

20 Con el fin de verificar la eficacia inhibidora del hígado graso del compuesto 1 desarrollado en el presente invento, se
usaron en este experimento unos ratones C57BL/6. Se construyó un modelo de hígado graso por administración del
TO901317, que genera el hígado graso, a unos ratones C57BL/6 con una edad de 10 semanas mientras que se
alimentaba a estos ratones C57BL/6 con un aditivo general para piensos. Se observó la eficacia inhibidora del
hígado graso del compuesto 1 mediante administración por vía oral de este compuesto. Se usó un ratón alimentado
25 con 0,75 % de carboximetilcelulosa a solas, como suministrador de medicación como un conjunto testigo negativo, y
se usó un ratón alimentado con solamente TO901317 como un conjunto testigo positivo. Además, con el fin de
analizar la expresión de genes de un hígado de ratón C57BL/6, los hígados de ratones del conjunto testigo negativo,
del conjunto testigo positivo y del conjunto en tratamiento se extrajeron y trataron con Trizol, para obtener los ARN's.
Los ARN's obtenidos fueron cuantificados usando un espectrómetro de absorción (Nanodrop), y los ADNc's se
30 obtuvieron a partir de los ARN's que tenían la misma cantidad entre conjuntos respectivos por medio de un método
de RT-PCR usando un oligo dT y una transcriptasa inversa. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
se realizó usando los ADNc's, que se obtuvieron para el análisis del cambio de ARNm (mensajero) entre conjuntos,
como moldes, y usando cebadores de genes transportadores relacionados con la síntesis de grasas y la corriente de
entrada de grasa en el hígado. Los resultados experimentales mostraron que no había ninguna diferencia en el peso
corporal entre el conjunto en tratamiento y los conjuntos testigos cuando el compuesto 1 se administró a ratones
35 inducidos para desarrollar el hígado graso y el compuesto 1 exhibió también una muy superior eficacia inhibidora
de hígados grasos en el modelo de animales experimentales (FIGS. 15 y 16). Además, los resultados analíticos acerca
de la expresión de genes mostraron que el compuesto 1 inhibe de una manera muy efectiva la expresión de genes
de síntesis de ácidos grasos, que son causantes del hígado graso y de genes transportadores para el transporte de
grasas hasta el hígado (FIG. 17). Correspondientemente, se espera que los compuestos del presente invento y sus
40 derivados desempeñen un cometido muy innovador en el tratamiento de un hígado graso alcohólico, de un hígado
graso no alcohólico y de un hígado graso debido a una infección causada por virus.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula 1 siguiente, un estereoisómero del mismo, un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



5

en donde:

W es CO o CHOR₁

X es N₃, NHR₂, OR₂, SR₂, SeR₂ o TeR₂;

R₁ y **R₂** se seleccionan, independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8,

alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20, heteroarilo de C4-C20, o



Y es O, S o NR₄;

Z es un enlace simple, NH, O, S, Se o Te;

R₃ y **R₄** se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, cicloalquilo de C3-C8, arilo de C6-C20 o heteroarilo de C4-C20, y

M y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

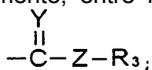
2. El compuesto de Fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la reivindicación 1,

en donde **W** es CO o CHOR₁

X es N₃, NHR₂, OR₂, SR₂, SeR₂ o TeR₂;

R₁ y **R₂** se seleccionan, independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8,

alquino de C2-C8, lineal o ramificado, o



Y es O, S o NR₄;

Z es un enlace simple, NH, O o, S;

R₃ y **R₄** se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8 o alquino de C2-C8, lineal o ramificado, y

M y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

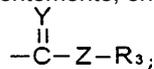
3. El compuesto, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 2,

en donde **W** es CO o CHOR₁;

X es N₃, OR₂ o SR₂

R₁ y **R₂** se seleccionan, cada uno de ellos independientemente, entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno

de C2-C8, alquino de C2-C8, lineal o ramificado, o



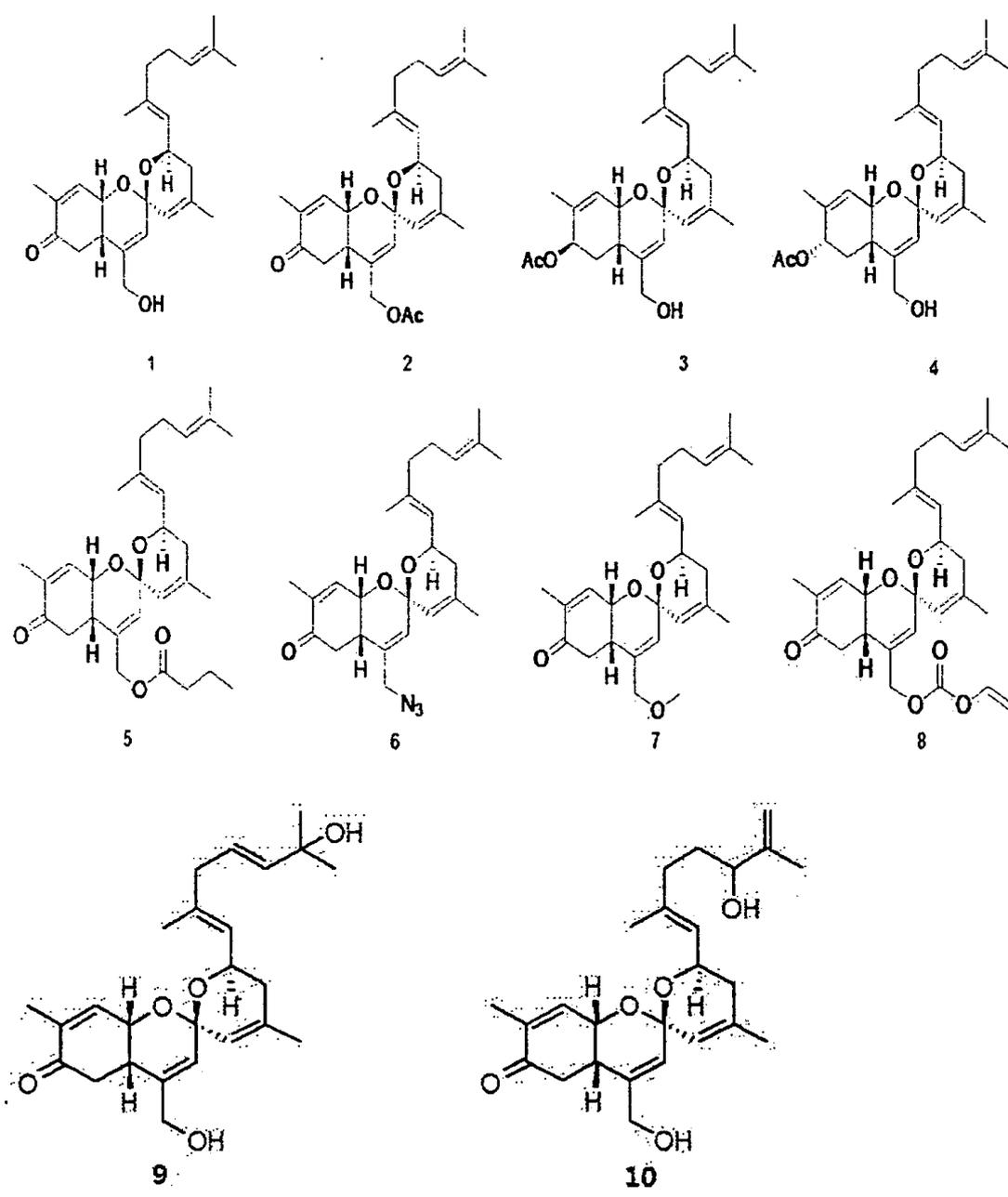
Y es O o S;

Z es un enlace simple

R₃ se selecciona entre hidrógeno, alquilo de C1-C8, alqueno de C2-C8 o alquino de C2-C8, lineal o ramificado; y

M y **N** son, cada uno de ellos independientemente, hidrógeno, OH, o no existen; en donde un átomo de carbono unido a **M** o **N** forma un enlace simple o un enlace doble con otros átomos de carbono y el número de enlaces dobles es de uno o menos para cada uno de los átomos de carbono.

5 4. El compuesto, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 3, en donde el compuesto de Fórmula 1 se selecciona entre el conjunto que consiste en:

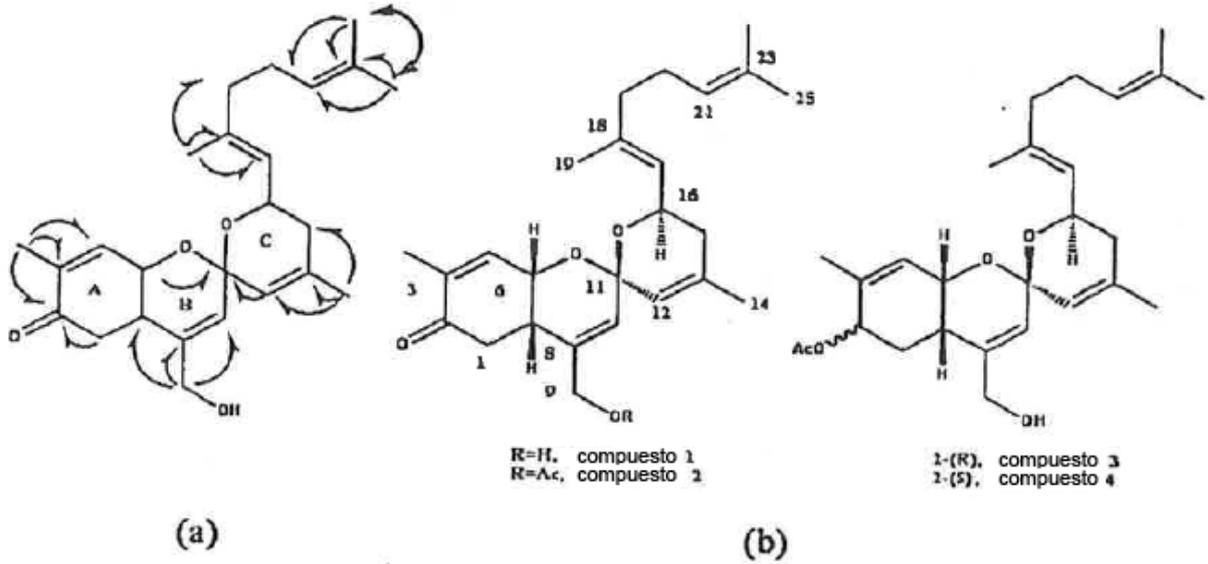


10 5. Un método de preparación del compuesto de Fórmula 1 de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 (a) cortar y secar la esponja *Phorbis* sp., seguido por una extracción usando un alcohol de C1-C4;
 (b) repartir el extracto obtenido de la etapa (a) usando agua y cloruro de metileno y luego eliminar el disolvente de la capa orgánica, seguido por repartir de nuevo usando n-hexano y una solución en una mezcla de metanol y agua; y
 (c) eliminar el disolvente de la capa alícuota de metanol obtenida de la etapa (b) y luego obtener una parte alícuota por cromatografía usando sílice como una fase estacionaria y usando una solución en metanol como eluyente, conteniendo o no la solución en metanol 20 % en peso o menos de agua basado en el peso total del mismo.

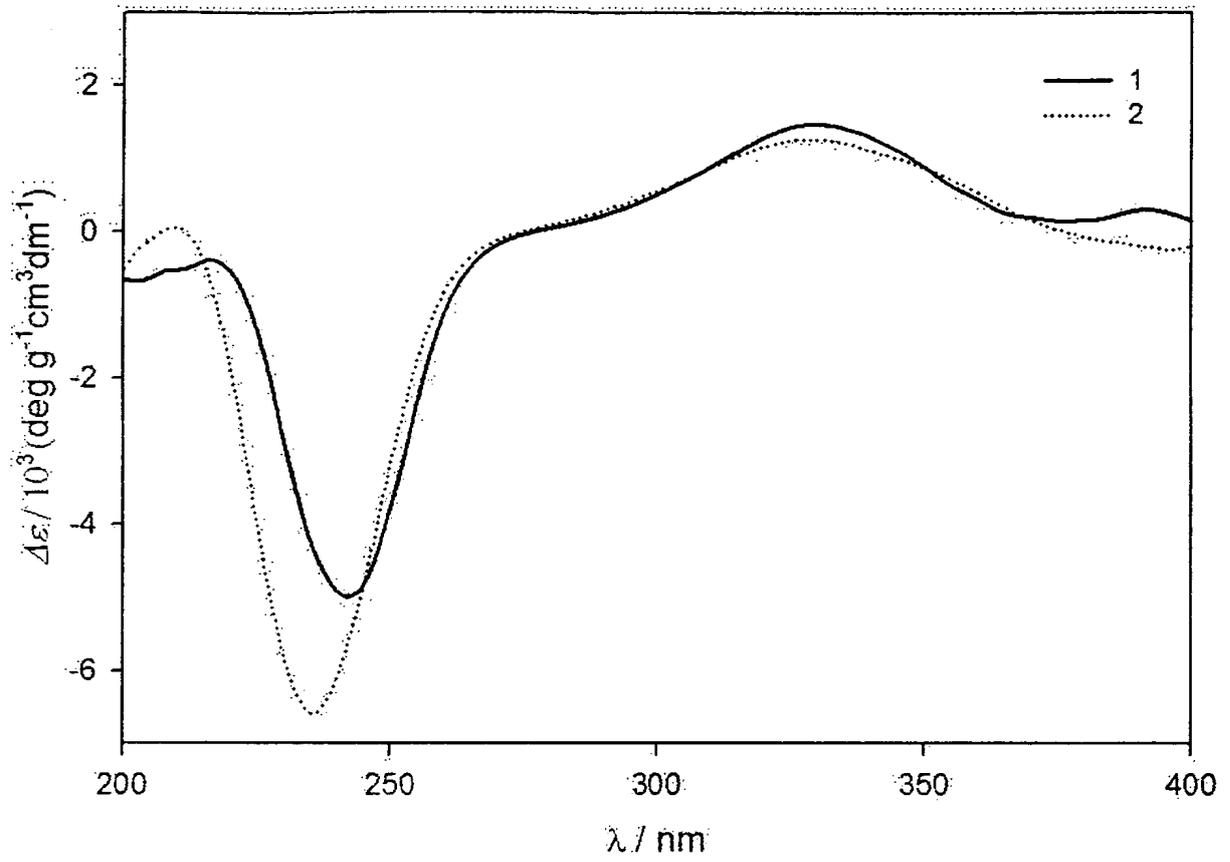
15

6. El método de la reivindicación 5, en donde en la etapa (a) se usa una liofilización para la desecación y se usa metanol para el alcohol de C1-C4.
7. El método de la reivindicación 5, en donde en la etapa (b) la solución en una mezcla de metanol y agua contiene 60-90 % en peso de metanol y 10-40 % en peso de agua basado en el peso total de la solución.
- 5 8. El método de la reivindicación 5, en donde en la etapa (c), la cromatografía se realiza una o más veces en el orden de desde el eluyente que tiene la polaridad más alta hasta el eluyente que tiene la polaridad más baja, por uso de una solución en una mezcla de agua y metanol que tiene una polaridad mayor que el eluyente, antes de usar la solución metanol que contiene o no 20 % en peso o menos de agua basado en el peso total del eluyente.
- 10 9. El método de la reivindicación 5, que comprende además (d) purificar la parte alícuota obtenida a partir de la etapa (c), en donde la purificación se realiza mediante una cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC) y como el eluyente se usa una mezcla líquida de 50-80 % en peso de acetonitrilo (ACN) y de 20-50 % en peso de agua, basado en el peso total del eluyente.
- 15 10. Una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la osteoporosis, que comprende el compuesto de fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente del mismo, de la reivindicación 1, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.
11. Una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento del hígado graso, que comprende el compuesto de Fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la reivindicación 1, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.
- 20 12. Una composición farmacéutica destinada a su uso en el tratamiento de la obesidad, que comprende el compuesto de Fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la reivindicación 1, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.
- 25 13. Una composición farmacéutica destinada a su uso en antagonizar a un receptor hepático X (LXR), que comprende el compuesto de Fórmula 1, el estereoisómero del mismo, el enantiómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la reivindicación 1, como un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente activo.

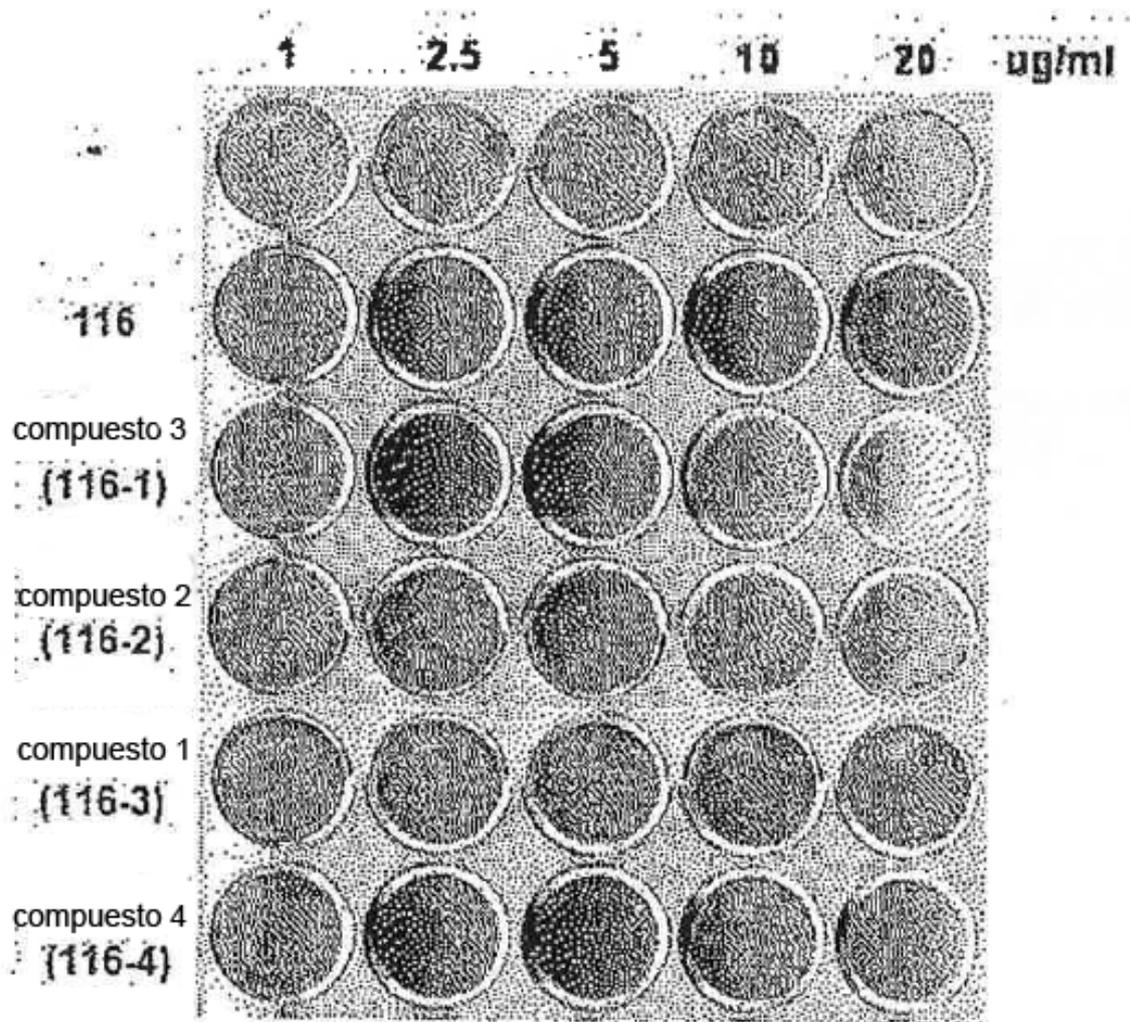
[FIG. 1]



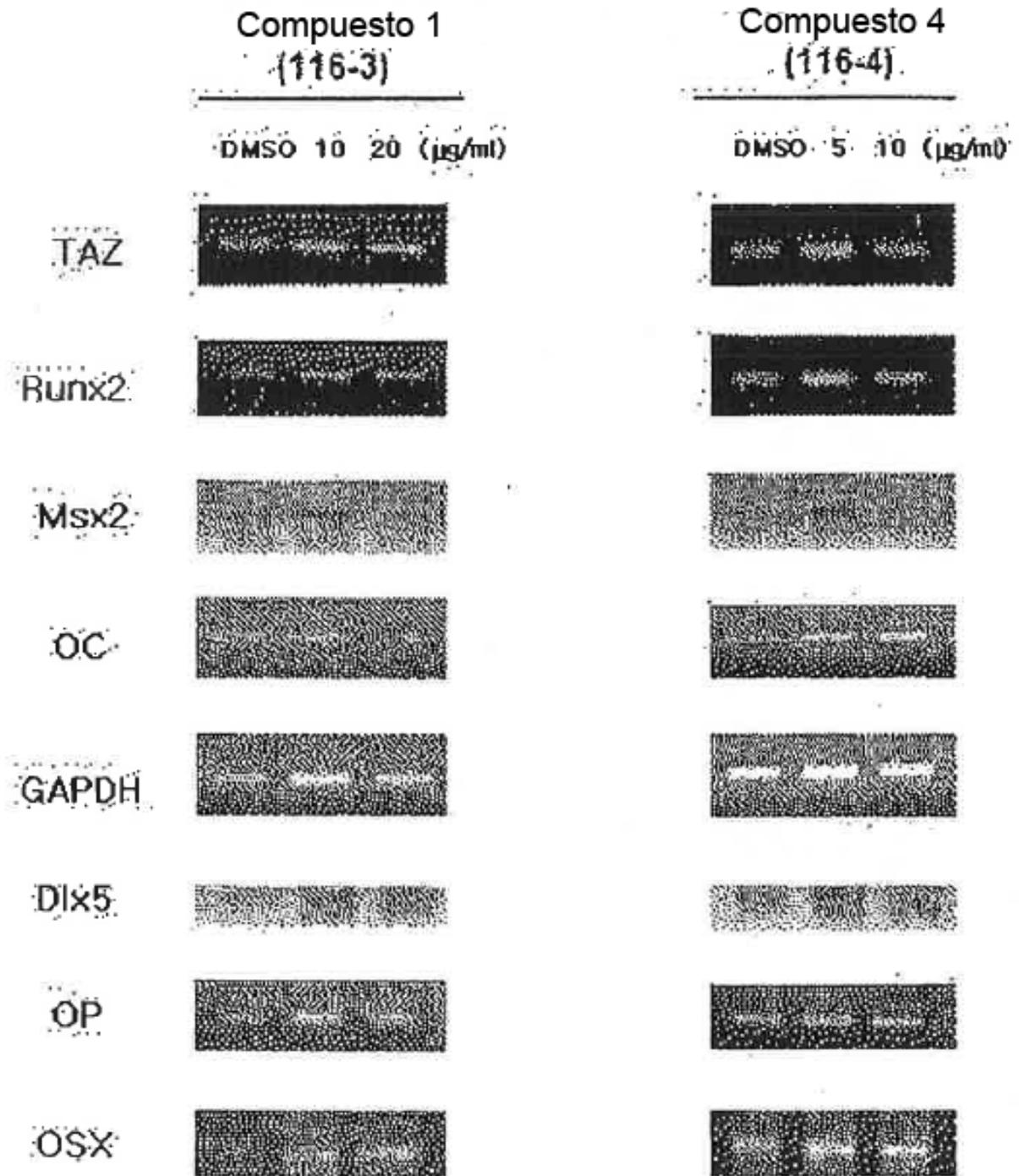
[FIG. 2]



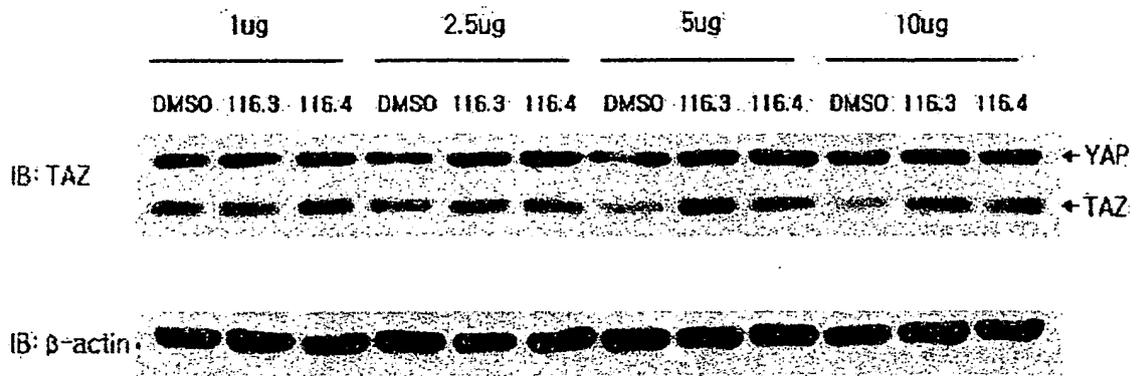
[FIG. 3]



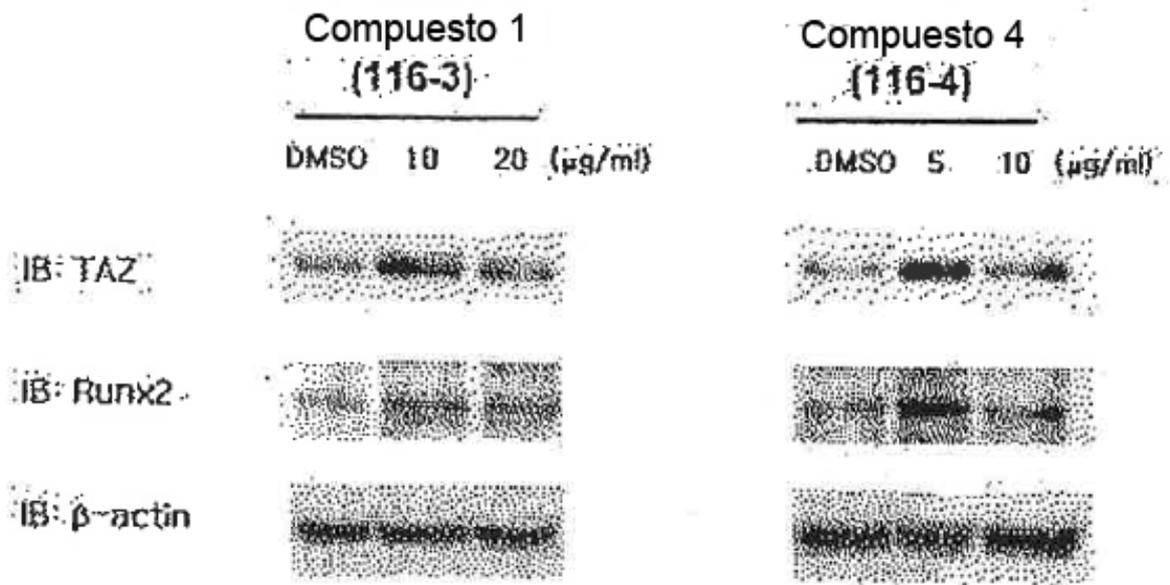
[FIG. 4]



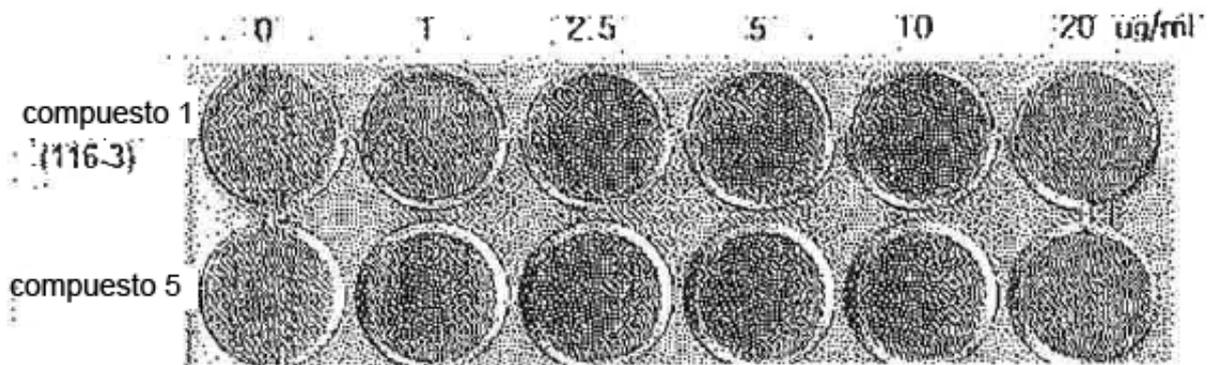
[FIG.5]



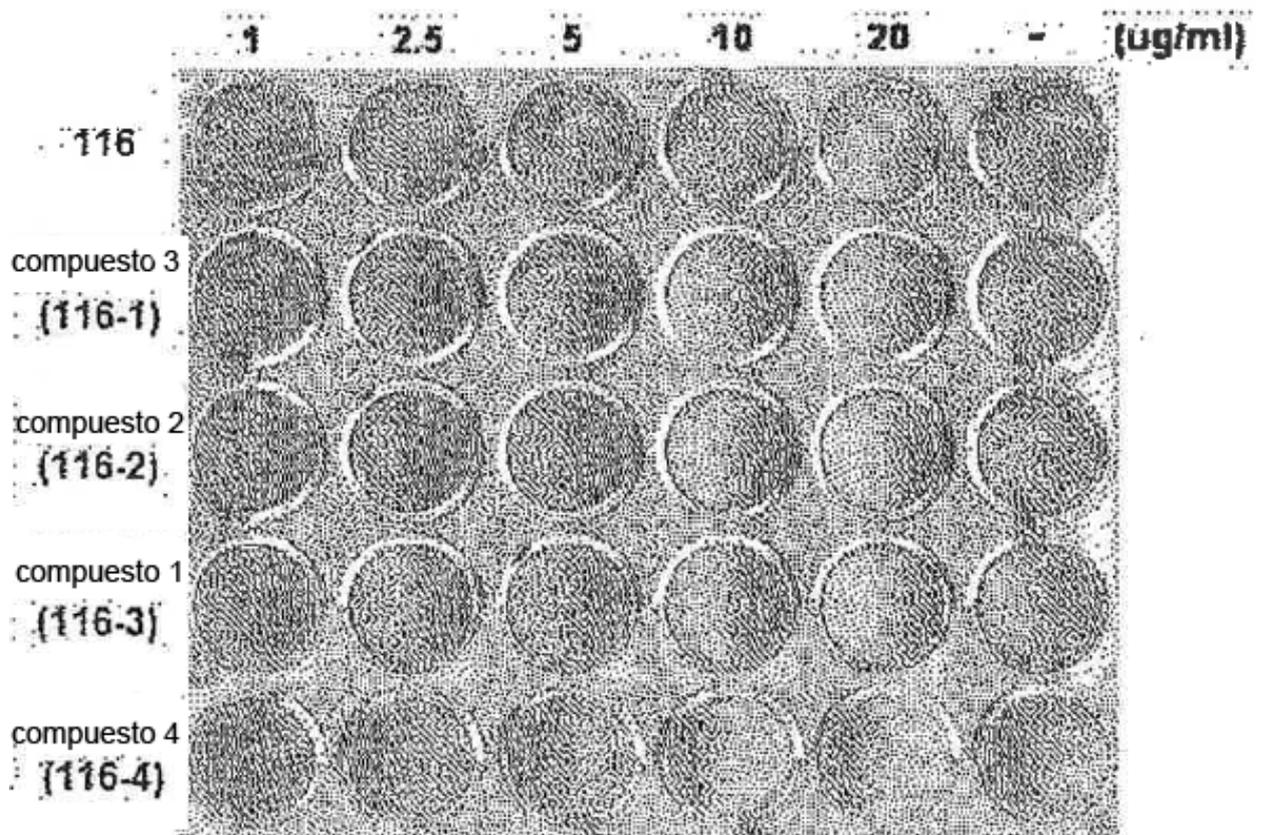
[FIG.6]



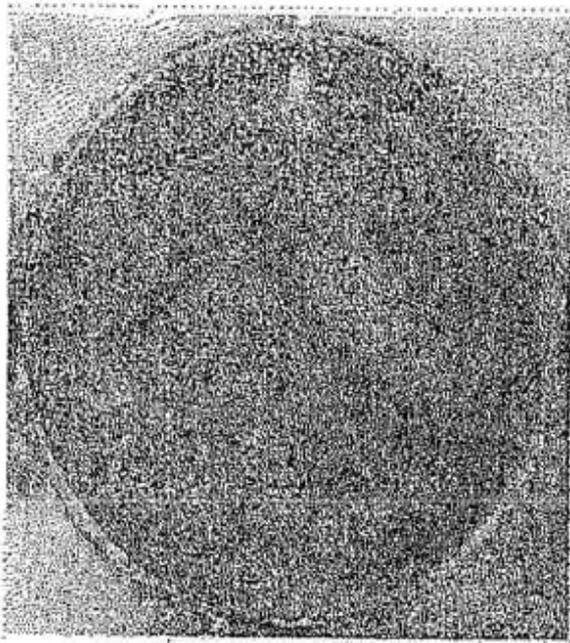
[FIG. 7]



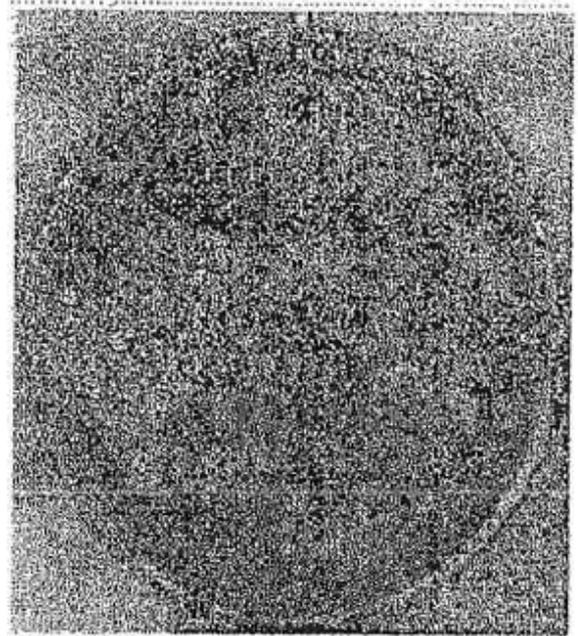
[FIG. 8]



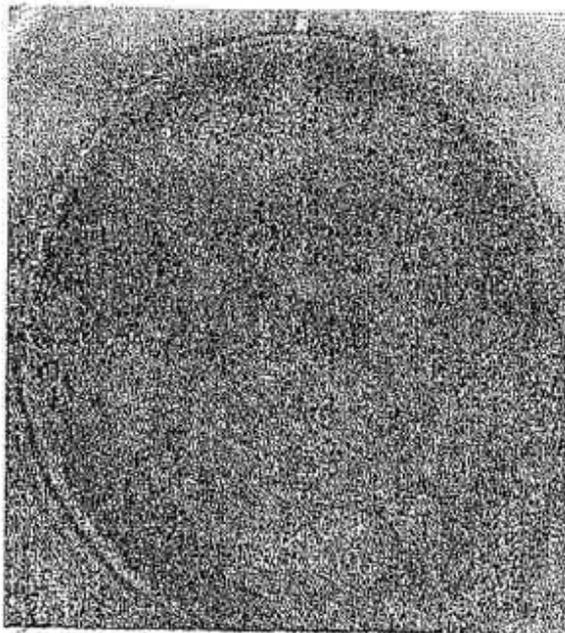
[FIG. 9]



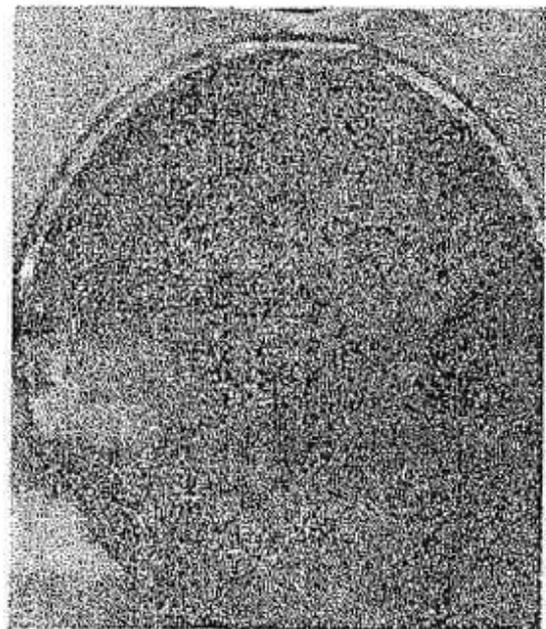
Testigo negativo



T0901317 (1 μ M)

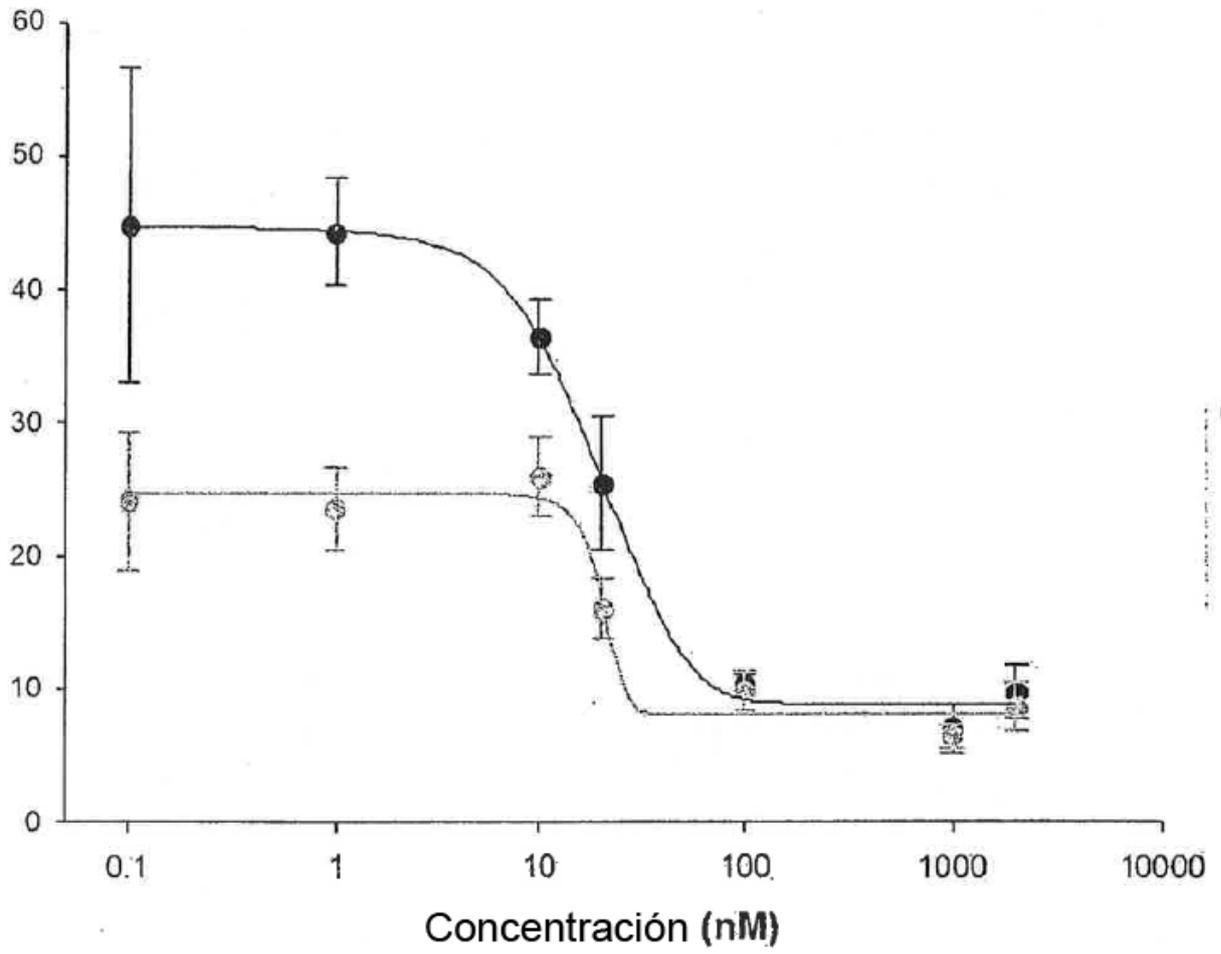


T0901317 (1 μ M)
+ compuesto 1 (500 nM)



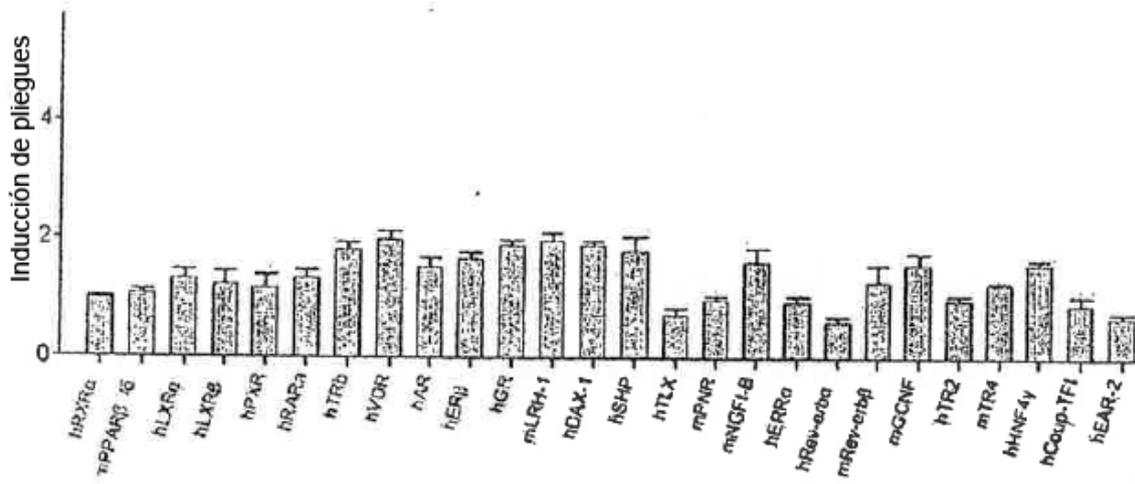
T0901317 (1 μ M)
+ compuesto 1 (1 μ M)

[FIG. 10]

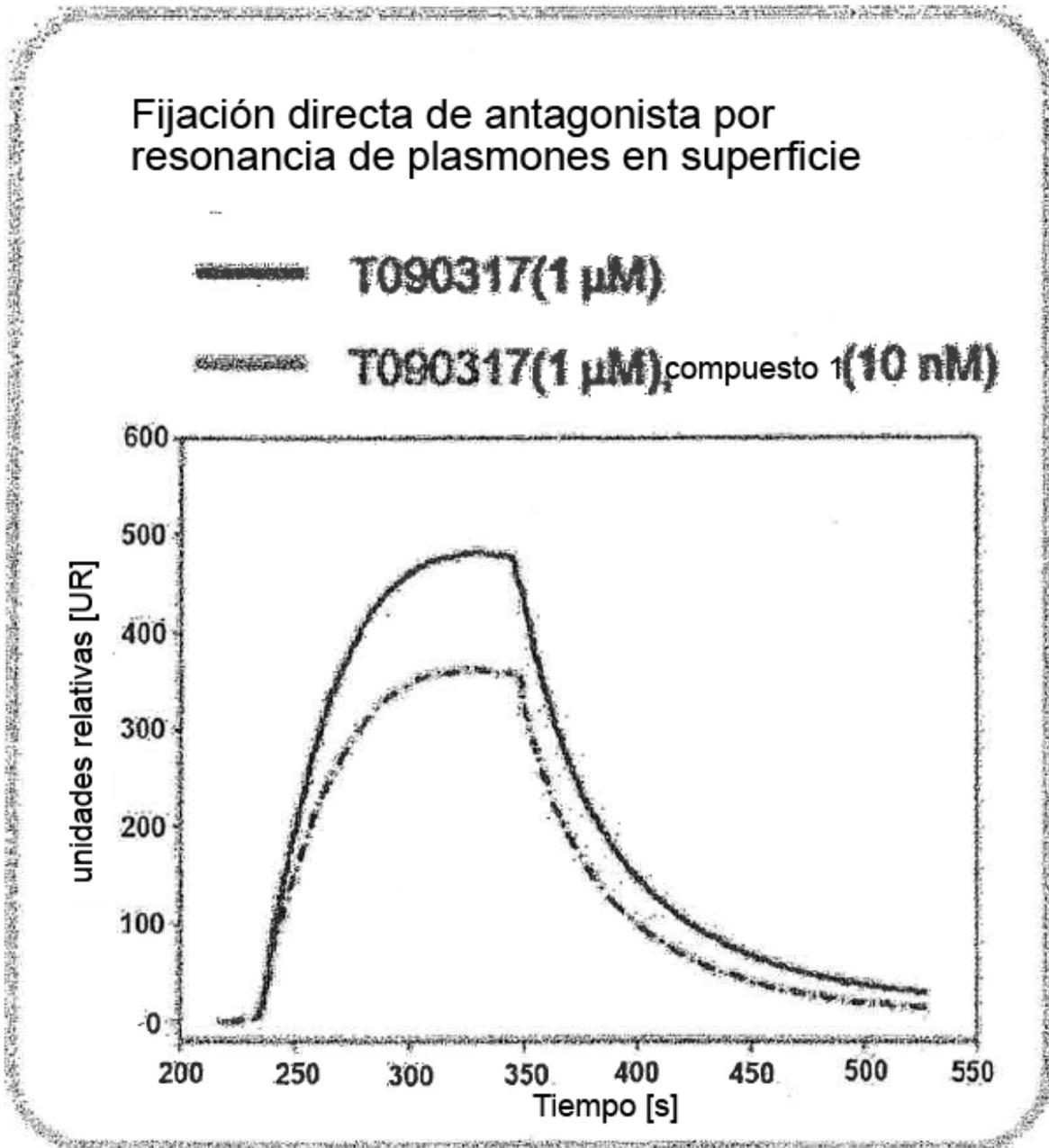


[FIG. 11]

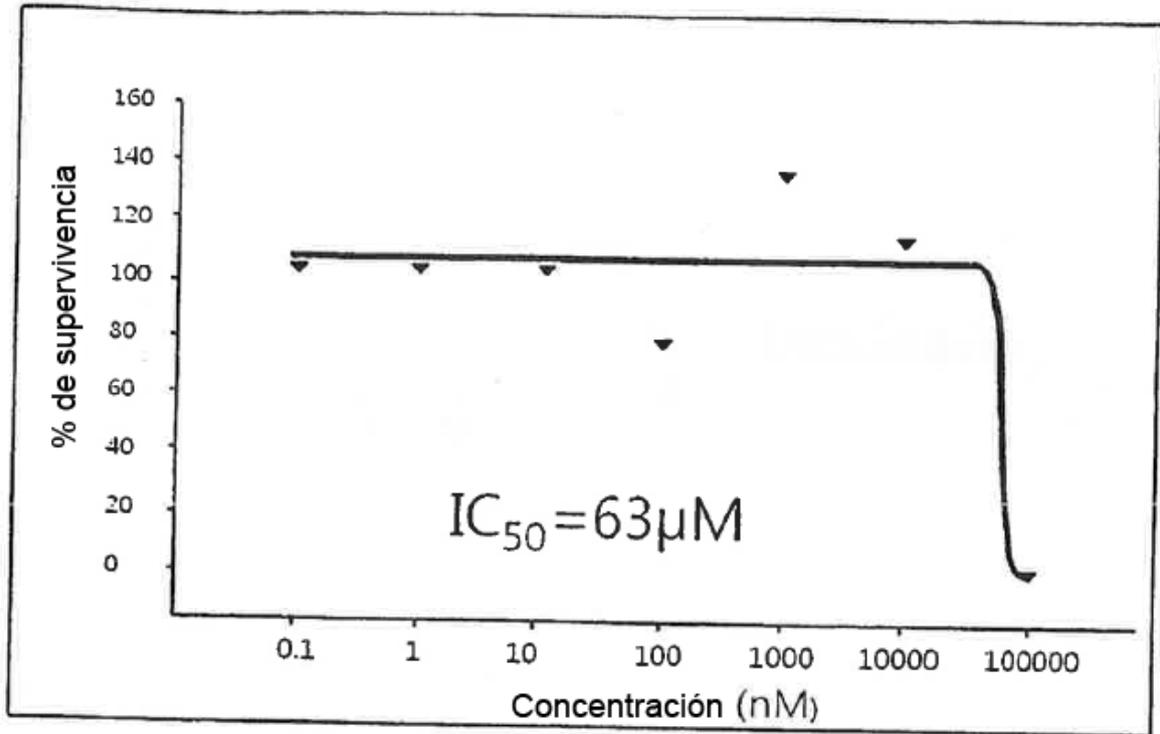
[



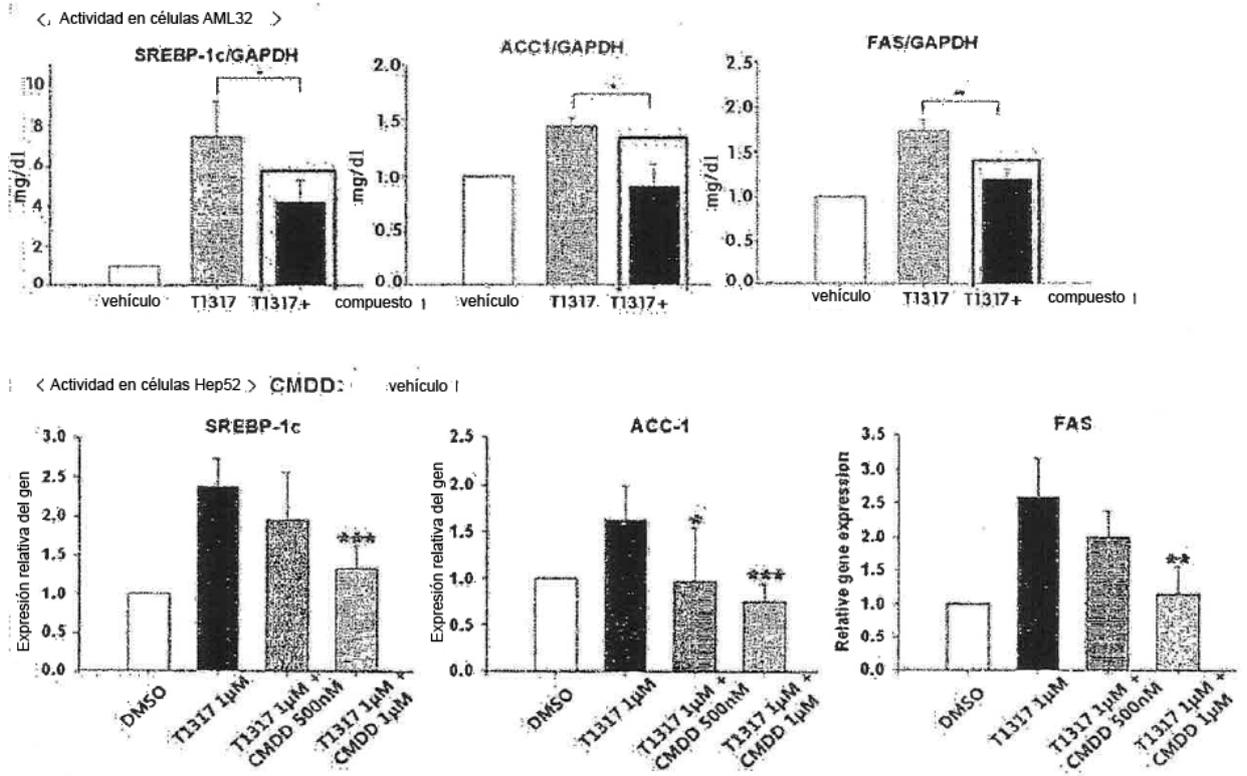
[FIG. 12]



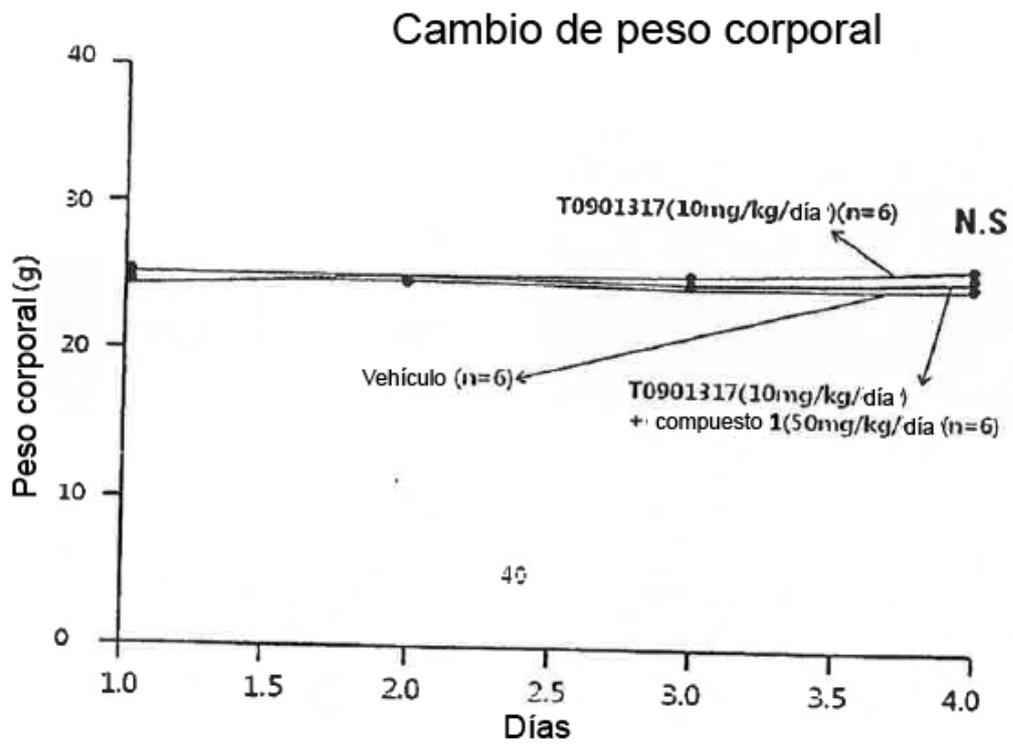
[FIG.13]



[FIG. 14]

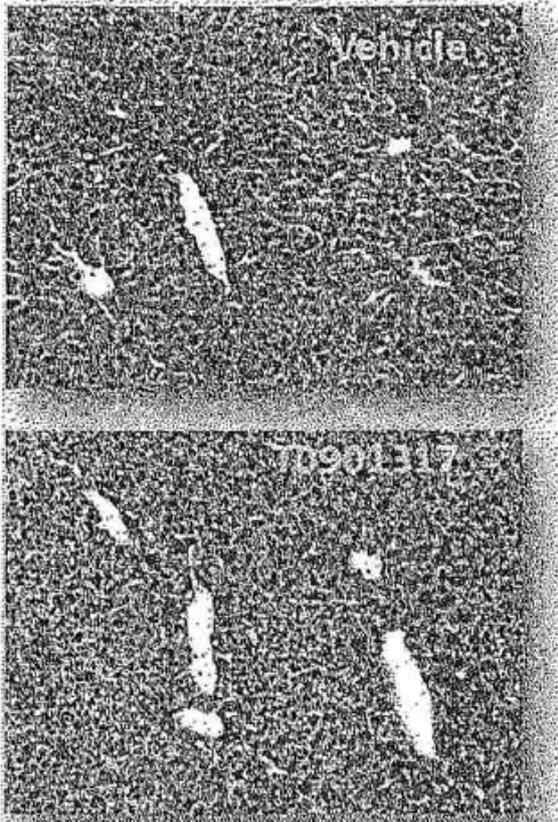


[FIF 15]

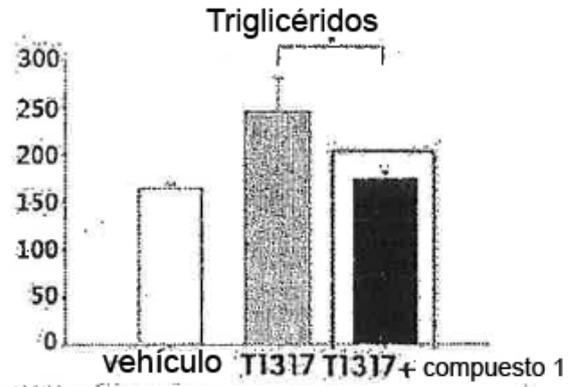


[FIG. 16]

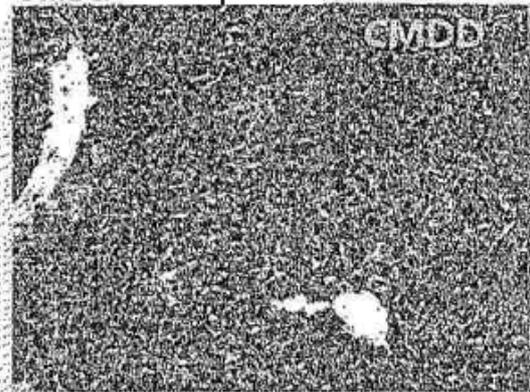
Tinción del hígado con Aceite - rojo - O



Triglicéridos en suero



CMDD: compuesto 1



[FIG. 17]

