

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 767**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06797258 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 1921086**

54 Título: **Agente antitumoral**

30 Prioridad:

02.09.2005 JP 2005255517

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

12.05.2014

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
2-9, KANDA-TSUKASAMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**YAZAWA, SHIN;
NISHIMURA, TOUYOU y
NAKAGAWA, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 459 767 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

Agente antitumoral

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un fármaco que contiene un compuesto de azúcar-colesterol como principio activo.

10 Técnica anterior

Un compuesto de azúcar-colesterol, en el que GlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc-, o Gal- se une a colesterol que tiene un doble enlace carbono-carbono saturado en el anillo B del colesterol, exhibe una excelente actividad antitumoral (véanse los Documentos de patente 1, 2 y 3).

15 La mayoría de estos compuestos de azúcar-colesterol que consisten en al menos dos restos de cadena de azúcar exhiben actividades antitumorales. No obstante, estos compuestos requieren un proceso complicado para la síntesis y un coste de producción mayor a medida que el número de restos de cadenas de azúcar aumenta. Al mismo tiempo, hasta la fecha se ha notificado un compuesto de azúcar-colesterol que tiene galactosa como un solo resto de azúcar, pero su actividad todavía sigue siendo insatisfactoria. Adicionalmente, estos compuestos de azúcar-colesterol comparten el mismo problema en cuanto a que generalmente son insolubles en agua.

25 Por tanto, ha habido una demanda creciente de un nuevo compuesto de azúcar-colesterol que tenga un número pequeño de restos de cadena de azúcar corta, exhiba bastante actividad anticancerosa y sea excelente en cuanto a su solubilidad.

Un compuesto de colesterol que tiene N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) como resto de cadena de azúcar es un compuesto conocido (véase el Documento no patente 1), pero todavía no se ha realizado ningún informe sobre su bioactividad.

30 [Documento de patente 1] JP-A-11 - 60592
 [Documento de patente 2] JP-A-2000 - 191685
 [Documento de Patente 3] WO 2005/007172 panfleto
 [Documento no patente 1] Estudios sobre esteroides. Parte CXXXXV. Síntesis de colesterol y colestanos conjugados. (1979), 27 (8), 1926 - 31.

Divulgación de la invención**40 Problemas que ha de resolver la invención**

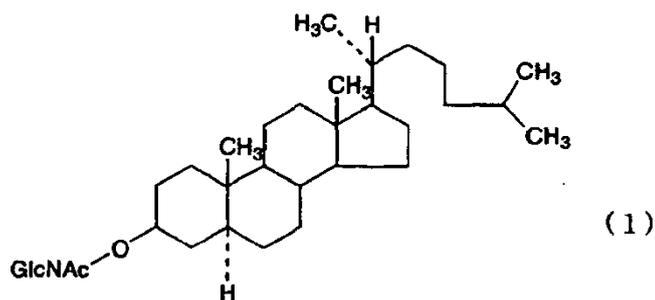
Un objeto de la invención es proporcionar un compuesto de azúcar-colesterol que se puede sintetizar fácilmente y que exhibe una actividad antitumoral satisfactoria.

45 Medios para resolver los problemas

En un azúcar-colesterol, no se reconoce actividad antitumoral sobre su resto de cadena de azúcar o resto de colesterol, de modo que la totalidad de la estructura del azúcar-colesterol es esencial para la expresión de actividad antitumoral. Pero ha sido extremadamente difícil deducir el número o el tipo de restos de cadena de azúcar de la estructura correlacionada. En una circunstancia de este tipo, los presentes inventores han hallado que un compuesto de colesterol representado por la fórmula descrita más adelante (1), que tiene GlcNAc como único resto de azúcar, exhibe una fuerte actividad inhibidora contra el crecimiento de las células cancerosas. Los presentes inventores también han hallado que el compuesto de colesterol, cuando está en forma de un complejo de inclusión de ciclodextrina o una preparación liposómica, puede superar el inconveniente atribuible a la insolubilidad y que este compuesto es mucho más eficaz con respecto a la actividad mencionada anteriormente.

55 De acuerdo con esto, la presente invención proporciona:

1) Un compuesto de colesterol representado por la siguiente Fórmula (1):



o un complejo de inclusión con ciclodextrina que contiene el compuesto para uso como agente anticanceroso.

- 2) Una formulación liposómica que contiene el compuesto de colestanol.
- 3) Un complejo de inclusión de ciclodextrina que contiene el compuesto de colestanol.
- 4) Uso del compuesto de colestanol o un complejo de inclusión con ciclodextrina que contiene el compuesto para producir un agente anticanceroso.

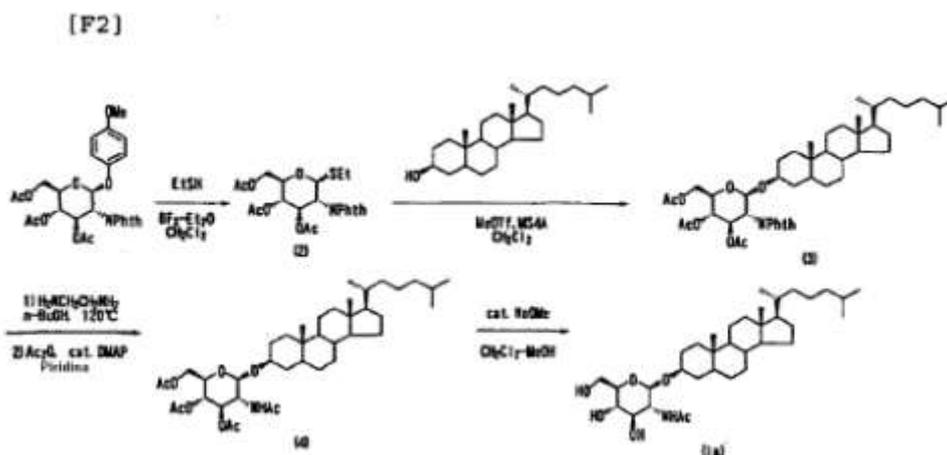
También se describe un procedimiento para prevenir o tratar el cáncer, caracterizado por que comprende la administración del compuesto de colestanol o un complejo de inclusión de ciclodextrina que contiene el compuesto.

Efectos de la invención

El compuesto de colestanol usado en la presente invención exhibe excelentes efectos antitumorales y se puede sintetizar fácilmente en comparación con el caso de un compuesto de azúcar-colestanol convencional. Por tanto, el compuesto de colestanol es útil como fármaco para prevenir o tratar el cáncer. Un complejo de inclusión de ciclodextrina o formulación liposómica que contiene el compuesto de colestanol exhibe una solubilidad excelente y es considerablemente eficaz en cuanto a que el compuesto exhibe actividad anticancerosa.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El compuesto de colestanol usado en la presente invención, que es un compuesto conocido (véase el Documento no patente 1), se puede producir mediante, por ejemplo, el procedimiento siguiente.



Específicamente, el compuesto de colestanol usado en la presente invención se puede producir a partir de 4-metoxifenil-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido mediante cuatro etapas (véase el Ejemplo de Producción descrito más adelante).

El resto de cadena de azúcar del compuesto de colestanol es, preferentemente, GlcNAcβ-. Por tanto, el compuesto de colestanol usado en la presente invención es, preferentemente, 5-α-colestan-3β-il-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (1a).

El compuesto de colestanol usado en la presente invención se puede incluir fácilmente en un compuesto de ciclodextrina o in derivado del mismo para formar un complejo. La ciclodextrina no está necesariamente adaptada a todos los compuestos insolubles, ya que, de forma concebible, la formación de un complejo de inclusión de ciclodextrina se ve afectada por el tamaño de una molécula invitada que se va a incluir, la interacción de van der Waals entre la molécula invitada y la ciclodextrina o los puentes de hidrógeno entre la molécula invitada y los grupos hidroxilo de la ciclodextrina. No obstante, la ciclodextrina puede formar un buen complejo de inclusión con el

compuesto de colestanol usado en la presente invención.

Ejemplos de la ciclodextrina empleada para formar el complejo de inclusión de ciclodextrina de la presente invención incluyen complejos de ciclodextrina tal como α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina; y derivados de ciclodextrina tales como metil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, monoacetil- β -ciclodextrina y 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina. De estos, se prefiere la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina para obtener una mejor solubilidad.

El complejo de inclusión de ciclodextrina se puede preparar mediante, por ejemplo, el procedimiento siguiente. una solución acuosa adecuada (p. ej, de 20 a 40%) de un compuesto de ciclodextrina o un derivado de la misma y el compuesto de colestanol usado en la presente invención se añade a la solución acuosa, seguida de agitación de la mezcla resultante.

No se impone ninguna limitación concreta sobre la cantidad del compuesto de colestanol a añadir, de modo que el compuesto de colestanol puede formar un complejo de inclusión con ciclodextrina. Generalmente, la cantidad es de 1 a 50% en masa, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30% en masa.

El complejo de inclusión con ciclodextrina formado de este modo es fácilmente soluble en agua y, por tanto, exhibe sus efectos con eficacia *in vivo*. El complejo de inclusión con ciclodextrina también es ventajoso en cuanto a que se puede evaluar con fiabilidad en un sistema de ensayo *in vitro*.

Una formulación liposómica preparada a partir del compuesto de colestanol usado en la presente invención se puede liberar con eficacia en un sitio en el que se van a mostrar los efectos del compuesto. La formulación liposómica también se puede evaluar con fiabilidad en un sistema de ensayo *in vitro*.

La formulación liposómica contiene, preferentemente, el compuesto de colestanol, un componente de membrana y una amina alifática o aromática.

La cantidad del compuesto de colestanol contenido en la formulación liposómica es de 0,3 a 2,0 moles, preferentemente de 0,8 a 1,5 mol, en base a 1 mol del componente de la membrana,

Ejemplos del componente de la membrana incluyen fosfolípidos. Los fosfolípidos que se usan preferentemente incluyen fosfolípidos de origen natural y sintéticos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidilmetanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, mezclas de estos fosfolípidos y fosfolípidos procesados de origen natural, tales como lecitina acuosa. Más preferentemente, se usa 1 α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que es un compuesto de fosfatidilcolina.

La amina alifática o aromática generalmente se añade para cargar positivamente la superficie de una membrana lipídica. Ejemplos de la amina a añadir incluyen aminas alifáticas tales como estearilamina y oleilamina, y aminas aromáticas tales como fluorenilamina. En particular, se usa preferentemente, estearilamina.

La cantidad de la amina contenida en la formulación liposómica es de 0,04 a 0,15 mol, preferentemente de 0,1 a 0,15 mol, en base a 1 mol del componente de la membrana (fosfolípidos),

En caso necesario, la formulación liposómica puede contener, además de los componentes mencionados anteriormente, un estabilizante de la estructura de la membrana, tal como colesterol, un ácido graso o diacetilfosfato.

La solución acuosa usada para dispersar el componente de la membrana es, preferentemente, agua, solución salina, un tampón, una solución acuosa de un azúcar o una mezcla de los mismos. El tampón que se va a usar es, preferentemente, un tampón orgánica o inorgánica que tiene una acción tampón en las proximidades de la concentración de iones de hidrógeno de fluidos corporales. Por ejemplo, se puede usar un tampón fosfato.

No reimpone ninguna limitación concreta al procedimiento para preparar la formulación liposómica y la formulación se puede preparar mediante un procedimiento habitual empleado. Por ejemplo, la formulación liposómica se puede preparar mediante el método descrito en los documentos JP-A-57 - 82310, JP-A-60 - 12127, JP-A-60 - 58915, JP-A-1 - 117824, JP-A-1 - 167218, JP-A-4 - 29925, o JP-A-9 - 87168, el método descrito en *Methods of Biochemical Analysis* (1988) 33, p 337, o el método descrito en "Liposome" (Nankodo).

Después, se describirá un procedimiento para preparar una formulación liposómica del compuesto de colestanol usado en la presente invención.

En primer lugar se añaden un disolvente orgánico y agua y se mezclan con el compuesto de colestanol, cualquiera de los componentes de membrana mencionados en lo que antecede y una amina alifática o aromática, y, después, el disolvente orgánico se elimina completamente por medio de un evaporador rotatorio o un aparato similar, seguido de la eliminación de agua.

Las proporciones de mezclado entre el componente de membrana, la alquilamina y el compuesto de colestanol pueden ser, por ejemplo, 52: 8 : 20 (por mol). No obstante, siempre que las proporciones de mezclado no se desvíen significativamente de estas no se producirán problemas concretos. Cuando la proporción de mezclado del compuesto de colestanol es baja se puede añadir, si es necesario, un estabilizante de la estructura de la membrana, tal como colesterol. No obstante, cuando la proporción de mezclado del compuesto de colestanol es alta, la adición de dicho estabilizante de la estructura de la membrana no es necesaria.

No se impone ninguna limitación concreta sobre el disolvente orgánico que se a usar, siempre que sea un disolvente orgánico volátil que sea insoluble en agua. Ejemplos del disolvente orgánico que se pueden usar incluyen cloroformo, clorometano, benceno y hexano. Considerando la solubilidad, adecuadamente se puede añadir un disolvente orgánico que tenga una polaridad relativamente alta (p. ej., etanol o metanol) a dicho disolvente insoluble en agua y se puede usar la mezcla de disolvente orgánico preparada de este modo. No se impone ninguna limitación concreta sobre las proporciones de mezclado de la mezcla de disolventes orgánicos y agua, siempre que se obtenga una mezcla uniforme de disolventes.

En el caso en el que se añade agua para la preparación de la formulación liposómica, la eliminación de agua generalmente se lleva a cabo mediante liofilización. Sin embargo, la eliminación de agua no necesariamente se realiza mediante liofilización y se puede efectuar mediante desecación en un desecador de presión reducida. Después de la eliminación de agua, se añade la solución acuosa mencionada anteriormente para la dispersión, seguido de agitación por medio de, por ejemplo, un mezclador de tipo vórtex, para formar de este modo la formulación liposómica.

Los liposomas que tienen un tamaño de partícula uniforme se pueden preparar mediante, por ejemplo, tratamiento ultrasónico, tratamiento por extrusión por medio de un filtro de membrana poroso, tratamiento por medio de un emulsionante de inyección a presión alta o una combinación de dichos tratamientos. Las partículas de liposoma más pequeñas se pueden preparar mediante, por ejemplo, tratamiento ultrasónico durante un periodo de tiempo prolongado. El tamaño de partícula de los liposomas es, preferentemente, de 40 nm a 300 nm.

El compuesto de colestanol usado en la presente invención se puede usar en forma, además de la formulación liposómica mencionada anteriormente, de diversos estabilizantes y la forma del estabilizante varía en respuesta a una forma de dosificación que se va a usar.

Como se describe más adelante en los ejemplos, el compuesto de colestanol usado en la presente invención, un complejo de inclusión de ciclodextrina que contiene el compuesto de colestanol y una formulación liposómica que contiene el compuesto de colestanol (en lo sucesivo en la presente invención se pueden denominar de forma conjunta "el compuesto de colestanol etc.") exhiben un efecto inhibidor de la proliferación celular más fuerte en comparación con el caso de un compuesto de colestanol que tiene un resto de cadena de azúcar formado por GlcNAc-Gal- o Gal-. Por tanto, una formulación que contiene como principio activo el compuesto de colestanol es útil como fármaco para prevenir o tratar el cáncer.

La forma de dosificación del agente anticanceroso usado en la presente invención se puede determinar adecuadamente en consideración del lugar de tratamiento o el propósito terapéutico. Siempre que no se use un aditivo que impida la estabilidad de la forma de la formulación liposómica, el agente anticanceroso puede estar en cualquier forma de dosificación de, por ejemplo, un producto peroral, una inyección, un supositorio, una pomada, y un parche, cada uno de los cuales se puede producir mediante un método de formulación convencional conocido por los expertos en la técnica.

Un producto sólido peroral (p. ej., un comprimido, un comprimido recubierto, un gránulo, un polvo o una cápsula) se puede preparar añadiendo al compuesto de colestanol etc. un excipiente y, si es necesario, un aditivo tal como un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un agente colorante, un agente aromatizante o un desodorante, seguido por el procesamiento habitual. El aditivo que se va a usar puede ser un aditivo que se use habitualmente en la técnica. Ejemplos del excipiente incluyen lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa microcristalina y ácido silícico. Ejemplos del aglutinante incluyen agua, etanol, propanol, jarabe simple, glucosa líquida, almidón líquido, gelatina líquida, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilalmidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato cálcico y polivinilpirrolidona. Ejemplos del agente disgregante incluyen almidón seco, alginato sódico, agar en polvo, hidrógenocarbonato sódico, carbonato cálcico, laurilsulfato sódico, estearato de monoglicérido y lactosa. Ejemplos del lubricante incluyen talco purificado, sales de ácido esteárico, bórax y polietilenglicol. Ejemplos del agente aromatizante incluyen sacarosa, pieles de naranja, ácido cítrico y ácido tartárico.

Un producto líquido peroral (p. ej., una solución peroral, un jarabe o un elixir) se puede preparar añadiendo al compuesto de colestanol etc. un agente aromatizante, un tampón, un estabilizante, un desodorante o similares, seguido por el procesamiento habitual. El agente aromatizante que se va a usar para esta preparación puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente. Ejemplos de los tampones incluyen citrato sódico. Ejemplos del estabilizante incluyen tragacanto, goma arábiga y gelatina.

Una inyección (p. ej., una inyección subcutánea, una inyección intramuscular o una inyección intravenosa) se puede preparar añadiendo al compuesto de colestanol etc. un agente de ajuste del pH, un tampón, un estabilizante, un agente isotonzante, un agente anestésico local o similares, seguido por el procesamiento habitual. Ejemplos del agente de ajuste del pH y el tampón usados para esta preparación incluyen citrato sódico, acetato sódico y fosfato sódico. Ejemplos del estabilizante incluyen piro-sulfito sódico, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico. Ejemplos del agente anestésico local incluyen procaína clorhidrato y lidocaína clorhidrato. Ejemplos del agente isotonzante incluyen cloruro sódico y glucosa.

Un supositorio se puede preparar añadiendo al compuesto de colestanol etc. un vehículo para la preparación de fármacos conocido en la técnica, tal como polietilenglicol, lanolina, manteca de cacao o triglicérido de ácidos grasos y, en caso necesario, un tensioactivo tal como Tween (marca registrada), seguido del procesamiento habitual.

Una pomada se prepara mezclando mediante una técnica habitual el compuesto de colestanol etc. con, en caso necesario, un aditivo usado generalmente, tal como una base, un estabilizante, un humectante o un conservante. Ejemplos de la base incluyen parafina líquida, vaselina blanca, cera de abeja blanca, alcohol octildodecílico y parafina. Ejemplos del conservante incluyen metil-p-hidroxibenzoato, etil-p-hidroxibenzoato y propil-p-hidroxibenzoato.

Un parche se puede preparar aplicando en un soporte de uso habitual la pomada mencionada anteriormente y una crema, un gel, una pasta o similares. Ejemplos de soportes adecuados incluyen telas tejidas y no tejidas fabricadas con algodón, fibra discontinua y fibra química, y películas y láminas de espuma formadas por cloruro de vinilo blando, polietileno y poliuretano.

La dosis del compuesto de colestanol etc. varía en función de los síntomas, el peso corporal, la edad, el sexo etc. de un paciente que lo necesite. La dosis diaria del compuesto de colestanol etc. para un adulto típicamente es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 mg/kg, preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, como se reduce para el compuesto de colestanol (1). Preferentemente, la dosis diaria se administra una vez al día o de forma dividida (de 2 a 4 veces al día).

La presente invención se describirá a continuación con detalle mediante Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo de producción 1 Producción de GlcNAc-colestanol

(1) Producción de etil-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-1-tio-β-D-glucopiranosido

En una atmósfera de argón, una solución de 4-metoxifenil-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (2 g, 4,19 mmol) y etanotiol (0,40 ml, 5,45 mmol) en cloruro de metileno seco (30 ml) se enfrió en hielo y, gota a gota, a la solución se añadió trifluoruro de boro-éter dietílico (3,19 ml, 25,14 mmol) seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla de reacción resultante se añadió una solución saturada acuosa de hidrógenocarbonato sódico con enfriamiento con hielo y la capa orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida y el residuo se recristalizó en hexano-acetato de etilo, dando de este modo 1,62 g del compuesto del título.

Forma: polvo blanco;

RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 1,22 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,86 (3H, s), 2,04 (3H, s), 2,11 (3H, s), 2,61 - 2,76 (2H, m), 3,90 (1H, ddd, J = 2,4 Hz, 4,9 Hz, 10,3 Hz), 4,18 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 12,4 Hz), 4,31 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 12,4 Hz), 4,39 (1H, dd, J = 10,3 Hz, 10,3 Hz), 5,18 (1H, dd, J = 9,2 Hz, 10,3 Hz), 5,49 (1H, d, J = 10,3 Hz), 5,83 (1H, dd, J = 9,2 Hz, 10,3 Hz), 7,74 (2H, dd, J = 2,4 Hz, 5,4 Hz), 7,86 (2H, dd, J = 2,4 Hz, 5,4 Hz).

(2) Producción de 5-α-colestan-3β-il-2-desoxi-2-ftalimido-3,4,6-tri-O-acetil-β-D-glucopiranosido (compuesto (3))

En una atmósfera de argón, a una mezcla del compuesto (2) obtenida en (1) anterior (400 mg, 0,834 mmol), 5-α-colestan-3β-ol (389 mg, 1,0 mmol) y tamices moleculares activados de (1,88 g) se añadió cloruro de etileno seco (4,6 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante una hora. Después, a la mezcla resultante se añadió trifluorometanosulfonato de metilo (0,28 ml, 2,48 mmol), seguido de agitación durante la noche. A la mezcla de reacción resultante se añadió trietilamina (1 ml), seguido por agitación durante 30 minutos. Después, la mezcla resultante se sometió a filtración en celite y el filtrado se lavó con cloruro de metileno. El disolvente se eliminó mediante evaporación de una mezcla del filtrado y el líquido de lavado, y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 3 : 1 (en volumen), lo mismo se aplicará en lo sucesivo en el presente documento), para dar 510 mg del compuesto del título.

Forma: polvo blanco;

RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 0,51 - 2,10 (55H, m), 3,48 - 3,56 (1H, m), 3,85 (1H, ddd, J = 2,4 Hz, 4,9 Hz, 10,3 Hz), 4,15 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 12,2 Hz), 4,26 - 4,34 (3H, m), 5,15 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 10,0 Hz), 5,46 (1H, d, J = 8,4 Hz), 5,77 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 10,8 Hz), 7,74 (2H, dd, J = 2,4 Hz, 5,4 Hz), 7,86 (2H, dd, J = 2,4 Hz, 5,4 Hz)

5 (3) Producción de 5- α -colestano-3 β -il-2-acetamido-2-desoxi-3,4,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosido (compuesto (4))

A una suspensión del compuesto (3) obtenido en (2) anteriormente (510 mg, 0,633 mmol) en 1-butanol (5,0 ml) se añadió etilendiamina (5,0 ml) y la mezcla resultante se agitó a 120 °C durante la noche. El disolvente se eliminó de la mezcla de reacción a través de evaporación a presión reducida y el residuo se mezcló con piridina (5 ml), anhídrido acético (5 ml) y 4-dimetilaminopiridina (cantidad catalítica), seguido de agitación durante la noche. El disolvente se eliminó de la mezcla de reacción mediante evaporación a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La solución resultante se lavó con una solución 1M de ácido clorhídrico acuoso, una solución acuosa saturada de hidrógenocarbonato sódico y una solución salina acuosa saturada y, después, la capa orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico. El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (hexano: acetato de etilo = 1 : 4), para dar 250 mg del compuesto del título.

Forma: polvo blanco;

20 RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 0,55 - 2,07 (58H, m), 3,52 - 3,72 (3H, m), 4,10 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 11,3 Hz), 4,26 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 12,2 Hz), 4,86 (1H, d, J = 8,4 Hz), 5,03 (1H, dd, J = 9,7 Hz, 9,7 Hz), 5,35 - 5,43 (2H, m)

(4) Producción de 5- α -colestano-3 β -il-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (compuesto (1a))

25 A una solución del compuesto (4) obtenido en (3) anteriormente (250 mg, 0,348 mmol) en una mezcla de metanol (5,0 ml) y cloruro de metileno (5,0 ml) se añadió una solución de metanol metóxido sódico al 28% (0,07 ml, 0,363 mmol), seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción resultante se neutralizó con Amberlyst 15 y, después, la mezcla de reacción se sometió a filtración. El disolvente se eliminó del filtrado mediante evaporación a presión reducida y el residuo se suspendió en metanol. Las materias insolubles obtenidas mediante filtración se lavaron con metanol y después se secaron, dando 159 mg del compuesto del título.

Forma: polvo blanco;

35 RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6+D_{20}$) δ : 0,62 - 1,94 (49H, m), 2,99 - 3,05 (2H, m), 3,22 - 3,50 (4H, m), 3,66 (1H, d, J = 11,6 Hz), 4,40 (1H, d, J = 7,6 Hz), 7,64 (1H, d, J = 8,4 Hz).

Ejemplo 1 Producción de formulación liposómica y formación de complejos de inclusión de ciclodextrina

40 Como material de partida se usó una solución de 20 $\mu\text{mol/ml}$ de cada uno de GlcNAc-colestano (compuesto (1a)) y colestano (disuelto en cloroformo/metanol = 5/1 (v/v)).

(1) Preparación de la formulación liposómica

45 1 α -Dipalmitoilfosfatidilcolina, estearilamina y azúcar-colestano se mezclaron en proporciones de 52/8/20 (por mol) para alcanzar una cantidad total de 700 μl y, después, se añadieron un disolvente orgánico (cloroformo/metanol = 2/1 (V/V)) (300 μl) y agua destilada (1 ml) y se mezclaron con la mezcla resultante. Después, el disolvente orgánico se eliminó completamente por medio de un evaporador rotatorio y el producto resultante se sometió a liofilización para eliminar de este modo completamente el agua. El producto liofilizado se disolvió en PBS (1 ml), seguido de tratamiento ultrasónico (15 W, 15 minutos), para formar de este modo liposomas que tengan un tamaño de partícula uniforme de aproximadamente 40 a aproximadamente 300 nm. Los liposomas formados de este modo se usaron en el Ejemplo 2.

(2) Preparación de complejos de inclusión de ciclodextrina

55 Se preparó una solución acuosa al 20% de hidroxipropil- β -ciclodextrina y a la solución se añadió GlcNAc-colestano, seguido de agitación/mezclado para formar de este modo un complejo de inclusión de ciclodextrina con GlcNAc-colestano. La formación de un buen complejo de inclusión se confirma observando que GlcNAc-colestano (es decir, un compuesto insoluble) se solubiliza mediante agitación.

60 **Ejemplo 2 Efecto inhibitorio de la proliferación celular de GlcNAc-colestano**

65 Se inoculó una línea celular de cáncer cultivada (HT-29 (humana)) en una placa de 96 pocillos (1×10^4 células/100 μl /pocillo) y, después, la formulación liposómica que contiene el compuesto GlcNAc-colestano o el complejo de inclusión de ciclodextrina preparado en el Ejemplo 1 se añadió a la placa de 96 pocillos, seguido de incubación a 37°C durante tres días. Después, se realizó el ensayo MTT y se determinó el número de células. El porcentaje de proliferación celular se obtuvo mediante el uso de la fórmula descrita más adelante. Los resultados se muestran en

la tabla 1.

Como resultado, el complejo GlcNAC-colestanol exhibió un fuerte efecto inhibidor de la proliferación celular.

5 [E1]

Porcentaje de inhibición de la proliferación celular (porcentaje CPI) (%)= (1-DO de las células tratadas/DO de las células no tratadas) x 100

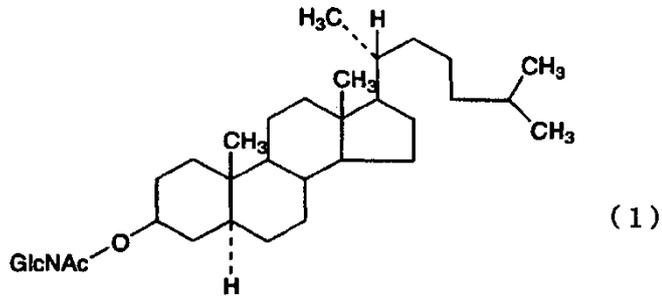
10 La DO de las células tratadas y la DO de las células no tratadas se midieron a 450 nm y 650 nm, respectivamente (de acuerdo con el ensayo MTT).

[Tabla 1]

Efecto inhibidor de la proliferación celular de azúcar-colestanol		
Azúcar-colestanol ¹	Forma	CPI50 (µM) ²
GlcNacGalChol	Formulación liposómica	10,2
GlcNacChol	Formulación liposómica	10,4
GalChol	Formulación liposómica	12,7
Chol	Formulación liposómica	354,3
GlcNacGalChol	Complejo de inclusión con ciclodextrina	15,9
GlcNacChol	Complejo de inclusión con ciclodextrina	8,8
GalChol	Complejo de inclusión con ciclodextrina	37,4
Chol	Complejo de inclusión con ciclodextrina	> 1000
1) GlcNacGalChol: GlcNacβ1, 3Galβ-colestanol GlcNacChol: GlcNacβ-colestanol GalChol: Galβ-colestanol Chol: colestanol 2) Concentración necesaria para alcanzar una CPI del 50%		

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de colestanol representado por la siguiente Fórmula (1):



5

un complejo de inclusión con ciclodextrina que contiene el compuesto para uso como agente anticanceroso.

10

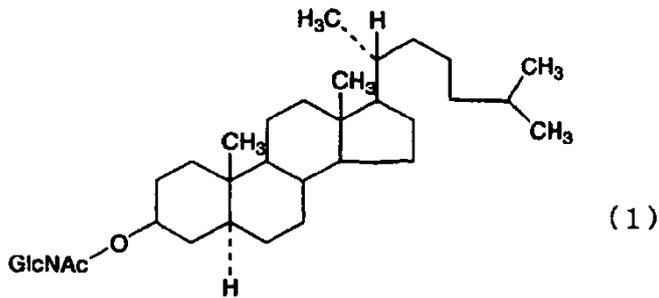
2. Una formulación liposómica que contiene un compuesto de colestanol como se describe en la reivindicación 1.

3. Un complejo de inclusión de ciclodextrina que contiene un compuesto de colestanol como se describe en la reivindicación 1.

15

4. Un complejo de inclusión de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la ciclodextrina es 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina.

5. Uso de un compuesto de colestanol representado por la siguiente Fórmula (1):



20

o un complejo de inclusión con ciclodextrina que contiene el compuesto para producir un agente anticanceroso.