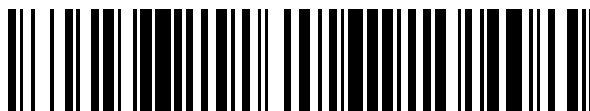


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 268**

51 Int. Cl.:

**C07C 49/255** (2006.01)

**C07C 45/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2003** **E 03773364 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013** **EP 1572614**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**

30 Prioridad:

**28.11.2002 BR 0207141**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2014**

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO  
ESTADO DE SÃO PAULO (100.0%)  
1500, Pio XI Street, Alto da Lapa Ward  
05468-901 São Paulo, BR**

72 Inventor/es:

**SUAREZ, JOSÉ AGUSTIN QUINCOCES;  
PESEKE, KLAUS;  
KORDIAN, MARCUS;  
CARVALHO, JOAO ERNESTO;  
KOHN, LUCIANA KONECNY;  
ANTONIO, MÁRCIA APARECIDA y  
BRUNHARI, HELOIZA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 464 268 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

Procedimiento para la preparación de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

5 La presente patente de invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona con actividad antitumoral.

Referencias bibliográficas sobre el compuesto 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona y sus derivados, y sobre su procedimiento de preparación.

10 El compuesto denominado 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona se conoce desde el año 1927, desde que E. Glaser y E. Tramer documentaron por primera vez su síntesis con un rendimiento del 60% (Journal für praktische Chemie, 116, 331-346, 1927) a partir de vainillina y acetona en presencia de ácido clorhídrico concentrado, utilizado como catalizador.

15 Además, P. Ramanan y M. Rao sintetizaron este producto en 1989 (Indian Journal Pharm. Sci., 51, 207, 1989) a partir de 4-O-metoximetilvainillina y acetona en un medio alcalino, obteniendo un rendimiento del 42% después de su purificación mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice).

20 En 1997, un grupo integrado por S. Sardjiman *et al.* (Eur. Journal Med. Chem., 32, 625-630, 1997) desarrolló una nueva variante de síntesis con cantidades equimoleculares de vainillina y acetona en presencia de ácido clorhídrico concentrado, y documentaron un rendimiento bruto del 89% (sin purificación). Por esta razón, el punto de fusión que se indicó en este procedimiento fue 58°C inferior al indicado por Glaser y Tramer.

25 M. Artico *et al.* también obtuvieron esta sustancia al cabo de un año (Journal Med. Chem. 41, 3948-3960, 1998), con un rendimiento muy bajo de sólo el 18%. La temperatura de fusión (114-116°C) es menor que la indicada por Glaser y Tramer, lo que hace pensar que el compuesto obtenido no era puro a pesar de la aplicación de cromatografía de columna.

30 Además, en la revisión bibliográfica podemos encontrar el artículo de la patente US (patente US nº 4.521.629, del 4 de junio de 1985), de N. Cortese *et al.*, titulado: "Method for the preparation of 1,5-bis-aryl-1,4-pentadien-3-ones". Dicha invención da a conocer un procedimiento para la preparación de determinadas bis-arilpentadienonas fluoradas, que se utilizan como compuestos intermedios para la preparación de amidinohidrazonas sustituidas insecticidas, pero no protege los productos que aparecen en la presente solicitud de patente.

35 Además, se han encontrado los siguientes documentos de otras patentes relacionadas con esta familia de compuestos orgánicos:

40 1- "Hair tonics containing bis(hydroxyphenyl)pentadienones". Autores de la patente: Morita, Kazuyoshi; Hamada, Kazuto. Empresa: Kanebo, Ltd, Japón. País: Japón. Kokai Tokyo Koho, 7 p. Lengua: japonés. Número de solicitud CA: 134: 183278. PI: JP 2001048756, A2 20010220 JP 1999-224982 19990809.

45 2- "Skin-lightening cosmetics containing distyryl ketones". Autor: Morita, Kazuyoshi. Empresa: Kanebo, Ltd., Japón. País: Japón. Kokai Tokyo Koho, 7 p. Lengua: japonés. Número de solicitud CA: 131:149078. PI: JP 11209235 A2 19990803 JP 1998-10414 19980122.

50 3- "Acidic plating baths and methods for electrodepositing bright and ductile zinc-nickel alloys and additive composition for these baths". Empresa: McGean-Rohco, Inc., USA. Autor: Canaris, Valerie M. País: USA., 8 p. Lengua: inglés. Número de solicitud CA: 111:183131. PI: US 4832802 A 19890523 US 1988-206017 19880610 EP 346161 A1 19891213 EP 1989-305925 19890612.

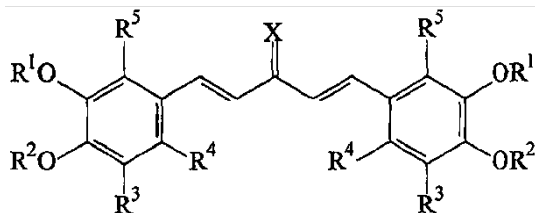
55 4- "Photopolymerizable compositions". Empresa: Eastman Kodak Co., USA. Autores: Noonan, John M.; McConkey, Robert C.; Arcesi, J.A.; Rauner; Frederick J. País: Gran Bretaña, 19 p. Lengua: inglés. PI: GB 1425476 A 19760218 GB 1973-3986 19730322 US 3748133 A 19730724 US 1972-237929 19720324.

Ninguna de estas cuatro patentes se refiere directa ni indirectamente a las propiedades antiproliferativas mostradas por la 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona y sus derivados.

60 La presente patente de invención da a conocer las propiedades antitumorales de la 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona y sus derivados, y un procedimiento para su preparación.

65 La muestra denominada compuesto 37/01 se obtuvo con un rendimiento y una pureza elevados mediante la técnica de ultrasonidos, y presentaba actividad citostática (inhibición del crecimiento) en las concentraciones evaluadas y actividad citotóxica (muerte celular) a partir de una concentración de 0,25 µg/ml frente a nueve tipos diferentes de cánceres humanos. Dicho compuesto tiene una LD<sub>50</sub> igual a 8,54 g/kg. Esto significa que este producto se puede considerar prácticamente no tóxico. La doxorubicina, un fármaco anticarcinógeno que se utiliza como referencia en

todos estos ensayos, es un producto extremadamente tóxico (LD<sub>50</sub> de 20 mg/kg) y que no inhibe el crecimiento de la línea celular NCI-ADR de cáncer de mama (la que expresa el fenotipo de resistencia frente a diversos fármacos), por lo que el producto de los presentes inventores presentaba una fuerte actividad citostática.



- 5  
 37 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 EHB1 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H<sub>3</sub>CCO; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 10 HB6 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HBM1 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HB5 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=C(CN)<sub>2</sub>  
 HB10 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HB11 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=C(CN)CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
 15 HB12 : R<sup>1</sup>=H; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=H; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HB13 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=Br; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HB14 : R<sup>1</sup>=CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>3</sup>=Br; R<sup>4</sup>=H; R<sup>5</sup>=H; X=O  
 HB15 : R<sup>1</sup>=H; R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>4</sup>=CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; R<sup>5</sup>=H; X=O

20 Actividad antitumoral mostrada por los compuestos sintetizados.

Leyenda: NCI460 (tumor pulmonar); UACC62 (melanoma); MCF7 (tumor de mama normal); NCI ADR (tumor de mama que expresa resistencia fenotípica a diversos fármacos); HT29 (tumor de colon); 786-O (tumor renal); OVCAR-3 (tumor de ovario); PC-3 (tumor de próstata); K-562 (leucemia); ED<sub>50</sub> (dosis efectiva en el 50, expresada en microgramos por mililitro, µg/ml).

25

Compuesto	ED <sub>50</sub> determinada en líneas celulares humanas (µg/ml)								
	UACC-62	MC-7	NCI-ADR	786-O	NCI-460	K-562	PC-03	OVCAR-03	HT29
37	0,03	0,04	0,27	0,65	0,5	0,6	0,41	0,72	0,75
EHB1	1,77	0,45	1,28	0,27	0,7	0,58	0,39	0,57	0,61
HB6	14,16	8,43	3,34	3,64	15,8	2,22	27,99	14	1,87
HBM1	0,75	0,71	0,84	1,19	0,66	0,65	0,82	0,82	0,86
HB5	1,25	1,96	1,11	2,67	2,58	2,84	1,59	43	1,26

Observaciones:

30 Todos estos resultados pueden considerarse excelentes tomando como referencia los publicados en la bibliografía:

Banskota A.H. *et al.*, Chemical Constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities; J. Nat. Prod. 61, 896-900, 1998.

35 Banskota A.H. *et al.*, Two Novel Cytotoxic Benzofuran Derivatives from Brazilian propolis; J. Nat. Prod. 63, 1277-1279, 2000.

40 Kimoto T. *et al.*, Apoptosis and Suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian Propolis; Cancer Detect. Prev. 22(6), 505-15, 1998.

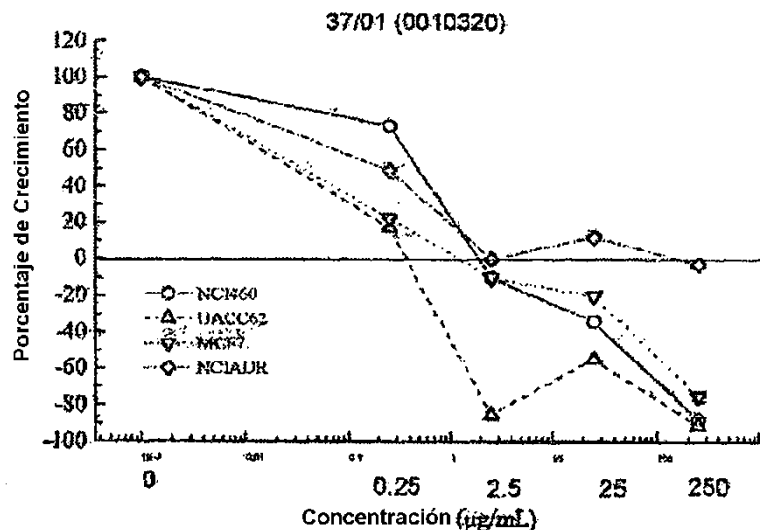
Se observa que la mayoría de los productos de los presentes inventores presentaban una fuerte acción antiproliferativa en intervalos de concentración (en ppm) muy inferiores a los mostrados por algunos de los compuestos aislados de los propóleos brasileños.

45 Citotoxicidad de algunos compuestos aislados de propóleos brasileños por Banskota y Kimoto.

Nombre del compuesto	HT-1080	Colon L5-26
1 ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcroman-6-propenoico	71,53	77,07
2 ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiranbenzopiren-6-il-2-propenoico	46,86	50,22
3 ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico	45,47	59,32
4 ácido 4-dihidrocinaoiloxi-3-prenilcinámico	25,94	77,90

Debe apreciarse que los productos obtenidos el equipo de los presentes inventores consisten en materias primas del proyecto de investigación de los presentes inventores, de las que estamos obteniendo nuevos derivados, guiados por el principio de analogía y los resultados de las predicciones por TOPS-MODE.

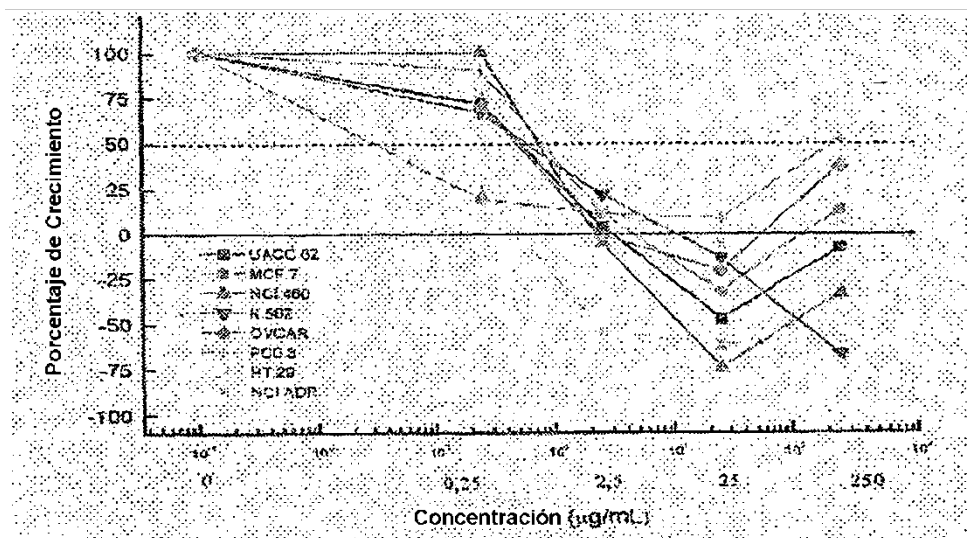
5 Curvas Respuesta a la concentración de los compuestos ensayados:



10 El compuesto 37, obtenido por medio de un procedimiento de síntesis orgánica, presentaba una actividad citostática (inhibición del crecimiento) para todas las líneas celulares y actividad citotóxica (muerte celular) para NCI460 (pulmón), UACC62 (melanoma) y MCF7 (mama) y NCI-ADR (mama resistente) a partir de 0,25 µg/ml, en los primeros ensayos antitumorales realizados en CPQBA, UNICAMP, 24 de septiembre de 2001.

15 Posteriormente, estos ensayos de actividad antiproliferativa se extendieron a las siguientes líneas celulares:

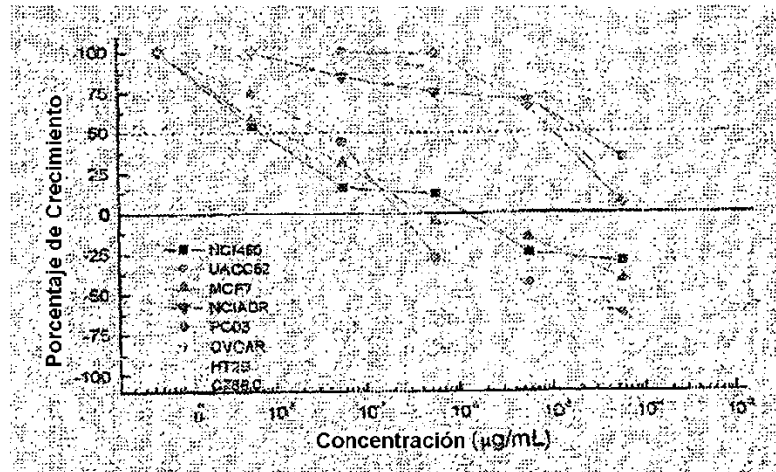
Colon; Renal; Ovario; Próstata; Leucemia.



20 Curva Respuesta a la concentración de 37.

Los resultados de este compuesto se compararon con los de la doxorubicina (anticarcinógeno comercial utilizado como patrón en estos ensayos), siendo muy parecidos y, en algunos casos, superiores a los de este anticarcinógeno comercial.

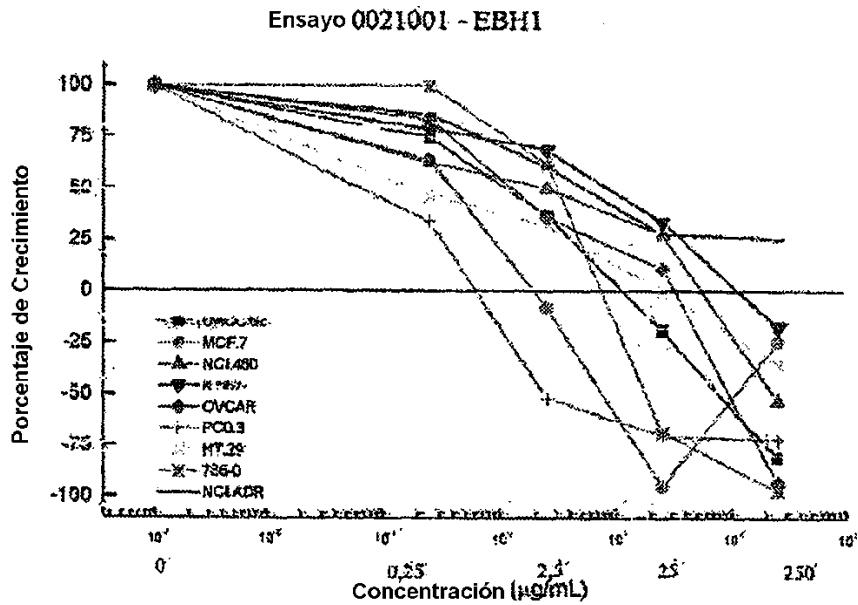
25



Curva Respuesta a la concentración de doxorubicina.

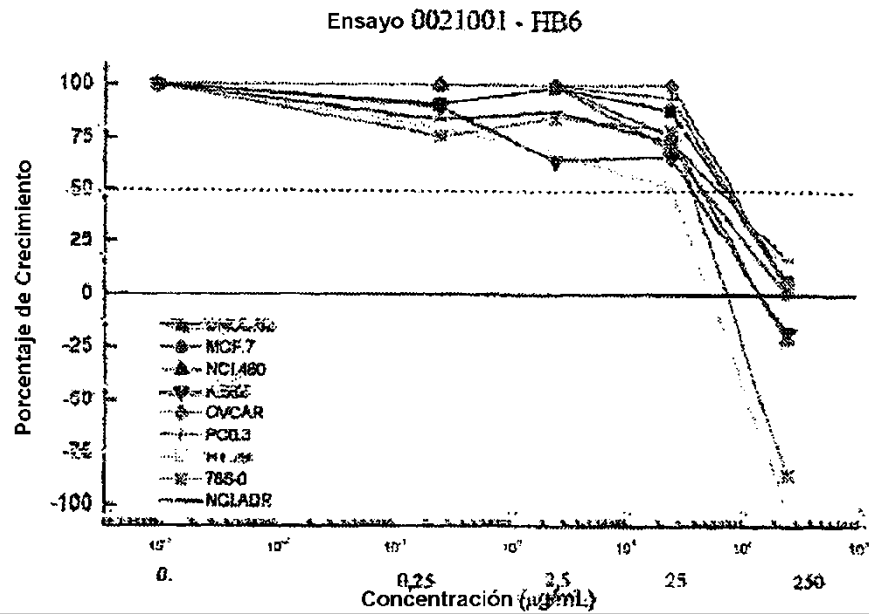
5 Por ejemplo, el producto de los presentes inventores inhibió el crecimiento de la línea celular NCI-ADR de cáncer de mama (el que presenta el fenotipo de resistencia frente a diversos fármacos). Este resultado tiene un gran interés, dado que la doxorubicina, utilizada como control positivo, no inhibió el crecimiento de esta línea celular humana.

10 Los derivados de la 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona mostraron la siguiente actividad antitumoral:

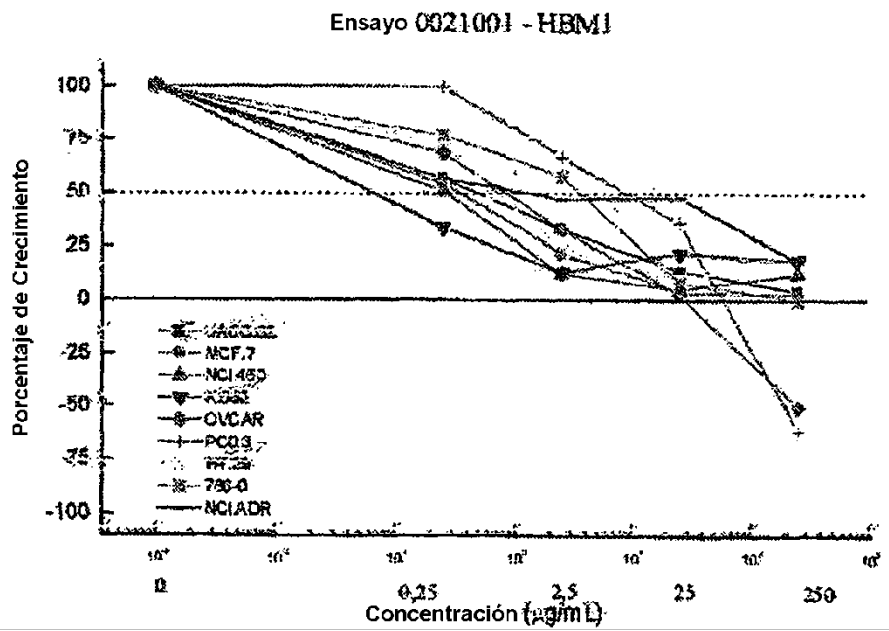


15 La muestra denominada compuesto EHB1 presentaba una actividad citostática para todas las líneas celulares a partir de una concentración de 0,25 µg/ml, y actividad citotóxica a partir de una concentración de 25 µg/ml, a excepción de la línea celular NCI-ADR, que presentó una inhibición del crecimiento de aproximadamente el 25%. Los resultados ponían de manifiesto que dicha muestra no era selectiva para las líneas celulares estudiadas.

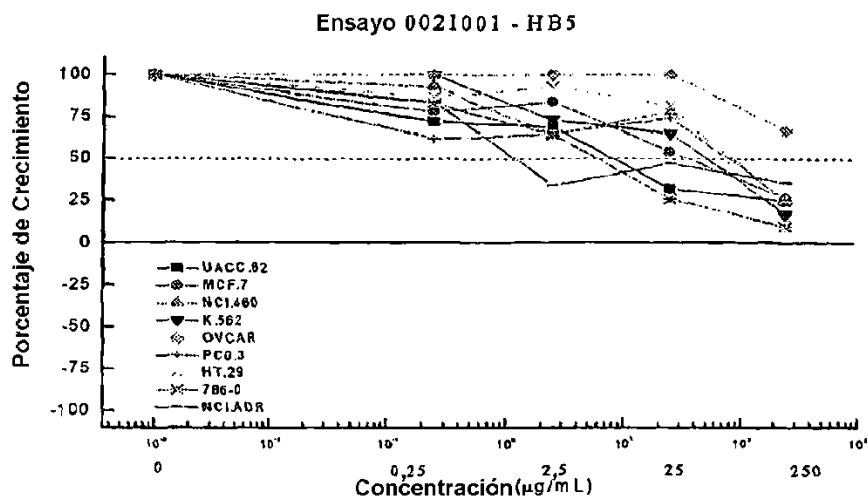
20 La muestra denominada compuesto HB6 presentaba actividad citostática para todas las líneas celulares a partir de una concentración de 25 µg/ml, y actividad citotóxica a partir de una concentración de 250 µg/ml, para las líneas celulares HT-29, 786-0, NCI-ADR y K562. Además, esta muestra presentaba selectividad celular para las líneas celulares HT-29 y 786-0.



5 La muestra denominada compuesto HBMI presentaba actividad citostática para todas las líneas celulares a partir de una concentración de 0,25 µg/ml, y sólo presentaba actividad citotóxica para las líneas celulares PC-03 y OVCAR-3 en una concentración de 250 µg/ml.



10 La muestra denominada compuesto HB5 presentaba una actividad citostática moderada para todas las líneas celulares a partir de una concentración de 0,25 µg/ml, y no presentaba actividad citotóxica para ninguna línea celular en las concentraciones aplicadas.



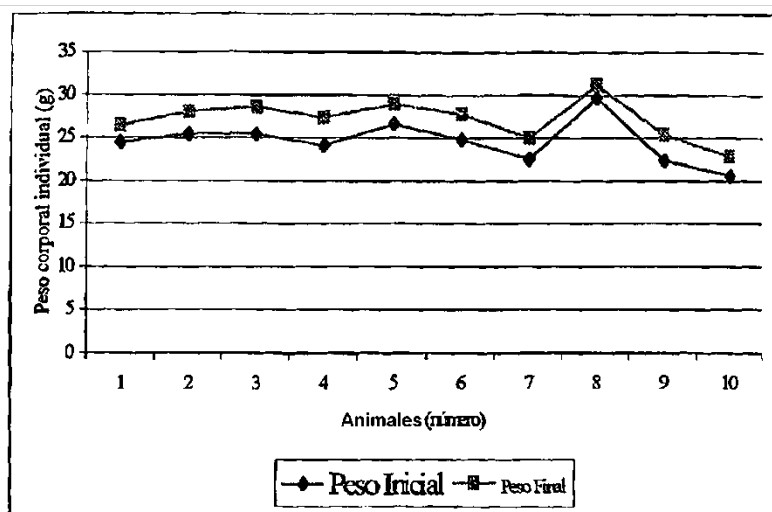
También se llevó a cabo un ensayo toxicológico con la muestra denominada compuesto 37 (toxicidad aguda, LD<sub>50</sub>, vía intraperitoneal). El valor de LD<sub>50</sub>, evaluado por regresión lineal, era igual a 8,54 g/kg tras 14 días de observación. Esto significa que dicho producto se puede considerar, de acuerdo con Loomis, en Principes of Toxicology, como prácticamente no tóxico (los compuestos con una LD<sub>50</sub> comprendida entre 5,0 g/kg y 15 g/kg se consideran prácticamente no tóxicos).

5

TABLA 1 - Peso corporal del animal que recibió 2,5 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado "COMPUESTO 37", administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

10

Animal	Peso inicial (g)	Volumen administrado (ml)	Peso final (g)	Muertes (n)
1	24,5	0,25	26,4	0
2	25,4	0,25	28,0	0
3	25,4	0,25	28,6	0
4	24,1	0,24	27,4	0
5	26,6	0,27	29,0	0
6	24,8	0,25	27,8	0
7	22,5	0,23	25,0	0
8	29,7	0,30	31,2	0
9	22,4	0,22	25,4	0
10	20,6	0,21	22,8	0
Promedio ± dpm:	24,60 ± 2,51	Promedio ± dpm:	27,88 ± 1,02	

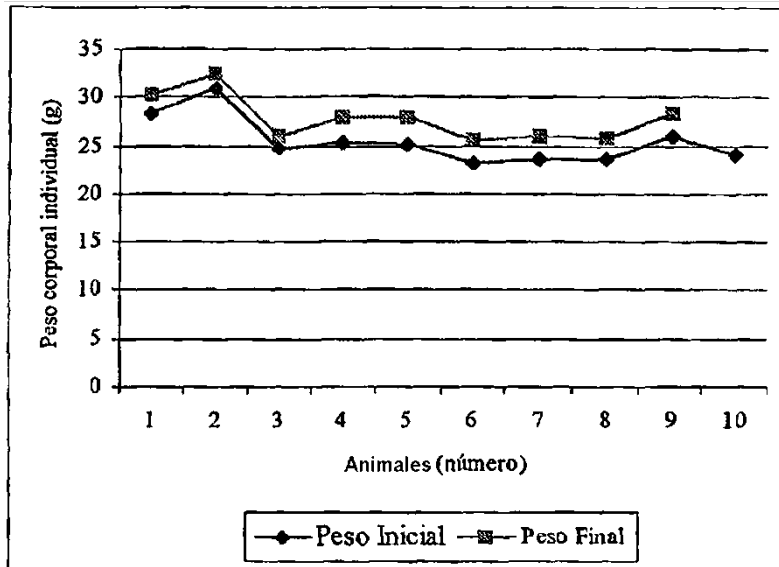


15 GRÁFICO 1 - Evolución del peso corporal del animal que recibió 2,5 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado "COMPUESTO 37", administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

TABLA 2 - Peso corporal del animal que recibió 3,0 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado

“COMPUESTO 37”, administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

Animal	Peso inicial (g)	Volumen administrado (ml)	Peso final (g)	Muertes (n)
1	28,3	0,28	30,3	0
2	30,9	0,31	32,5	0
3	24,6	0,25	25,9	0
4	25,4	0,25	28,0	0
5	25,1	0,25	27,9	0
6	23,2	0,23	25,6	0
7	23,6	0,24	26,0	0
8	23,6	0,24	25,8	0
9	26,0	0,26	28,3	0
10	24,0	0,24	Muerte	1
Promedio ± dpm:	25,47 ± 2,43	Promedio ± dpm:	27,81 ± 2,35	

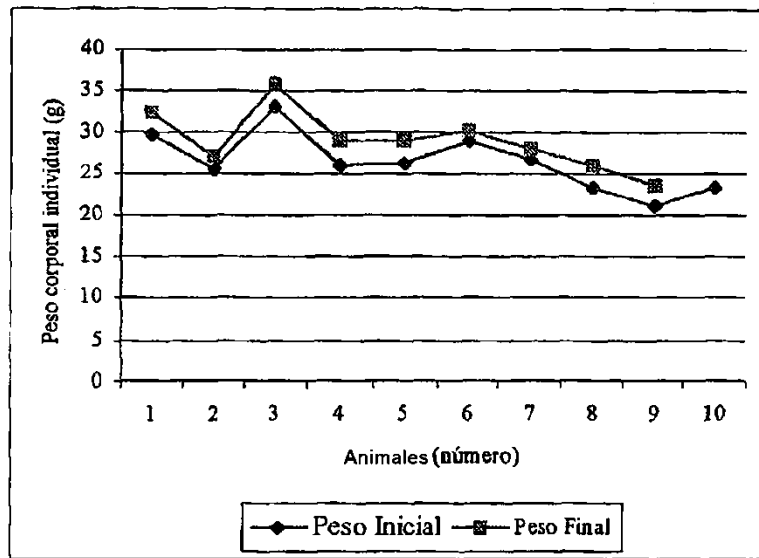


5 GRÁFICO 2 - Evolución del peso corporal del animal que recibió 3,0 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado “COMPUESTO 37”, administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

10 TABLA 3 - Peso corporal del animal que recibió 4,0 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado “COMPUESTO 37”, administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

Animal	Peso inicial (g)	Volumen administrado (ml)	Peso final (g)	Muertes (n)
1	29,8	0,30	32,5	0
2	25,5	0,26	26,9	0
3	33,2	0,33	35,9	0
4	25,9	0,26	28,9	0
5	26,3	0,26	29,0	0
6	28,9	0,29	30,2	0
7	26,7	0,27	28,0	0
8	23,3	0,23	25,9	0
9	21,2	0,21	23,5	0
10	23,3	0,23	Muerte	1
Promedio ± dpm:	26,41 ± 3,52	Promedio ± dpm:	28,98 ± 3,65	





5 GRÁFICO 3 - Evolución del peso corporal del animal que recibió 4,0 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado "COMPUESTO 37", administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

TABLA 4 - Peso corporal del animal que recibió 5,0 g/kg de peso corporal del animal del producto denominado "COMPUESTO 37", administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

Animal	Peso inicial (g)	Volumen administrado (ml)	Peso final (g)	Muertes (n)
1	24,9	0,25	25,9	0
2	21,0	0,21	24,0	0
3	25,4	0,25	27,8	0
4	22,2	0,22	25,6	0
5	24,0	0,24	27,0	0
6	23,8	0,24	25,8	0
7	22,5	0,23	24,9	0
8	23,5	0,24	25,9	0
9	24,2	0,24	Muerte	1
10	25,3	0,25	Muerte	1
Promedio ± dpm:	23,68 ± 1,42	Promedio ± dpm:	25,86 ± 1,17	

10

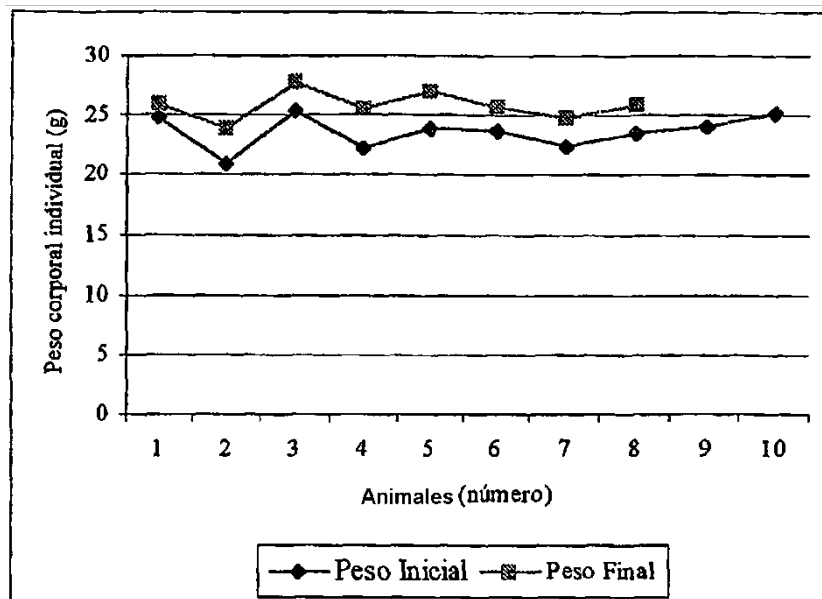


GRÁFICO 4 - Evolución del peso corporal del animal que recibió 5,0 g/kg de peso corporal del animal del producto

denominado "COMPUESTO 37", administrado por vía intraperitoneal, al principio y al final del ensayo de toxicidad aguda.

A continuación, la presente invención se ilustra mediante los ejemplos de realización siguientes:

5

### **Ejemplo 1.**

Preparación de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona. (Método 1)

10 A partir de vainillina y acetona en una relación molar de 2:1 en un medio ácido, a una temperatura que varía entre 25°C y 60°C, en condiciones de irradiación ultrasónica en un intervalo comprendido entre 25 kHz y 40 kHz durante un período de 1 a 3 horas, colocando adicionalmente la mezcla reaccionada en agua/hielo hasta la obtención del producto bruto, que se disuelve en una solución de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio (entre 10-30%) y se filtra; el filtrado se trata con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico en una concentración del 10-30%, el producto obtenido se filtra de nuevo y finalmente se lava con agua destilada hasta obtener un pH neutro, repitiéndose esta operación hasta la purificación total del producto, no siendo necesario llevar a cabo ninguna nueva purificación del compuesto mediante otros procedimientos, tales como recristalización o columna cromatográfica (la pureza se determinó mediante la técnica de HPLC):

15 Se obtiene un 92% de rendimiento del producto puro. Punto de fusión: 155-156°C.

Método de preparación 2 (no según la presente invención)

25 Una mezcla formada con vainillina y acetona en una relación molar de 2:1 en medio ácido, dejada reposar durante 5-8 días, a una temperatura que varía entre -10°C y 40°C, colocando adicionalmente la mezcla reaccionada en agua/hielo hasta la obtención del producto bruto, que se disuelve en una solución de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio (entre 10-30%) y se filtra; el filtrado se trata con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico en una concentración del 10-30%, el producto obtenido se filtra de nuevo y finalmente se lava con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Esta operación se repite hasta la purificación total del producto, no siendo necesario llevar a cabo ninguna nueva purificación del compuesto mediante otros procedimientos, tales como recristalización o columna cromatográfica (la pureza se determinó mediante la técnica de HPLC):

30 Se obtiene un 89% de rendimiento del producto puro, con un punto de fusión de 155-156°C.

### **Ejemplo 2. (No según la presente invención)**

Preparación de 1,5-bis(3-metoxi-4-acetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

40 Se agita con un exceso de anhídrido acético y acetato de sodio. Se calienta en un intervalo de temperatura comprendido entre 20°C y 110°C durante un período comprendido entre 30 minutos y 3 horas. El producto obtenido se coloca en agua destilada con hielo. El producto precipitado se recristaliza con etanol caliente. Rendimiento: 58%. Punto de fusión: 150°C.

### **Ejemplo 3. (No según la presente invención)**

Preparación de 1,5-bis[3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

50 Una mezcla formada por 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (2 mmol) en 10 ml de dimetilformamida y carbonato de potasio (6 mmol) se agita en un intervalo de temperatura de 20-50°C durante un período comprendido entre 20 y 60 minutos en atmósfera inerte (argón o nitrógeno). A continuación, se añaden 3 mmol de bromuro de 3-metil-but-2-enilo con agitación constante. La agitación se mantiene durante otro período de 5-8 horas con flujo de gas inerte y se vierte todo el contenido de la mezcla en agua con hielo. Se extrae tres veces con cloroformo con aproximadamente 3 ml de dicho disolvente. La fase orgánica se lava con una solución de NaHSO<sub>4</sub> y a continuación con agua destilada. La fase de cloroformo se seca con sulfato de sodio anhidro y a continuación el disolvente se filtra y se rotaevapora. La purificación del producto se lleva a cabo en una columna cromatográfica rellena de gel de sílice y utilizando una mezcla formada por tolueno/acetato de etilo o n-hexano/acetato de etilo como disolventes de elución en una proporción adecuada. Rendimiento: 53% de la sustancia líquida aceitosa.

### **Ejemplo 4. (No según la presente invención)**

Preparación de 1,5-bis(3,4-dimetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

Método 1

65 La mezcla de 3,4-dimetoxi-benzaldehído y acetona en condiciones de relación equimolecular en presencia de ácido

clorhídrico se sometió a baño ultrasónico con una frecuencia comprendida entre 25 kHz y 40 kHz durante un período de 10-60 minutos y en un intervalo de temperatura de 25-60°C. A continuación, el producto obtenido se coloca en agua destilada y hielo, se filtra el precipitado y éste se lava con agua destilada. La fase acuosa se extrae con cloroformo y la fase de cloroformo se lava con agua destilada y a continuación se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se rotaevapora. Rendimiento: 87%.

#### Método 2

Se agita 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona en un exceso de sulfato de dimetilo o yoduro de metilo en medio alcalino (KOH o NaOH) en un intervalo de temperatura de 25-50°C durante un período que varía entre 5 y 24 horas. La mezcla que se forma se coloca en agua fría, se filtra el precipitado obtenido y se neutraliza con HCl. A continuación, se lava con agua hasta pH neutro. No fue necesaria ninguna purificación posterior del producto. Rendimiento: 85%.

#### **Ejemplo 5. (No según la presente invención)**

##### Preparación de 1,5-bis(3,4-dimetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ilidenmalonitrilo

En una mezcla formada por 1,5-bis(3,4-dimetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona y malonitrilo en condiciones de relación equimolecular, se añaden acetato de amonio, ácido acético y tolueno siguiendo la variante de Cope, se calienta a reflujo por un período de 5-16 horas o siguiendo la tercera variante de Knoevenagel utilizando piperidina como catalizador. El producto obtenido se coloca en agua destilada y hielo, se filtra el precipitado y se extrae la fase acuosa con cloroformo y la fase de cloroformo se lava con agua destilada. A continuación, la fase de cloroformo se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se rotaevapora. Rendimiento: 76%. Punto de fusión: 216°C.

Metodología utilizada para llevar a cabo los ensayos antitumorales:

RESULTADOS DEL ENSAYO ANTIPROLIFERATIVO EN CÉLULAS HUMANAS TUMORALES CON EL ENSAYO DE SULFORRODAMINA B

#### Células

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos, que se describen en la tabla 1, se mantuvieron en recipientes de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc®) con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con un 5% de suero bovino fetal (RPMI/SFB), a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 100%.

TABLA 1. Linajes celulares utilizados en los ensayos de evaluación de la actividad antiproliferativa

Tipo celular	Código
Pulmón	NCI460
Mama	MCF-7
	NCI ADR*
Melanoma	UACC-62
Colon	HT 29
Renal	786-0
Ovario	OVCAR-3
Próstata	PC-3
Leucemia	K-562

\* línea celular que expresa el fenotipo de resistencia frente a diversos fármacos.

Todos los procedimientos descritos a continuación se llevaron a cabo en condiciones estériles (Laminar Flux Veco®, clase IIB2).

#### Procedimiento experimental

Se inocularon 100 ml de células en medio RPMI/SFB con 50 µg/ml de gentamicina, en sus respectivas densidades de inoculación, en placas de 96 pocillos, y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 100%.

Al cabo de 24 horas, se añadieron 100 ml de la sustancia de ensayo en concentraciones de 250; 25; 2,5; 0,2 µg/ml diluida en RPMI/SFB/gentamicina. En este momento se llevó a cabo la lectura de una placa para determinar el T0 (control celular en el momento de adición de las muestras). Las otras placas se incubaron durante 48 horas. Tras este período, el experimento se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético a fin de determinar el contenido de proteína por ensayo colorimétrico con sulforrodamina B.

Dilución de las muestras

Las soluciones almacenadas se desarrollaron diluyendo las muestras en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 0,1 g/ml. Estas soluciones se diluyeron 400 veces en RPMI/SFB/gentamicina para su incorporación a las placas de 96 pocillos, obteniéndose la concentración ideal de DMSO (Skehan y col., 1990).

Ensayo de sulforrodamina B (SRB)

Al final del ensayo, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 3 minutos a 2.000 rpm y se fijaron con 50 µl de una solución al 50% de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C. Para completar la fijación celular, las placas se incubaron durante 1 hora a 4°C.

Las placas se sometieron a cuatro lavados consecutivos con agua destilada a fin de eliminar los residuos de TCA, medio, SFB y metabolitos secundarios, y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su secado completo.

Se llevó a cabo una coloración mediante la adición de 50 µl de SRB al 0,4% (peso/volumen) diluido en ácido acético al 1%, y se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos. Además, se lavaron 4 veces consecutivas con una solución de ácido acético al 1%. El residuo del lavado de la solución se eliminó y las placas se secaron de nuevo a temperatura ambiente. El colorante unido a la proteína celular se diluyó con una solución de Trizma Base (Sigma®) en una concentración de 10 µM y un pH de 10,5 durante 5 minutos en baño ultrasónico. La lectura espectrofotométrica de la absorbancia se llevó a cabo a 560 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan® MCC/340).

Análisis de los resultados

Los promedios de absorbancia se evaluaron habiendo descontado sus valores nulos respectivos y, mediante la fórmula que se muestra a continuación, se determinó la inhibición del crecimiento (IC) de cada muestra sometida a ensayo.

- Si  $T > C$ , el fármaco no estimulaba el crecimiento, no presenta IG.
- Si  $T \geq T_0$  pero  $< C$ , el fármaco era citostático y la fórmula que se utiliza es  $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$
- Si  $T < T_0$ , el fármaco era citotóxico y la fórmula que se utiliza es  $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$

Teniendo en cuenta que T es el promedio de absorbancia de la célula tratada, C es el control celular y T0 es el control celular en el día de la adición.

El resultado obtenido se restó del 100%, obteniéndose el porcentaje de inhibición del crecimiento. Las muestras se consideraron activas, dado que presentaron una dosis dependiente de la inhibición del crecimiento mayor del 50% y linaje selectivo, es decir, la actividad preferencial por un único tipo de célula tumoral, o con efecto citostático y/o citotóxico bien distinguido entre las líneas celulares.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, de modo que los resultados presentados hacen referencia a un experimento representativo. La desviación estándar de la media fue siempre menor del 5%.

Metodología utilizada para llevar a cabo los ensayos toxicológicos:

Técnica

- \* Se utilizan 10 ratones suizos albinos, de sexo masculino, con un peso de aproximadamente 25 g, para cada uno de los grupos tratados y de control;
- \* Período de adaptación: los animales se mantienen en la sala de ensayo, por lo menos, durante 07 días antes del comienzo del ensayo;
- \* Los animales se someten a ayuno 12 horas antes de la administración de la sustancia de ensayo, que se lleva a cabo mediante una sonda, momento en el que se registra el peso corporal del animal.
- \* Tras la administración, los animales se mantienen en observación durante un período mínimo de 14 días.
- \* El número de animales muertos para cada una de las dosis se registra y la LD<sub>50</sub> se evalúa por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949), y se registra el peso corporal del animal al final del ensayo de toxicidad aguda.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la preparación de 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- 5
- a. poner en contacto vainillina y acetona en una relación molar de 2:1 bajo una irradiación ultrasónica de 25 a 40 kHz a una temperatura comprendida entre 25°C y 60°C durante de 1 a 3 horas;
- 10
- b. mezclar la mezcla de reacción en agua/hielo hasta obtener un producto bruto;
- c. disolver el producto bruto en una solución de hidróxido de sodio o potasio al 10-30%;
- d. filtrar;
- 15
- e. tratar el filtrado con una solución de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico al 10-30%;
- f. filtrar;
- 20
- g. lavar el filtrado sucesivamente con agua hasta que se alcanza un pH neutro; y
- h. repetir las etapas (e) a (g), hasta la purificación total del producto.