

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 331**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

C07J 75/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2012 E 12305518 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2662382**

54 Título: **Derivados de esteroles, método para preparar los mismos, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y uso de los mismos para el tratamiento de glioblastomas múltiples**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2016

73 Titular/es:

**BETA INNOV (100.0%)
49 rue Rouelle
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CLARION, LUDOVIC;
MERSEL, MARCEL y
PETITE, DIDIER**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 580 331 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

Derivados de esteroles, método para preparar los mismos, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos y uso de los mismos para el tratamiento de glioblastomas múltiples.

5

La invención se refiere a derivados de esteroles novedosos, el método de preparación de los mismos, las composiciones farmacéuticas que los contienen y uso de los mismos para tratar enfermedades que implican células astrocíticas transformadas en células cancerosas, y en particular para tratar glioblastoma multiforme.

10 La transformación celular corresponde a la transición de una célula eucariota normal a una célula inmortalizada y/o una célula eucariota cancerosa. Las expresiones "célula transformada" o "célula cancerosa" se usarán como sinónimos en lo sucesivo en el presente documento.

15 El glioblastoma multiforme (GBM), también conocido como astrocitoma de grado IV, es un tumor cerebral caracterizado por la transformación de células astrocíticas en células cancerosas.

A pesar de los importantes avances científicos y terapéuticos en el área de oncología, el GBM es todavía un cáncer incurable. En el mejor de los casos, los investigadores y los médicos están satisfechos cuando la vida media de los pacientes puede prolongarse en algunos meses, como máximo quince meses.

20

Uno de los problemas encontrados en el tratamiento del GBM es la recaída causada por las células madre. De hecho, incluso cuando las terapias existentes tuvieron éxito en la erradicación de la mayor parte del tumor, las células madre a menudo causan el desarrollo de un nuevo tumor (1,2).

25 Las terapias actuales siempre consisten en la resección del tumor, si su ubicación lo permite, seguido de radioterapia y/o quimioterapia según el caso. En quimioterapia, uno de los principales tratamientos es la biterapia, que consiste en administrar Avastina (inhibición de la unión de VEGF a sus receptores) e irinotecán (inhibidor de la topoisomerasa I). La triterapia del tipo PCV, que es una combinación de procarbazona (agente de alquilación de ADN), lomustina (CCNU; agente de alquilación no específico) y vincristina (inhibición de la polimerización de microtúbulos) es actualmente muy controvertida. La temozolomida, un agente de alquilación de guanina, junto con radioterapia, muestra un aumento de la supervivencia media, especialmente para pacientes con ADN hipometilado. Están en curso ensayos clínicos (fase III), pruebas con cilengitida (inhibición de algunos receptores de integrina) y talampanel (bloqueo de canales de glutamato del tipo AMPA).

35 Los estudios de inmunoterapia y los ensayos clínicos son de dos tipos:

- inmunoterapia adaptativa, en la que las células activadas in vitro se inyectan en el paciente, tales como células asesinas activadas por linfoquina (LAK; ensayos clínicos de fase II) o linfocitos T citotóxicos (CTL; ensayos clínicos de fase I) inyectados por vía intracraneal. En la actualidad, las observaciones muestran una supervivencia de 20

40

meses de una manera muy marginal.
- inmunoterapia activa, que consiste en el uso de vacunas (fase I) y células dendríticas (fase II). Esto no muestra una mejora significativa en la supervivencia del paciente. Estos ensayos se han interrumpido.

45 Las terapias genéticas, que consisten en el uso de adenovirus, retrovirus o virus del sarampión como vectores de moléculas con potencial contra el cáncer, muestran una mejora de la supervivencia de sólo 6 a 11 meses. La terapia celular que propone el uso de células madre neuronales como transportadores de productos médicos en GBM todavía está en la fase de demostración en la investigación básica.

50 Un procedimiento que ha estado algo desatendido en las últimas décadas, y que se prevé de nuevo, consiste en la acción a nivel de glucólisis y la fosforilación oxidativa. Las células cancerosas aumentan su consumo de glucosa ya que tienden a modificar su metabolismo hacia el metabolismo anaerobio, incluso si el suministro de oxígeno no es un factor limitante. Este fenómeno, observado por Warburg (3), se debe a la sobreexpresión de HIF (Factor inducido por hipoxia) y del pro-oncogén Myc. HIF aumenta la conversión de piruvato a lactato, de forma anaerobia, mediante la inactivación de piruvato deshidrogenasa, que es una enzima clave en la respiración aerobia. MYC estimula la

55

biosíntesis de glutamina, que está involucrada en la respiración anaerobia (4).
En este contexto, están en curso ensayos clínicos que actúan en el metabolismo energético. Se pueden mencionar, como ejemplos (4):

60 - metformina: inhibidor del complejo respiratorio mitocondrial I, que, a su vez, induce la AMPK, que ralentiza la

proliferación celular;
 - floretina: agente para la reducción de la importación de glucosa;
 - acetato de fenilo: agente para reducir el nivel de glutamina;
 - dicloroacetato: inhibidor de piruvato deshidrogenasa.

5 Todas estas moléculas, excepto dicloroacetato, están siendo ensayadas (ensayos clínicos en fase II) y las observaciones aún no se conocen en la actualidad.

10 Actualmente se ha descubierto que los derivados de esteroles que se dirigen a un aspecto específico del metabolismo energético de los astrocitos, el tipo de célula en el origen del GBM, podrían usarse para el tratamiento del glioblastoma multiforme.

15 El aspecto original de la invención consiste en el uso del metabolismo energético particular de la célula astrocítica (de origen glial), cuya transformación conduce en última instancia a la formación de GBM.

20 De hecho, la célula astrocítica usa al mismo tiempo el suministro de energía, en forma de ATP, a través de la fosforilación oxidativa (ciclo de Krebs acoplado al transporte de electrones en la mitocondria) y a través de la glucólisis: En esta última, el piruvato no entra en el ciclo de Krebs pero se reduce a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de tipo 5. Además del suministro de ATP, el astrocito usa la glucólisis, a través de la producción de lactato, para suministrar a la célula adyacente, la neurona, con un neurotransmisor (glutamato).

En la siguiente tabla, el metabolismo energético del astrocito, normal o canceroso, se compara esquemáticamente con el de otras células:

	Astrocitos		Otras células	
	Respiración mitocondrial	Glucólisis	Respiración mitocondrial	Glucólisis
Células normales	50 %	50 %	90 %	10 %
Células cancerosas	GBM 1 %	GBM 99 %	1 %	99 %

25 El metabolismo energético del astrocito es especial: de hecho, la respiración mitocondrial y la glucólisis funcionan conjuntamente.

30 Es esta dualidad metabólica específica de la célula astrocítica normal, concretamente, por un lado la respiración mitocondrial y, por un lado, la glucólisis, la que constituye la base para la estrategia de preparación de los derivados de esteroles de acuerdo con la invención.

35 De hecho, los inventores presentan la hipótesis de trabajo de acuerdo con la cual los derivados de esteroles, de acuerdo con la invención, pueden orientar el metabolismo energético de las células astrocíticas cancerosas de la glucólisis a la respiración mitocondrial, un proceso que conducirá a su muerte.

40 7β-Hidroxicolesterol (7β-OHCH), una molécula con alto potencial anticanceroso (5,6), muestra una citotoxicidad notable sobre líneas de astrocitos de rata inmortalizadas (transformadas espontáneamente) (7,8) y los GBM (línea C6 de rata) "in vitro" (9). Los estudios demuestran que la esterificación de 7β-OHCH en C3-OH por los ácidos grasos intracelulares (formación de 7β-OHCH-C3-éster) estaba muy implicada en el efecto tóxico del precursor, 7β-OHCH (7, 8, 10).

45 Sin embargo, el mecanismo de acción de 7β-OHCH, esterificado o no en C3-OH, en los GBM "in vitro" estaba lejos de explicarse. Recientemente, los estudios realizados en las líneas C6 han demostrado que 7β-OHCH modula la arquitectura y la dinámica de las balsas, microdominios en la membrana plasmática, los sitios de inicio de cierta mensajería celular, incluyendo la de la proteína cinasa Akt, una enzima clave en el metabolismo energético celular (11). De hecho, el oxisterol, mediante la interrupción de la arquitectura de las balsas, en consecuencia afectará a la actividad de Akt, particularmente durante la transformación de las células normales en células cancerosas: La Akt regula la captura de glucosa y la actividad de la glucólisis en estas células.

50 Sorprendentemente, se ha descubierto que los derivados de esteroles, de acuerdo con la invención, que tienen una estructura básica de 7beta-hidroxicolesterol que tiene sustituyentes en la posición 3 y grupos protectores en la posición 7, permitirán simultáneamente la inhibición de la glucólisis, esencial para el suministro de energía del

astrocito canceroso de alto grado y, al mismo tiempo, restaurarán la respiración mitocondrial, que también es "mortal" para esta célula.

De hecho, esta acción dual conduce al "sobrecalentamiento" de la célula cancerosa, que conduce a su muerte.

5

Por otra parte, se pudo demostrar que los derivados de esterol, también tienen actividad con respecto a las células madre, permitiendo de este modo la destrucción total de las células de glioblastoma.

Por lo tanto, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I)

10

(I)

en la que

- A representa

15 un grupo $-(R_1)_n$ en el que R_1 es un residuo aminoácido unido por su extremo C-terminal y $n = 1$ a través de 3, siendo cada R_1 idéntico o diferente, en el que el extremo N-terminal de dicho aminoácido puede estar sustituido con un grupo $-C(O)-R_2$ en el que R_2 es un grupo aralquilo C_6-C_{14} mono o policíclico; un grupo heteroaralquilo C_5-C_{14} mono o policíclico que puede comprender uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes; un grupo aralquilo C_6-C_{14} mono o policíclico o un grupo heteroaralquilo C_5-C_{14} mono o policíclico que puede comprender

20 uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes, un grupo $-C(O)-NH-R_3$ o $-C(S)-NH-R_3$ en el que R_3 es hidrógeno; un grupo alquilo C_1-C_{12} , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, donde R y R', independientemente, representan el hidrógeno, un alquilo lineal en C_1-C_{12} o un arilo sin sustituir; un grupo arilo, sin sustituir o sustituido por un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR como se ha definido anteriormente; un grupo acilo; un grupo fomilo; un grupo sulfinilo, un grupo sililo, sin sustituir o sustituido

25 por un grupo arilo sin sustituir o sustituido en C_6-C_{14} , sin sustituir o sustituido con al menos un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado; un grupo alilo; un residuo de azúcar; un grupo $-C(O)-OR_4$ en el que R_4 es un alquilo C_1-C_{12} , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido anteriormente; un grupo amida; un grupo tioamida; un grupo sulfonamida,

30 un grupo $-C(O)-R_5$ en el que R_5 es un heterocido C_5-C_{14} saturado que comprende 1 o 2 heteroátomos, sin sustituir o sustituido con al menos un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado o un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido anteriormente, donde R y R', independientemente, representan el hidrógeno, un alquilo en C_1-C_{12} o un arilo sin sustituir.

- B representa un grupo $-C(O)-R_6$ en el que R_6 es hidrógeno; un alquilo C_1-C_{12} , preferiblemente C_1-C_6 , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido

35 anteriormente; un grupo arilo, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR; o R_6 representa OR_7 , en el que R_7 es un alquilo C_1-C_{12} , preferiblemente C_1-C_6 , lineal o ramificado.

El grupo alquilo representa un grupo C_1-C_{12} lineal o ramificado, tal como los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, sec-pentilo, terc-pentilo, neo-pentilo, hexilo, isohexilo, sec-

40 hexilo, terc-hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo o dodecilo, siendo preferidos los grupos alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado.

El grupo arilo representa un grupo C_6-C_{14} insaturado, monocíclico o policíclico, carbocíclico, tal como los grupos fenilo, naftilo, indenilo, antraceno y, más particularmente, el grupo fenilo.

45

Por "heteroátomo" se refiere a un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre.

Por "residuo de azúcar" se refiere, por ejemplo, a una unidad del tipo glucosa, ribosa o arabinosa.

50 Los residuos aminoácidos ventajosos son, por ejemplo, unidades metionilo, glicinilo o alanilo.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos en los que se cumple al menos una de las siguientes condiciones:

- 5 - A representa un grupo $-(R_1)_n-$ en el que R_1 es un residuo aminoácido y $n = 2$;
 - A representa un grupo $-(R_1)_n-$ en el que R_1 es un residuo aminoácido, $n = 2$ y el extremo N-terminal de dicho aminoácido está sustituido con un grupo arilalcoxicarbonilo, en particular benciloxicarbonilo;
 - A representa un radical alanilo unido a un radical glicinilo, opcionalmente sustituido en su extremo N-terminal con un grupo arilalcoxicarbonilo, en particular benciloxicarbonilo;
 10 - A representa un radical metionilo unido a un radical glicinilo, opcionalmente sustituido en su extremo N-terminal con un grupo arilalcoxicarbonilo, en particular benciloxicarbonilo;
 - A representa un grupo $-C(O)-R_5$ en el que R_5 es un grupo 2,2-dimetil-1,3-dioxolano.

Ventajosamente, B representa un grupo acilo en el que el grupo alquilo es C_1-C_6 , en particular acetilo o un grupo
 15 alcoxicarbonilo en el que el grupo alquilo es C_1-C_6 , en particular un grupo *tert*-butoxicarbonilo.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) son como se indica a continuación:

- 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-acetamido)propanoato de 7-((*tert*-butoxicarbonil)oxil)-10,13-dimetil-17-(6-
 20 metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.a);
 - 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-acetamido)propanoato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-
 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.b);
 - 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-((*tert*-butoxicarbonil)oxi)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-
 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.a);
 25 - 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-
 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.b).

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse a partir de colesterol mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- 30 - protección de la función hidroxilo en la posición 3 del colesterol con un grupo protector, tal como, por ejemplo, un grupo arilalcoxicarbonilo,
 - introducción de una función cetona en la posición 7,
 - reducción de la función cetona en una función hidroxilo,
 35 - introducción de un grupo protector en la función hidroxilo en la posición 7, correspondiente al grupo B, tal como, por ejemplo un grupo acilo o alcoxicarbonilo,
 - desprotección de la función hidroxilo en la posición 3.

Después de la desprotección de la función hidroxilo en la posición 3, dicha función hidroxilo puede sustituirse con el
 40 grupo A deseado.

La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas o productos médicos que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede consistir en una preparación liposomal que comprende al menos un compuesto de fórmula (I).

Los liposomas pueden producirse mediante diversas técnicas conocidas por un experto en la técnica. Pueden usarse diversos lípidos que constituyen los liposomas [Medical Application of Liposomes (1986) editado por Kunio Yagi,
 50 Japan Scientific Societies Press, Tokio, Karger].

Un producto médico preferido de la invención consiste en un liposoma cargado con al menos un compuesto de fórmula (I).

55 Preferiblemente, el compuesto o compuestos de fórmula (I) constituyen el único o únicos principios activos contenidos en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en particular cuando dicha composición farmacéutica es un liposoma.

Como alternativa, el compuesto de fórmula (I) puede usarse junto con otro principio activo, tal como, por ejemplo un
 60 agente anticanceroso, en particular derivados de avastina, irinotecán, temozolomida o taxol.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención que se han descrito anteriormente pueden estar en cualquier forma adecuada para administración oral o para administración parenteral, en particular por inyección, infusión o inhalación, conocida por un experto en la técnica.

5

En particular, dicha composición farmacéutica puede ser una solución farmacéuticamente aceptable, en particular una solución alcohólica, de al menos un compuesto de fórmula (I), en solitario o junto con otro principio activo, que puede administrarse a un paciente por transfusión o infusión.

10 Los compuestos de fórmula (I), para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican células astrocíticas transformadas, en particular en el tratamiento de glioblastoma multiforme (GBM), son también un objeto de la invención. En particular, los compuestos de fórmula (I) pueden inyectarse directamente en la corteza cerebral, en el sitio de tratamiento.

15 La invención también se refiere al tratamiento de enfermedades que implican células astrocíticas transformadas, en particular el tratamiento de glioblastoma multiforme (GBM), administrando una cantidad eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I).

De acuerdo con una alternativa, dicho tratamiento es un tratamiento secuencial que comprende al menos una etapa de administración de un primer compuesto de fórmula (I) y al menos una etapa de administración de un segundo compuesto de fórmula (I), diferente del primero.

20

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no la limitan.

25 La sección I se refiere a la síntesis química.

Los Ejemplos 1 y 2 se refieren a la preparación de intermedios de síntesis usados para la preparación de los compuestos de fórmula (I). Los Ejemplos 3 a 6 se refieren a la preparación de compuestos de fórmula (I).

30 La sección II se refiere a la actividad biológica de los compuestos de fórmula (I).

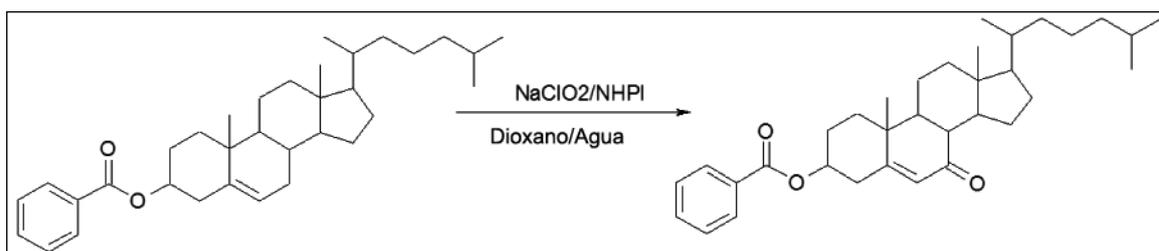
I/ Síntesis química

Ejemplo 1: Preparación de 7beta-acetilcolesterol (compuesto 1.4)

35

El diagrama de reacción se muestra en la figura 1.

1) Preparación del compuesto 1.1



40

Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de colesterilo	490,78	100 mmol	-	50 g
Clorito sódico	90,44	300 mmol	3 equiv.	28 g
N-Hidroxifitalimida	163,13	10 mmol	0,1 equiv.	1,7 g
Dioxano/Agua 3/1				500 ml

45 El benzoato de colesterilo, la mezcla dioxano/agua, clorito sódico y N-hidroxifitalimida se ponen en ese orden en un matraz de 3 bocas de 1 litro equipado con un condensador. Esta mezcla se calienta a 50 °C durante 6 h. El avance de la reacción se controla por TLC en placa de gel de sílice (TLC gel de sílice 60 F254, Merck) en 8/2 de

hexano/Et2O.

Cuando la tasa de formación alcanza un valor aceptable, la mezcla de reacción en bruto se vierte en una solución al 10 % de sulfito sódico (500 ml), y después se extrajo con éter. La fase orgánica obtenida se lava con una solución saturada de hidrogenocarbonato sódico, después con agua y finalmente con salmuera. Después, esta fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida.

Después, el residuo oleoso con color obtenido se purifica por recristalización en etanol. Dado que el sólido de color blanco obtenido no es de pureza suficiente, se purifica de nuevo por cromatografía sobre gel de sílice (sílice SDS 60A, 35-70 μm). Se obtiene un depósito sólido recogiendo este aceite en diclorometano. La purificación se realiza en un eluyente que pasa de 98/2 de hexano/acetato de etilo a 90/10. El producto se obtiene en forma de un sólido de color blanco.

Rendimiento: 23 %

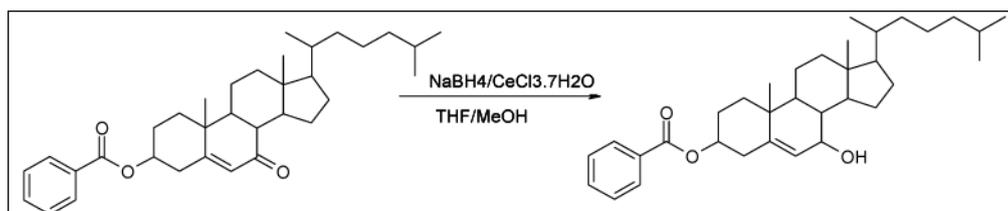
15 **Análisis:** Análisis por ^1H RMN en CDCl_3 , BRUKER 400 MHz. Columna HPLC de fase normal CHIRALCEL O-DH (columna ODH0CE-CE026), eluyente 9/1 de Hexano/iPrOH, 20 min, longitud de onda 190 nm.

Tiempo de retención 6,682 min, pureza HPLC 99,2 %.

^1H RMN (CDCl_3 , 400,13 MHz): δ 0,71 (s, 3H, CH_3), 0,89 (dd, 6H, 2 CH_3), 0,94 (d, 3H, CH_3), 1,02-2,78 (m, 26H), 1,27 (s, 3H, CH_3), 4,99 (m, 1H, CH), 5,76 (d, 1H, CH), 7,44-8,05 (m, 5H, CHAr).

20

2) Preparación del compuesto 1.2



25 Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de cetocolosterilo	504,76	15,8 mmol	-	8 g
NaBH_4	37,83	7,9 mmol	0,5 equiv. + 0,5 equiv.	0,3 g + 0,3 g
$\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	372,60	14,2 mmol	0,9 equiv.	5,3 g
1:1 de THF/MeOH				200 ml

El benzoato de cetocolosterilo, la mezcla de disolvente THF/MeOH y el cloruro de cerio hidratado se ponen en un matraz de 500 ml. Después, la mezcla de reacción en bruto se enfría a 0 °C con un baño de hielo, antes de añadir lentamente borohidruro sódico.

Se observa desprendimiento de gas, el baño de hielo se mantiene durante 1 h, después se agita a temperatura ambiente durante 18 h. El progreso se controla por TLC (TLC gel de sílice 60 F254, Merck) en eluyente 80/20 de Hexano/EtOAc. Si la tasa de formación es insuficiente, se añaden 0,5 equiv. de borohidruro sódico.

35

A la mezcla de reacción en bruto se le añaden 50 ml de agua y 200 ml de diclorometano. Después de la transferencia a un embudo de separación, la fase orgánica se recupera. La fase acuosa se extrae de nuevo con DCM. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con una solución 1 N de ácido clorhídrico y después con una solución saturada de NaCl.

40

Después, la fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se evapora a presión reducida, dando un aceite ligeramente coloreado, que cristaliza espontáneamente.

Se obtiene un depósito sólido recogiendo el residuo en DCM. Este producto en bruto se purifica sobre una columna de gel de sílice (sílice SDS 60A, 35-70 μm) en eluyente 9/1 de hexano/EtOAc. El producto se obtiene en forma de un sólido de color blanco.

45

Rendimiento: 89 %

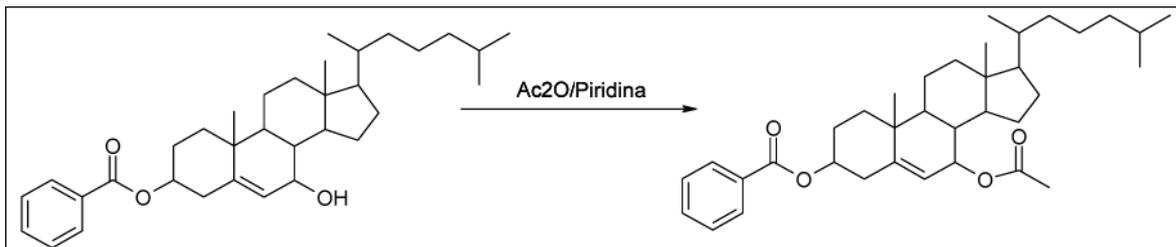
Análisis: Análisis por ¹H RMN en CDCl₃, BRUKER 400 MHz. Columna HPLC de fase normal CHIRALCEL O-DH (columna ODH0CE-CE026), eluyente 9/1 de hexano/iPrOH, 20 min, longitud de onda 190 nm.

5 Tiempo de retención 7,076 min, pureza HPLC 98,8 %.

¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 0,63 (s, 3H, CH₃), 0,79 (dd, 6H, 2CH₃), 0,85 (d, 3H, CH₃), 0,89-2,43 (m, 27H), 1,04 (s, 3H, CH₃), 3,81 (d, 1H, CH), 4,81 (m, 1H, CH), 5,29 (d, 1H, CH), 7,34-7,99 (m, 5H, CHAr).

3) Preparación del compuesto 1.3

10



Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de 7-β-hidroxicolesterilo	505,76	9,9 mmol	-	5 g
Anhídrido acético				20 ml
Piridina				20 ml

15

El benzoato de 7-β-hidroxicolesterilo, piridina, y después el anhídrido acético se ponen en un matraz de 100 ml. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso se controla por TLC (TLC gel de sílice 60 F254, Merck) en eluyente 9/1 de hexano/EtOAc.

20 La mezcla de reacción en bruto se evapora a presión reducida. Se realizan dos co-evaporaciones con acetato de etilo. El residuo obtenido se recoge en acetato de etilo. La fase orgánica obtenida de este modo se lava con ácido clorhídrico 1 N, se seca sobre sulfato sódico y después se evapora a presión reducida.

El sólido de color blanco obtenido se introduce directamente en la siguiente etapa, sin purificación adicional.

25

Rendimiento: 100 %

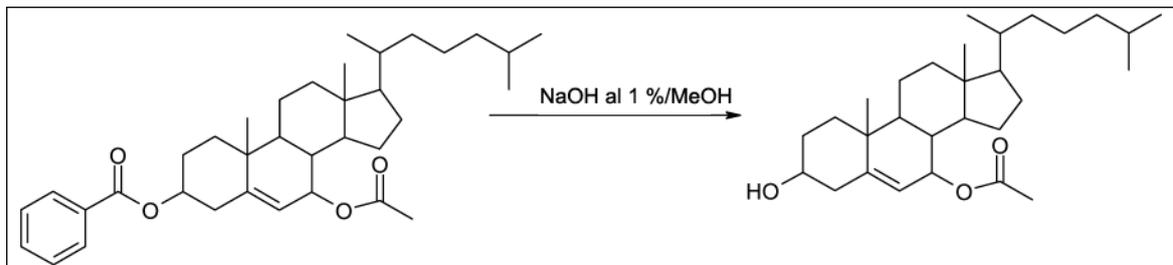
Análisis: Análisis por ¹H RMN en CDCl₃, BRUKER 400 MHz. Columna HPLC de fase normal CHIRALCEL O-DH (columna ODH0CE-CE026), eluyente 9/1 de hexano/iPrOH, 20 min, longitud de onda 190 nm.

Tiempo de retención 4,972 min, pureza HPLC 99,6 %.

30 **¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz):** δ 0,63 (s, 3H, CH₃), 0,79 (dd, 6H, 2CH₃), 0,84 (d, 3H, CH₃), 0,91-2,41 (m, 26H), 1,06 (s, 3H, CH₃), 1,95 (s, 3H, CH₃ acetilo), 4,78 (m, 1H, CH), 4,99 (d, 1H, CH), 5,21 (s, 1H, CH), 7,33-7,98 (m, 5H, CHAr).

4) Preparación del compuesto 1.4

35



Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de 7-β-acetilcolesterilo	548,81	9,1 mmol	-	5 g
NaOH al 1 % en metanol				50 ml

El benzoato de 7-β-acetilcolesterilo y una solución de sodio al 1 % en metanol se ponen en un matraz de 100 ml. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se disuelve completamente. El progreso se controla por TLC (TLC gel de sílice 60 F254, Merck) en un eluyente 7/3 de hexano/EtOAc.

5

Para completar la reacción, la mezcla en bruto puede calentarse a 40 °C, en tal caso, el control por TLC se realiza cada 20 minutos.

Se añaden 200 ml de acetato de etilo y 50 ml de agua seguido de transferencia a un embudo de separación y la separación de las fases. La fase acuosa se mezcla de nuevo una vez con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico, se filtran y después se evaporan a presión reducida, dando un residuo oleoso.

El residuo se recoge en acetato de etilo para preparar el depósito sólido. La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice (sílice SDS 60A, 35-70 μm) en eluyente de hexano/EtOAc pasando de 9/1 a 7/3. El producto esperado se obtiene en forma de un aceite incoloro que cristaliza espontáneamente, dando un sólido de color blanco. La columna se lava con acetato de etilo al 100 % para recuperar el 7-β-hidroxicolesterol formado.

Rendimiento: 38 %

20 Análisis: Análisis por ¹H RMN en CDCl₃, BRUKER 400 MHz. Columna HPLC de fase normal CHIRALCEL O-DH (columna ODH0CE-CE026), eluyente 9/1 de hexano/iProH, 20 min, longitud de onda 190 nm.

Tiempo de retención 6,186 min, pureza HPLC 91,7 %.

¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 0,62 (s, 3H, CH₃), 0,78 (dd, 6H, 2CH₃), 0,85 (d, 3H, CH₃), 0,86-2,28 (m, 27H), 1,03 (s, 3H, CH₃), 1,96 (s, 3H, CH₃ acetilo), 3,47 (m, 1H, CH), 4,94 (td, 1H, CH), 5,13 (t, 1H, CH).

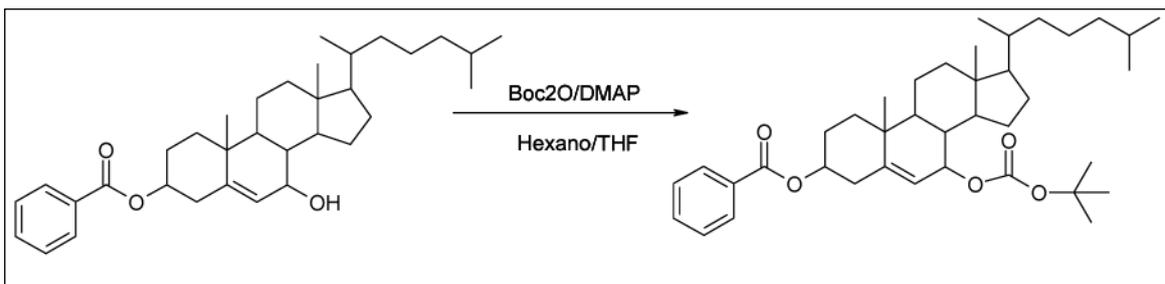
25

Ejemplo 2: Preparación de 7beta-terc-butiloxicarbonilcolesterol (compuesto 1.6)

El diagrama de reacción se muestra en la figura 2.

30 El compuesto 1.6 a partir del compuesto 1.2 del Ejemplo 1.

1) Preparación del compuesto 1.5



35

Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de 7-β-hidroxicolesterilo	505,76	1,29 mmol	-	0,65 g
Boc2O	218,25	2,8 mmol	2,2 equiv.	0,61 g
DMAP	122,17	0,13 mmol	0,1 equiv.	0,016 g
5:2 de Hexano/THF				42 ml

El benzoato de 7-β-hidroxicolesterilo, el disolvente, 2,6-dimetilaminopiridina y después el anhídrido de terc-butiloxicarbonilo se ponen en un matraz de una boca de 100 ml. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se disuelve completamente. El progreso se controla por TLC en un eluyente 8/2 de hexano/EtOAc.

40

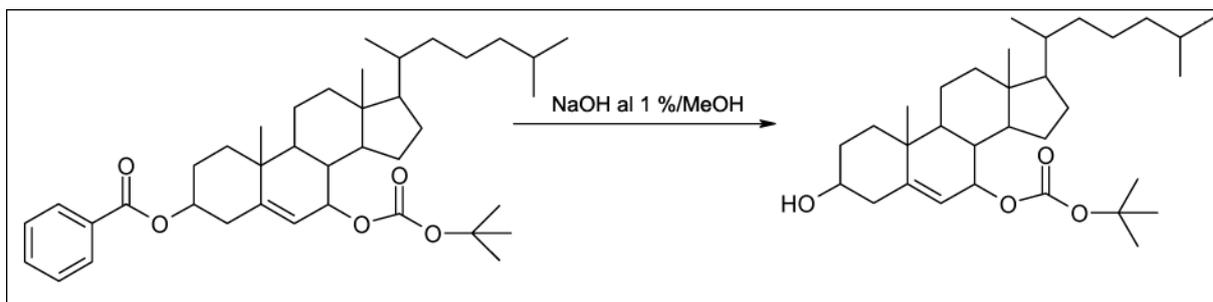
Se añaden 50 ml de EtOAc y 10 ml de agua. La fase orgánica obtenida de este modo se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida, dando un residuo oleoso.

El residuo se recoge en EtOAc para preparar el depósito sólido. La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice en eluyente 95/5 de hexano/EtOAc.

Análisis: Análisis por ^1H RMN en CDCl_3 .

^1H RMN (CDCl_3 , 400,13 MHz): δ 0,59 (s, 3H, CH_3), 0,77 (dd, 6H, 2CH_3), 0,84 (d, 3H, CH_3), 0,86-1,98 (m, 24H), 1,09 (s, 3H, CH_3), 1,41 (s, 9H, 3CH_3 , t-Boc), 2,42 (m, 2H, CH_2), 4,80 (m, 1H, CH), 4,91 (d, 1H, CH), 5,18 (s, 1H, CH), 7,34-7,97 (m, 5H, CHAr).

2) Preparación del compuesto 1.6



15

Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
Benzoato de 7- β -t-Butiloxicarbonil-colesterilo	606,89	1,64 mmol	-	1 g
NaOH al 1 % MeOH				50 ml

El benzoato de 7- β -t-butiloxicarbonilcolesterilo y una solución de sodio al 1 % en metanol se ponen en un matraz de una boca de 50 ml. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se solubiliza completamente. El progreso se controla por TLC en un eluyente 7/3 de hexano/EtOAc. Para completar la reacción, la mezcla en bruto puede calentarse a 40 °C.

Se añaden 100 ml de EtOAc y 20 ml de agua. La fase acuosa se extrae de nuevo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico, se filtran y después se evaporan a presión reducida, dando un residuo oleoso.

El residuo se recoge en EtOAc para preparar el depósito sólido. La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice en eluyente de hexano/EtOAc que pasa de 9/1 a 7/3. La columna se lava con EtOAc al 100 % para recuperar el 7- β -hidroxicolesterol formado.

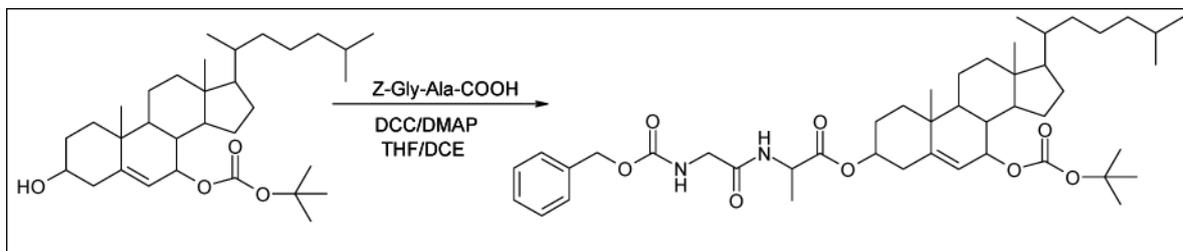
Análisis: Análisis por ^1H RMN en CDCl_3 .

^1H RMN (CDCl_3 , 400,13 MHz): δ 0,60 (s, 3H, CH_3), 0,78 (dd, 6H, 2CH_3), 0,84 (d, 3H, CH_3), 0,91-2,29 (m, 27H), 0,97 (s, 3H, CH_3), 1,41 (s, 9H, 3CH_3 , t-Boc), 3,47 (m, 1H, CH_B), 4,77 (td, 1H, CH_C), 5,17 (t, 1H, CH_A).

35

Ejemplo 3: Preparación de 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)acetamido) propanoato de 7-((terc-butoxicarbonil)oxil)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.a)

40 Nombre simplificado: 3-benciloxicarbonil-glicidil-alanil-7- β -O-terc-butiloxicarbonil-colesterol



La Molécula 1.a se prepara a partir del compuesto intermedio 1.6.

5 Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
7-β-t-Butiloxicarbonil-colesterol (compuesto 1.6)	502	0,16 mmol	-	80 mg
Z-Gly-Ala-COOH	280,28	0,24 mmol	1,5 equiv.	68 mg
DCC	206,3	0,24 mmol	1,5 equiv.	50 mg
DMAP	122,17	0,24 mmol	1,5 equiv.	30 mg
1:1 de THF/DCE				6 ml

Se ponen 80 mg (0,16 mmol) de 7-β-t-butiloxicarbonilcolesterol, 68 mg (0,24 mmol, 1,5 equiv.) de dipéptido, 6 ml de mezcla de disolvente (1:1 de THF/DCE), 50 mg (0,24 mmol, 1,5 equiv.) de DCC, y 30 mg (0,24 mmol, 1,5 equiv.) de DMAP en un frasco Wheaton de 10 ml. La mezcla de reacción en bruto se agita durante 24 h a temperatura ambiente. El progreso se controla por TLC en un eluyente 7/3 de hexano/acetato de etilo.

Al producto de reacción en bruto se le añaden 30 ml de acetato de etilo y 10 ml de agua. La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se recoge en acetato de etilo para preparar el depósito sólido.

La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice en eluyente 7/3, después 6/4, de hexano/acetato de etilo.

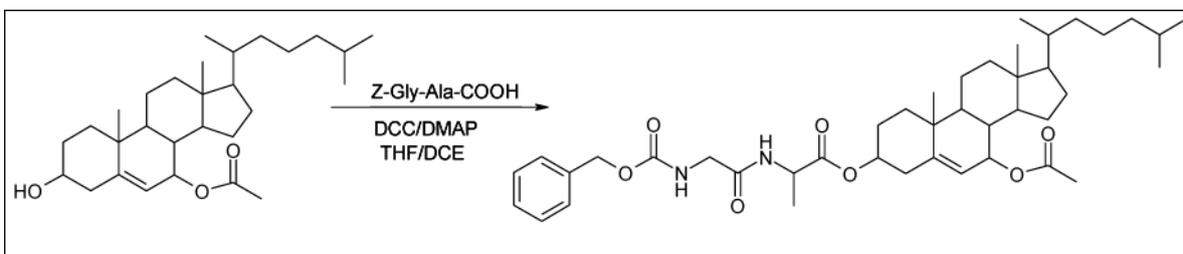
20 **Análisis:** Análisis por ^1H RMN en CDCl_3 .

^1H RMN (CDCl_3 , 400,13 MHz): δ 0,60 (s, 3H, CH_3), 0,79 (dd, 6H, 2 CH_3), 0,83 (d, 3H, CH_3), 0,94-1,88 (m, 24H), 0,98 (s, 3H, CH_3), 1,19 (s, 3H, CH_3 Ala), 1,40 (s, 9H, 3 CH_3 , t-Boc), 2,27 (m, 2H, CH_2), 3,83 (m, 2H, CH_2), 4,47 (td, 1H, CH Ala), 4,47 (m, 1H, CH), 4,78 (td, 1H, CH), 5,07 (s, 2H, CH_2 Gly), 5,22 (t, 1H, CH), 5,23 (m, 1H, NH), 6,41 (sl, 1H, NH), 7,29 (m, 5H, CHAr).

25

Ejemplo 4: Preparación de 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)acetamido)propanoato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.b)

30 Nombre simplificado: 3-benciloxicarbonil-glicinil-alanil-7-β-O-acetil-colesterol



La Molécula 1.b se prepara a partir del compuesto intermedio 1.4.

35

Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
7-β-Acetilcolesterol	444	0,18 mmol	-	80 mg
Z-Gly-Ala-COOH	280,28	0,27 mmol	1,5 equiv.	76 mg
DCC	206,3	0,27 mmol	1,5 equiv.	56 mg
DMAP	122,17	0,27 mmol	1,5 equiv.	33 mg
1:1 de THF/DCE				6 ml

Se ponen 60 mg (0,13 mmol) de 7-β-acetilcolesterol, 70 mg (0,19 mmol, 1,5 equiv.) de dipéptido, 6 ml de mezcla de disolvente (1:1 de THF/DCE), 42 mg (0,19 mmol, 1,5 equiv.) de DCC, y 25 mg (0,19 mmol, 1,5 equiv.) de DMAP se
5 ponen en un frasco Wheaton de 10 ml. La mezcla de reacción en bruto se agita durante 24 h a temperatura ambiente.

El progreso se controla por TLC en un eluyente 7/3 de hexano/acetato de etilo.

10 Al producto de reacción en bruto se le añaden 30 ml de acetato de etilo y 10 ml de agua. La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se recoge en acetato de etilo para preparar el depósito sólido.

15 La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice en un eluyente 7/3, después 6/4, de hexano/acetato de etilo.

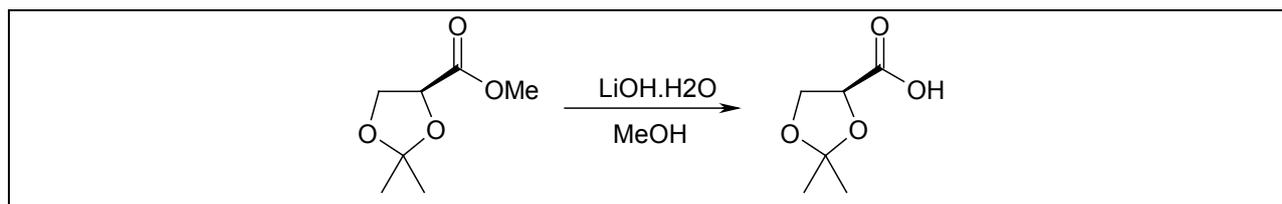
Análisis: Análisis por ¹H RMN en CDCl₃.

20 ¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 0,62 (s, 3H, CH₃), 0,78 (dd, 6H, 2CH₃), 0,84 (d, 3H, CH₃), 0,91-1,83 (m, 25H), 1,01 (s, 3H, CH₃), 1,17 (s, 3H, CH₃ Ala), 1,94 (s, 3H, CH₃ acetilo), 2,27 (m, 2H, CH₂), 3,82 (m, 1H, CH), 4,47 (td, 1H, CH Ala), 4,56 (m, 1H, CH), 4,95 (td, 1H, CH), 5,06 (s, 2H, CH₂ Gly), 5,17 (sl, 1H, CH), 5,37 (t, 1H, CH), 6,49 (dl, 1H, NH), 7,24 (m, 5H, CHAR).

25 **Ejemplo 5: Preparación de 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-((terc-butoxicarbonil)oxi)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.a)**

Nombre simplificado: 3-(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxil-7-β-O-terc-butiloxycarbonil-colesterol

30 1) Preparación del grupo 1,3-dioxolano-4-carboxilato de dimetilo



35 Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de (-)-metilo	160,17	31,2 mmol	-	5 g
LiOH.H ₂ O	41,96	78 mmol	2,5 equiv.	3,3 g
Metanol				25 ml

El acetal, metanol y después el hidróxido de litio se ponen en un matraz de 50 ml. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 h.

40

La mezcla de reacción en bruto se evapora a presión reducida. El residuo obtenido se recoge en 75 ml de agua. Después, esta fase se acidifica a 0 °C a pH 1 con ácido clorhídrico 1 N, después se extrae con 2 x 100 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre sulfato sódico, se filtran y después se evaporan a presión reducida, dando un residuo oleoso ligeramente coloreado.

5

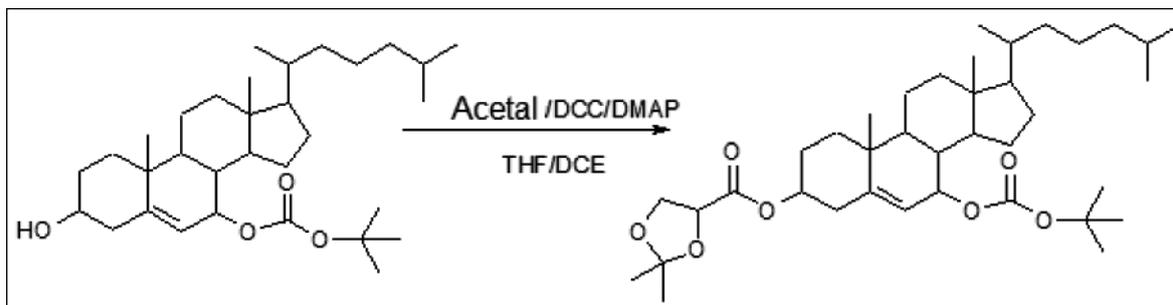
El residuo se usa directamente en la etapa de acoplamiento sin purificación adicional.

Análisis: Análisis por ¹H RMN en DMSO, BRUKER 400 MHz.

¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 1,32 (d, 3H, CH₃), 1,42 (s, 3H, CH₃), 4,14 (AB, 2H, CH₂), 4,55 (dd, 1H, CH), 10,30 (sl, 1H, OH), 7,24 (m, 5H, CHAr).

Rendimiento: 94 %

2) Preparación de molécula 2.a



15

La Molécula 2.a se prepara a partir del compuesto intermedio 1.4.

Se usaron los siguientes reactivos:

20

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
7-β-Acetilcolesterol	444	3,4 mmol	-	1,5 g
Ácido 3-(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxílico	146,17	10,1 mmol	3 equiv.	1,35 g
DCC	206,3	10,1 mmol	3 equiv.	2,1 g
DMAP	122,17	10,1 mmol	3 equiv.	1,24 mg
THF/DCE (1:1)				50 ml

Se ponen 50 mg (9,9 mmol) de 7-β-t-butiloxycarbonilcolesterol, 6 ml de mezcla de disolvente (1:1 de THF/DCE), y 16 mg (11,9 mmol, 1,2 equiv.) de ácido 3-(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxílico se ponen en un frasco Wheaton de 10 ml.

25

Se añaden 24,5 mg (11,9 mmol, 1,2 equiv.) de DCC y 14,5 mg (11,9 mmol, 1,2 equiv.) de DMAP, antes de agitar la mezcla de reacción en bruto durante 24 h a temperatura ambiente. El progreso se controla por TLC en un eluyente 8/2 de hexano/acetato de etilo. Se calienta a 50 °C durante 2 h para finalizar la reacción.

30 Al producto de reacción en bruto se le añaden 30 ml de acetato de etilo y 10 ml de agua. La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida. El residuo oleoso obtenido se recoge en acetato de etilo para preparar el depósito sólido.

35 La purificación se realiza sobre una columna de gel de sílice en un eluyente 95/5, después 9/1 de hexano/acetato de etilo.

Análisis: Análisis por ¹H RMN en CDCl₃.

¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 0,60 (s, 3H, CH₃), 0,79 (dd, 6H, 2CH₃), 0,83 (d, 3H, CH₃), 0,74-1,97 (m, 25H), 0,98 (s, 3H, CH₃), 1,33 (s, 3H, CH₃ Acetal), 1,40 (s, 9H, 3CH₃, t-Boc), 1,42 (s, 3H, CH₃ Acetal), 2,29 (m, 2H, CH₂), 4,08 (AB, 2H, CH₂ Acetal), 4,48 (ddd, 1H, CH Acetal), 4,63 (m, 1H, CH), 4,78 (td, 1H, CH), 5,22 (d, 1H, CH).

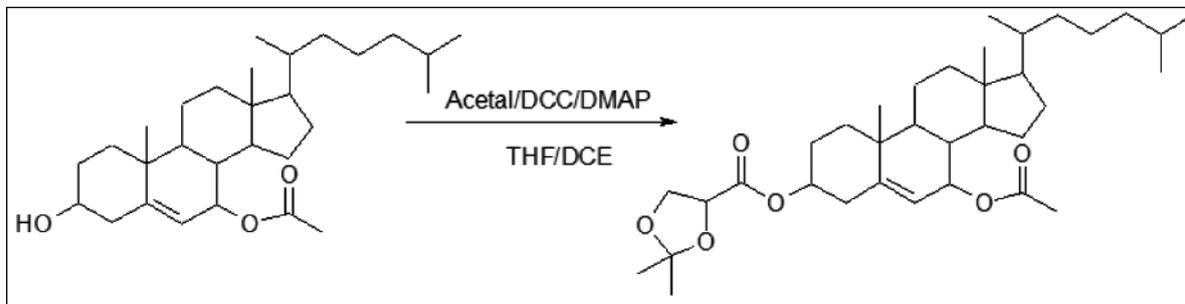
40

Ejemplo 6: Preparación de 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-

metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.b)

Nombre simplificado: 3-(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxil-7-β-O-acetil-colesterol

5



La Molécula 2.b se prepara a partir del compuesto intermedio 1.4.

10 Se usaron los siguientes reactivos:

	PM	Nb mol.	equiv.	Masa o Volumen
7-β-Acetilcolesterol	444	3,4 mmol	-	1,5 g
Acido 3-(S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxílico	146,17	10,1 mmol	3 equiv.	1,35 g
DCC	206,3	10,1 mmol	3 equiv.	2,1 g
DMAP	122,17	10,1 mmol	3 equiv.	1,24 mg
THF/DCE (1:1)				50 ml

El colesterol, la mezcla de disolvente y el ácido se ponen en un matraz de 100 ml. Se añaden DCC y DMAP, antes de agitar el producto de reacción en bruto durante 24 h a temperatura ambiente. El progreso se controla por TLC (TLC gel de sílice 60 F254, Merck) en un eluyente 8/2 de hexano/EtOAc.

A la mezcla de reacción en bruto se le añaden 100 ml de acetato de etilo y 50 ml de agua. La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a presión reducida.

20 El residuo oleoso obtenido se recoge en acetato de etilo para preparar el depósito sólido. Columna de gel de sílice (sílice SDS 60A, 35-70 μm) en un eluyente 95/5, después 9/1, de hexano/EtOAc.

Rendimiento: 68 %

Análisis: Análisis por ¹H y ¹³C RMN en CDCl₃ BRUKER 400 MHz. Columna HPLC de fase normal CHIRALCEL O-DH (columna ODH0CE-CE026), eluyente 9/1 de hexano/iProH, 20 min, longitud de onda 190 nm.

25 Tiempo de retención 5,291 min, pureza HPLC 98,7 %.

¹H RMN (CDCl₃, 400,13 MHz): δ 0,62 (s, 3H, CH₃), 0,79 (dd, 6H, 2CH₃), 0,84 (d, 3H, CH₃), 0,91-2,30 (m, 27H), 1,01 (s, 3H, CH₃), 1,33 (s, 3H, CH₃ Acetal), 1,42 (s, 3H, CH₃ Acetal), 1,93 (s, 3H, CH₃ acetilo), 4,09 (AB, 2H, CH₂ Acetal), 4,48 (dd, 1H, CH Acetal), 4,62 (m, 1H, CH), 4,96 (td, 1H, CH), 5,18 (d, 1H, CH).

30

II/ Actividad biológica**A/ Protocolos**

35 Se usaron los siguientes protocolos para todos los experimentos:

1) Cultivos celulares

40 Se usaron placas de cultivo de 96 pocillos con el fondo plano de plástico (NUNC, Estados Unidos) para el cultivo celular (Sigma-Aldrich, ref. 114754); se siembran 1500 células por pocillo en 200 μl de medio de cultivo. En el momento del tratamiento, se añaden por pocillo 100 μl de medio de cultivo puro, 100 μl de medio de cultivo que contiene etanol, o liposomas, o 100 μl de medio de cultivo que contiene los principios activos; el volumen final del

medio de cultivo, después del tratamiento es, por lo tanto, de 300 µl para todos los pocillos.

Los cultivos se incuban en una incubadora Sanyo (Japón, modelo MCO-19AIC-UV) a 37 °C y en una atmósfera con CO₂ al 5 % y se saturaron en humedad. Las células se observan con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, 5 Japón) y las fotografías se toman con una cámara (cámara DIGITAL con c-mount; LABOVER, Francia). La campana de cultivo es una campana de seguridad microbiológica MSC (thermo SCIENTIFIC, modelo HERA SAFE KS12, Francia).

El tiempo de duplicado celular se calcula usando las fórmulas:

10

$$\log_2(a) = \log_{10}(a) \times 3,32$$

$$\log_2(b) = \log(b) \times 3,32$$

$$\text{Tiempo de duplicado} = \log_2(b) - \log_2(a)$$

donde (a) y (b) representan el número de células en los momentos a y b (b>a) (12).

15

La transición se realiza por disociación con tripsina (páncreas bovino tipo 3, Sigma, Francia). La disociación celular se realiza a temperatura ambiente, durante 30 minutos, con una solución al 0,04 % (p/v) en KCl de Tyrode que contiene tripsina al 0,05 % (p/v).

20 Después de la disociación, las células se suspenden en el medio de cultivo apropiado para las células y se cuentan usando un contador de células THOMA y se diluyeron en el mismo medio para obtener 1500 células por pocillo.

a) Líneas celulares

25 Se usaron las siguientes líneas de glioblastoma:

- Líneas C6.

30 La línea celular de tipo C6 se obtuvo por Benda y col. (13) a partir de tumores de cerebro de rata, inducidos por N-metilnitrosourea. Este tipo de célula se usa como modelo "in vitro" e "in vivo" para evaluar el potencial anti-GBM. Las líneas proceden del antiguo Strasbourg Neurochemistry Centre (U44 INSERM y UPR 416 CNRS).

35 El medio de cultivo está formado por medio esencial mínimo al 70 % (MEM; (Fischer Scientific, ref. 61100) y una solución de Hanks al 30 % (SIGMA, ref. H 9269). Se añaden los siguientes al medio de cultivo: suero fetal de ternero (FCS; Fischer Scientific, ref. 10108165) a una concentración final del 5 % (v/v), una solución antibiótica de clorhidrato de ciprofloxacina 5 µg/ml (EUROMEDEX, ref. UC5074) y una solución de fungizona 2,5 µg/ml (INVITROGEN, ref. 15290-026). El tiempo de duplicado de este tipo de células es de 17 h.

- Líneas de GBM de origen humano

40

Las líneas de glioblastoma humano (GBM, línea U-87 MG) y su medio de cultivo (medio esencial mínimo de Eagle o EMEM) se obtuvieron de la ATCC (Estados Unidos, ref. ATCC- HTB-14). El cultivo de las células se inicia y se mantiene de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. Estas líneas se usan comúnmente "in vitro" e "in vivo" para probar el potencial anti-GBM. El tiempo de duplicado de estas líneas es de 16 h.

45

También se usaron los siguientes cultivos principales de células humanas:

- Células astrocíticas

50 Las células astrocíticas de origen humano usadas se obtuvieron de ScienCell, Estados Unidos (ref. 1800), así como su medio de cultivo, formado por un medio básico que contiene suero FCS al 2 % (v/v) (ref. 0010), proteínas de crecimiento astrocítico (AGS, ref. 1852) y una solución de penicilina/estreptomycin (ref. 0503). El tiempo de duplicado de estos astrocitos humanos es de 96 h.

55

- Células hepáticas

De origen humano, se obtuvieron en ScienCell, Estados Unidos (ref. 50200), así como el medio de cultivo (ref. 5201), que contiene FCS al 10 % (v/v). El tiempo de duplicado de estas células es de 24 h.

60

- Células renales

Estas células, de origen humano, se obtuvieron en ScienCell, Estados Unidos (ref. 4120), así como el medio de cultivo (ref. 4101), que contiene FCS al 10 % (v/v). El tiempo de duplicado es de 96 h.

5 • Células cardíacas

Estas células, de origen humano, se obtuvieron en ScienCell, Estados Unidos (ref. 6300), así como el medio de cultivo, que contiene FCS al 10 % (v/v). El tiempo de duplicado es de 72 h.

10 • Células musculoesqueléticas

De origen humano, se obtuvieron en ScienCell, Estados Unidos (ref. 3500), así como el medio de cultivo (ref. 3501), que contiene FCS al 10 % (v/v). El tiempo de duplicado para estas células es de 72 h.

15 También se usaron los siguientes cultivos de células cancerosas de origen humano:

• Células cancerosas hepáticas

Se obtuvieron en la ATCC (ref. ATCC-HB-8065). El medio de cultivo consiste en MEM (Gibco, Estados Unidos; ref. 51200) y FCS al 10 % (v/v). El tiempo de duplicado es de 60 h.

• Células cancerosas de próstata

Se obtuvieron en ATCC (ref. ATCC-HTB-81). El medio de cultivo es el mismo que el usado para las líneas de cáncer de hígado. El tiempo de duplicado es de 60 h.

• Células cancerosas de mama

Se obtuvieron en la ATCC (ref. ATCC-HTB-19). El medio de cultivo es el mismo que el usado para las líneas de cáncer de hígado. El tiempo de duplicado es de 20 h.

Para todos estos cultivos, el cultivo se inició y se mantuvo de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

b) Tratamiento de los cultivos

35

Los principios activos se disuelven en etanol absoluto (AnalaR, NORMAPUR, VWR, Francia) o en forma de una solución liposomal, tal como 10 µl de las soluciones madre diluidas en 990 µl y después se añaden a los pocillos de cultivo (200 µl de medio de cultivo), dando concentraciones de 30,0, 15,0, 7,5 y 3,3 µM (volumen final de medio de cultivo por pocillo BI-GBM: 300 µl).

40

Cuando los principios activos están en una solución etanólica, el medio de cultivo contiene etanol al 3,3 % (v/v).

2) Preparación de los liposomas

45 La metodología básica se describe por Werthle y col. (10).

En resumen, los compuestos a ensayar, concretamente los compuestos de acuerdo con la invención (principios activos) o 7β-OHCH-C3-éster (un derivado de 7beta-hidroxisterol esterificado en la posición 3 con un grupo oleato, la síntesis de que se describe por Rakotoarivelo y col. (14) y que se usa como control), fosfatidilcolina de soja (Sigma), así como colesteril-3-sulfato (Sigma) se toman de soluciones madre preparadas a partir de dicloroetano en el caso de los principios activos y el 7β-OHCH-C3-éster, un cloroformo: mezcla de metanol (9:1, v/v) en el caso de fosfatidilcolina y cloroformo en el caso de colesteril-3-sulfato. Las relaciones molares son 1 M/0,1 M/0,25 M para fosfatidilcolina, colesteril-3-sulfato y el 7β-OHCH-C3-éster y los principios activos respectivamente.

50

Después de la evaporación, al compuesto seco se le añade una solución de solución salina en PBS, sin Ca²⁺ y Mg²⁺, pH 7,2 (BioRad). El volumen de tampón y la masa de los productos se ajustan de manera que 20 o 10 µl de liposomas añadidos a 90 µl de medio de cultivo den las concentraciones finales deseadas. Los liposomas se forman por extrusión con Liposofast (Sodexim, SA Muizon, Francia). La solución se pasa 41 veces a través de membranas de filtración de policarbonato (100 nm). Los liposomas se esterilizan por filtración en membranas Millipore de 22 µm.

60

3) Medición de la actividad y la toxicidad

Se usan los mismos métodos para ambos casos. Para la actividad, se usa el potencial anti-GBM de los compuestos de ensayo, y para la toxicidad, se ensaya lo mismo en las células normales de origen humano mantenidas "in vitro".

5

Se usan los siguientes métodos de medición:

a) Recuento celular

10 Se usó un método de recuento celular en fotografías.

Por ejemplo, para los casos de los cultivos en placas de 96 pocillos y dependiendo del aumento del microscopio usado (x 100 o x 200), una fotografía tomada representa un campo de visión con un diámetro igual a 1/5 del diámetro de un pocillo. Por lo tanto, el número total de células en un pocillo es igual a 5 veces el número de células por fotografía. Esta técnica se compara con una técnica convencional (tripsinización de la capa celular, centrifugación de las células, suspensión de las células en una solución salina fisiológica y recuento con un contador de células THOMA) en el caso de las células C6. Los resultados obtenidos son idénticos para ambos métodos.

15

b) Ensayo de proteínas

20

El medio de cultivo se extrae de cada pocillo y se añaden por pocillo 50 µl de tampón de Laemmli (0,1 ml de Tris, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS al 10 %, 8 ml c.s.f de agua ultrapura).

En los pocillos de control se añaden 10 µl de una solución de la gama de albúmina sérica bovina (BSA cristalizada, Sigma); la gama que va de 0 a 20 µg por pocillo. Después, los pocillos se complementan con 40 µl de tampón de Laemmli. Por último, se añaden 200 µl de una solución de reactivo de BCA (Pierce, Estados Unidos; kit de ensayo de proteínas BCA; Thermo Scientific, Francia).

25

Las placas de cultivo se incuban durante 30 min a 37 °C en una cámara de calor. La densidad óptica para cada pocillo se lee y se cuantifica por un lector de placas (BioRad, Estados Unidos, lector de microplacas iMark 12222) a 570 nm.

30

c) Viabilidad celular (prueba MTT)

Este ensayo hace posible detectar la respiración celular, especialmente la respiración mitocondrial. La solución madre de sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, Sigma-Aldrich, Estados Unidos, ref. M5655) se prepara con 10 mg de MTT/ml de tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato, SIGMA, ref. D 1408). Esta solución se añade directamente al medio de cultivo en cada pocillo; la concentración final de MTT es de 25 µg/ml. Después, la placa se incuba a 37 °C durante al menos 1 h.

35

Después de la aparición de granos de formazán de color azul, producidos principalmente por el transporte de electrones mitocondriales, se tomaron fotografías con el fin de contar las células con una alta densidad de granos de formazán; esta técnica se usa en el caso de las líneas U87-MG. Después, para esta línea y los demás cultivos, los medios se retiran y se añaden 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, SDS CARLO ERBA, Italia) para disolver los depósitos de formazán.

40

La densidad óptica se lee y se cuantifica usando el lector de placas (BioRad, lector de microplacas iMark) a 490 nm.

La viabilidad a veces también se ensaya por la técnica de exclusión azul de tripano.

45

4) Inmunomarcado de las células y obtención de imágenes

Los anticuerpos primarios anti-CD133 (poli, Abnova), anti-GFAP (poli, Sigma), anti-NFL (mono, Santa Cruz) y anti-fibroblastos (ERTR7, Santa Cruz) se diluyen hasta 1/100 en el caso de los primeros tres anticuerpos y hasta 1/50 en el caso del último.

50

Los anticuerpos secundarios correspondientes al reconocimiento de los anticuerpos primarios son anticuerpos anti-conejo acoplados a peroxidasa (cabra, Sigma), anti-ratón acoplados a Dylight 488 (oveja, Sigma), anti-ratón acoplados a Dylight 488 (oveja, Sigma) y anti-rata acoplados a FITC (conejo, Sigma). Las diluciones son 1/4000, 1/1000, 1/4000 y 1/400 respectivamente.

60

Las células se permeabilizan durante 5 min con Triton X-100 al 0,1 % (Sigma) en PBS (Fisher Scientific). Los sitios no específicos se bloquean con BSA al 2 % (Sigma) en PBS. Las incubaciones se realizan respectivamente durante 1 h a temperatura ambiente, 48 h a 4 °C, 24 h a 4 °C y 1 h a temperatura ambiente durante los anticuerpos anti-CD133, anti-GFAP, anti-NFL y anti-Fibroblastos. La incubación con los anticuerpos secundarios se realiza durante 1 h a temperatura ambiente. Las células positivas CD133 se detectan por el sistema DAB/H₂O₂ (Sigma), y se observan con un microscopio óptico. La fluorescencia se detecta y las imágenes se obtienen usando un microscopio de epifluorescencia (Axiovert, Zeiss, Alemania).

10 5) Extracción de los lípidos y la identificación de los oxisteroles

Las células se lavan con NaCl al 0,9 ‰, se recogen mecánicamente, se suspenden en tampón Tris-HCl (10 mM; pH 7,4) y se homogenizan con un Potter (1000 r.p.m. y 13 reciprocidades). La homogeneización se realiza en hielo. La extracción se realiza a 4 °C después de añadir 19 volúmenes de cloroformo:metanol (2:1, v/v) durante 1 volumen de suspensión celular de acuerdo con Folch y col. (13). La fase orgánica y la fase acuosa se separan añadiendo 0,2 volúmenes de KCl al 0,74 % (p/v).

Después de la evaporación de la fase orgánica en un evaporador rotatorio (Buchi, R-215, Suiza), el residuo lipídico se recoge en cloroformo. Las capas TLC se lavan previamente con cloroformo:metanol (1:1, v/v) y se activan a 100 °C durante 1 h. Los lípidos se eluyen con el siguiente sistema: éter de petróleo (punto de ebullición: 60-70 °C):éter:ácido acético (80:20:1,3, v/v/v). Los estándares depositadas son colesterol, 7-ceto-colesterol, 7beta-OHCH, 7beta-OHCH-C3-éster y la molécula 2.b. Los lípidos y estándares se detectan con reactivo Maccala. Los valores Fr son respectivamente 0,21, 0,09, 0,08, 0,27 y 0,23 para colesterol, 7-ceto-colesterol, 7beta-OHCH, 7beta-OHCH-C3-éster y molécula 2.b. Los rangos de calibración de 0,5 a 2 µg para cada estándar se realizan por separado. Las intensidades de los puntos de interés se calculan con respecto a los estándares después de explorar las capas finas de sílice que se han desarrollado.

Los disolventes usados son de grado AnalAR o HPLC.

30 **B/ Actividad anti-GBM "in vitro"**

B.1. El modelo animal

Se usaron cultivos de células C6 (rata) en las condiciones operativas que se han mencionado anteriormente (sección II, A).

Ejemplo 7: Actividad anti-GBM "in vitro" en cultivos de células C6 (rata)

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1 a continuación, así como en la figura 3.

Tabla 1

Moléculas ensayadas (etanol al 3 %)	1.a (Ej. 3) 15 µm	2.a (Ej. 5) 15 µm	1.a después 2.a 15 µm + 7,5 µm
Células vivas residuales	3 %	100 %	0 %

La figura 3 (aumento x 200) muestra la aparición de los cultivos de células C6 en las condiciones operativas que se han mencionado anteriormente (sección II, A) en presencia de molécula 1.a (Ej. 3) o después del tratamiento secuencial con la molécula 1.a y después la molécula 2.a (Ej. 5), en 19 días y en 35 días.

Los resultados (Tabla 1) muestran que la molécula 1.a, en forma etanólica, es citotóxica, esto después de 19 días de tratamiento. A 15 µM de 1.a y después de 14 días de tratamiento, el número de células, el nivel de proteínas y el ensayo MTT se reduce en un 30 % para alcanzar una reducción del 97 %, como mucho, en 19 días. A los 19 días de tratamiento, también se observa dependencia de la dosis durante 7,5 y 3,3 µM de 1.a y a 15 µM se observa un aumento al 20 % de la relación MTT/célula con respecto a los cultivos de control.

Con el fin de eliminar las células residuales, se usó un tratamiento secuencial. En primer lugar, las células se tratan con 15 µM de molécula 1.a y el día 19º de tratamiento, se añade la molécula 2.a a una concentración de 7,5 µM.

No se observó ninguna célula viable; únicamente se adhieren los "cadáveres" celulares al sustrato sólido del cultivo celular (fondo del pocillo) como se muestra en la figura 3.

Para resumir, el tratamiento secuencial con la molécula 1.a, y la molécula 2.a, muestra una eficacia completa frente a este tipo celular. Las observaciones indican un aumento de la respiración total de las células antes de su destrucción.

5

B.2. El modelo humano: actividad anti-GBM "in vitro" en cultivos de células humanas (línea U-87 GBM)

B.2.1 Definición del modelo "in vitro" y de la expresión de los resultados

10 a) Caracterización de los diferentes tipos celulares

Las células U-87GM se cultivaron en las condiciones operativas que se han descrito anteriormente (sección II, A).

Los cultivos se forman por dos componentes celulares: una capa celular compuesta por células que se comportan como células normales (no cancerosas) y agregados celulares formados por células de tipo GBM.

La figura 4 muestra una imagen fotónica (x 100) que es característica del cultivo. Puede observarse una capa celular (CL), sobre la que los agregados celulares (CA) de forma hemisférica se fijan. La figura 5 (x 200) muestra, por inmunomarcado, que las células CD133+ (células madre), descritas en los GBM humanos, se sitúan en los agregados celulares y no en la CL. El marcado por inmunofluorescencia muestra la presencia de GFAP, un marcador de astrocitos normales (figuras 6 y 7; x 200) (16) en la CL y CA (figuras 6 y 7; x 200) y de neurofilamentos en CL y CA. Sin embargo, el marcado específico de fibroblastos, células con alto potencial de multiplicación, únicamente se encuentra en el caso de CA. La observación fotónica muestra claramente que las células de los CA se dividen muy rápidamente (96 h de tiempo de duplicación, al menos), mientras que las células que forman el CA tienen un tiempo de duplicado de 16 h.

Estas observaciones justifican el método de recuento celular (células marcadas o no con granos de formazán) que se ha desarrollado; de hecho, el recuento después de la tripsinización no puede distinguir entre las células de CL y CA. Las imágenes también muestran que únicamente los CA tienen un carácter de GBM (tiempo de duplicado corto, presencia de células madre y fibroblastos). Por lo tanto, los resultados obtenidos son los del efecto de las moléculas ensayadas en CA.

b) Expresión de los resultados

35 Los resultados se expresan de acuerdo con los siguientes parámetros:

(i) Eficacia de las moléculas, de acuerdo con la invención

- Cuantificación de las células residuales, las células madre en particular.

40 - Eficacia de las moléculas de acuerdo con la invención con el tiempo

El medio de cultivo que contiene las moléculas de acuerdo con la invención se reemplaza con medio fresco y la multiplicación celular "de novo" se examina: ninguna multiplicación "de novo" significa una destrucción total de las células GBM, incluyendo las células madre.

45

(ii) Efecto de las moléculas en la respiración total de las células GBM.

(iii) Comparación de los resultados obtenidos con las moléculas de acuerdo con la invención con los obtenidos con 7β-OHCH-C3-éster (control).

50

B.2.2 Resultados

Se usaron cultivos de células U87-MG (humanas) en las condiciones operativas que se han mencionado anteriormente (sección II, A).

55

Se usó 7beta-OHCH-C3-éster como control.

Ejemplo 8: Estudio de la actividad anti-GBM "in vitro" de la molécula 2.a (Ej. 5) en forma liposomal

60 Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Días de tratamiento	Molécula 2.a (15 μ M) en forma liposomal		7 β -OHCH-C3-éster (80 μ M) en forma liposomal	
	Proteínas	MTT/célula	Proteínas	MTT/célula
6	70	100	70	100
8	25	140	20	100
13	15	120	15	100
15	0	0	15	100

Estos resultados son el valor medio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los resultados se expresan como un porcentaje con respecto a los controles.

Las observaciones muestran que 15 μ M de la molécula 2.a, en forma liposomal, reducen la presencia de células GBM (CA) a cero después de 15 días de tratamiento.

- 10 Únicamente permanecen las células con baja división (CL). El efecto no es dependiente de la dosis. El 7 β -OHCH-C3-éster no actúa en forma etanólica en los GBM (CA) (véase también el Ejemplo 9), y únicamente actúa en forma liposomal, concretamente a 80 μ M. Si eficacia no es mejor, o incluso disminuye, al aumentar la dosis de 7 β -OHCH-C3-éster en forma liposomal.
- 15 Sin embargo, si el día 13^o de tratamiento el medio de cultivo que contiene el 7 β -OHCH-C3-éster se retira y se reemplaza con un medio de cultivo recién preparado que no contiene este fármaco, se observa multiplicación celular y, en paralelo, un aumento en el ensayo MTT después de dos días; este aumento es del 40 %. Este no es el caso para la molécula 2.a: en ausencia de esta molécula, no se observa ninguna multiplicación celular.
- 20 La Tabla 2 también muestra un gran aumento en MTT/célula (140 % con respecto a los controles) en el momento cuando la mayor parte de las células desaparecen (8 días de tratamiento). Este no es el caso para el 7 β -OHCH-C3-éster liposomal: incluso a 80 μ M, la relación MTT/celular no varía.

Esta observación muestra una acción diferente entre las dos moléculas: la respiración celular total aumenta antes de la muerte masiva de las células. Este no es el caso para el 7 β -OHCH-C3-éster.

Ejemplo 9: Estudio de actividad anti-GBM "in vitro" de molécula 2.b (Ej. 6) en forma etanólica

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3 a continuación.

30

Tabla 3

Días de tratamiento	Molécula 2.b (30 μ M) en forma etanólica		7 β -OHCH-C3-éster (30 μ M) en forma etanólica	
	Proteínas	MTT/célula	Proteínas	MTT/célula
4	100	100	100	100
6	100	100	100	100
9	90	160	100	100
15	50	130	100	100
22	0	0	100	100

Estos resultados son el valor medio de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. Los resultados se expresan como un porcentaje con respecto a los controles. Por encima de 30 μ M, el 7 β -OHCH-C3-éster ya no es soluble en etanol.

Las observaciones muestran que la molécula 2.b es completamente eficaz a 30 μ M en forma etanólica: no queda ninguna célula GBM, incluso después de eliminar el principio activo. Al igual que para la molécula 2.a, en forma liposomal, la respiración celular aumenta antes de la muerte celular. Este no es el caso para el 7 β -OHCH-C3-éster

etanólico, no se observa actividad anti-tumoral.

Además, el reemplazo del medio de cultivo con medio fresco que no contiene el compuesto 2.b en 22 días no conduce a ninguna multiplicación celular.

5

Ejemplo 10: Inmunomarcado de las células madre CD133+ con el sistema A/B peroxidasa

El inmunomarcado se realiza como se ha descrito anteriormente (sección II, A).

10 Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Días de tratamiento	Células CD133+		
	Cultivos no tratados (Controles)	Molécula 2.b (30 µM) en forma etanólica	7β-OHCH-C3-éster (80 µM) en forma liposomal
4	100	100	100
22	100	0	50

15 Estos resultados son el valor medio de dos experimentos independientes realizados cada un por triplicado. Los resultados se expresan como un porcentaje de células positivas CD133 con respecto a los controles. Estos experimentos son independientes de los descritos en los Ejemplos 8 y 9.

20 Como en las observaciones descritas en las Tablas 2 y 3, 7β-OHCH-C3-éster en forma liposomal y la molécula 2.b en forma etanólica reducen el nivel de proteínas en un 85 % y en un 100 % con respecto a las células de control no tratadas.

Los resultados muestran que las células madre se destruyen completamente por la molécula 2.b. Este no es el caso para el 7β-OHCH-C3-éster, incluso cuando se administra en forma liposomal.

25 La figura 9 (inmunomarcado de las células CD133⁺) muestra claramente su desaparición después de 22 días de tratamiento. Este no es el caso para el 7β-OHCH-C3-éster en forma liposomal (figura 10, inmunomarcado de las células CD133⁺); en este caso, aún está presente el 50 % de las células CD133⁺ entre las células residuales. El reemplazo del medio de cultivo con medio fresco que no contiene el compuesto 2.b en 22 días no conduce a la aparición de células madre CD133⁺.

30

Ejemplo 11: Estudio del destino de la molécula 2.b (Ej. 6) en forma etanólica "in vitro" en GBM de origen humano

35 La extracción y el análisis de los lípidos de GBM tratado con 30 µM de la molécula 2.b en forma etanólica no muestra la presencia de 7beta-OHCH-C3-éster después de 24 h o 10 días de tratamiento, siendo este último momento cuando se activa la muerte celular. Sin embargo, se observa un 0,12 % y un 0,18 % de la molécula 2.b transformada en 7beta-OHCH después de 1 día y 10 días de tratamiento respectivamente. Los experimentos de control muestran que estos niveles tan bajos de 7beta-OHCH no inducen ninguna muerte de GBM.

40 **Ejemplo 12: Estudio de toxicidad**

La toxicidad se ensayó "in vitro" en diversos tipos de células normales de origen humano.

a) En astrocitos

45

Las células usadas son células de origen humano (ScienCell, Estados Unidos, ref. 1800), que se han mencionado anteriormente (sección II, A).

El tipo de astrocito se valida por la presencia de GFAP, el marcador estándar de astrocitos normales (figura 11;

aumento x200).

Las moléculas 2.a (forma liposomal) y 2.b (forma etanólica) no son tóxicas en cultivos primarios de astrocitos humanos normales (no cancerosos) a 30 μ M, después de 30 días de tratamiento.

5

b) En otras células

Las células usadas son células hepáticas (ScienCell, Estados Unidos, ref. 50200), células renales (ScienCell, Estados Unidos, ref. 4120), células musculoesqueléticas (ScienCell, Estados Unidos, ref. 3500) y células cardíacas (ScienCell, Estados Unidos, ref. 6300), de origen humano, que se han mencionado anteriormente (sección II, A).

10

Las moléculas 2.a (forma liposomal) y 2.b (forma etanólica) no son tóxicas a 30 μ M y después de al menos 30 días de tratamiento, en cultivos primarios de células hepáticas, células renales, células musculoesqueléticas y células cardíacas de origen humano.

15

Ejemplo 13: Estudio de la actividad de la molécula 2.b (Ej. 6) "in vitro" en otros cánceres

Las células cancerosas usadas son de células cancerosas de hígado (ref. ATCC-HB-8065), próstata (ref. ATCC-HTB-81), mama (ref. ATCC-HTB-19), de origen humano, que se han mencionado anteriormente.

20

A 30 μ M y en forma etanólica, la molécula 2.b no muestra ningún efecto sobre la división celular y la respiración de las células cancerosas de hígado, próstata o de mama de origen humano.

Bibliografía

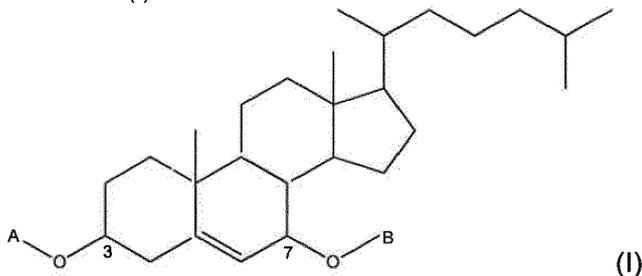
25

1. Kando T, Setoguchi T, Taga T. PNAS. 2004, 101: 781-786.
2. Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, Keating MJ. J. Biol. Chem. 2011, 286: 32843-32853.
3. Warburg O. Biochemische Zeitschrift. 1923, 142: 317-333.
- 30 4. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Nature Reviews Cancer. 2010, 10: 267-277.
5. Cheng KP, Nagano H, Bang L, Ourisson G, Beck JP. Journal of Chemistry Research (M). 1977, 217: 2501-2521.
6. Carvalho JFS, Cruz Silva MM, Moreira JN, Simoes S, Sa e Melo ML. Journal of Medicinal Chemistry. 2011, 54: 6375-6393.
- 35 7. Kupferberg A, Teller G, Behr P, Leray C, Urban PF, Vincendon G, Mersel M. Biochim Biophys Acta. 1989, 1013: 231-23.
8. Kupferberg A, Behr P, Mersel M. Biochim Biophys Acta. 1990, 1046: 106-109.
9. Adamczyk M, Scherrer E, Kupferberg A, Malviya AN, Mersel M. Journal of Neuroscience Research. 1988, 53: 38-50.
- 40 10. Werthle M, Bochelen D, Adamczyk M, Kupferberg A, Poulet P, Chambron J, Lutz P, Privat A, Mersel M. Cancer Research. 1994, 54: 998-1003.
11. Clarion L, Schindler M, de Weille J, Lolmède K, Laroche-Clary A, Uro-Coste E, Robert J, Mersel M, Bakalara N. Biochemical Pharmacology. 2012, 83: 37-46
12. Manford K, Patterson JR. Methods in Enzymology. 1979, 58: 150.
- 45 13. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Science. 1968, 161: 370-371.
14. Rakotoarivelo C, Adamczyk M, Desgeorges M, Langley K, Lorentz JG, Mann A, Ricard D, Scherrer E, Privat A, Mersel M. Anticancer Research. 2006, 26: 2053-2062.
15. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. Journal of Biological Chemistry. 1957, 226: 497-509.
16. Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A. Differentiation, 1980, 17: 51-61

50

REVINDICACIONES

1. El compuesto de fórmula (I)



5 donde

- A representa

- un grupo $-(R_1)_n-$ en el que R_1 es un residuo aminoácido unido por su extremo C-terminal y $n = 1$ a 3 , siendo cada R_1 idéntico o diferente, en el que el extremo N-terminal de dicho aminoácido está sin sustituir o sustituido con un grupo $-C(O)-R_2$ en el que R_2 es un grupo arilalquilo C_6-C_{14} mono o policíclico; un grupo C_5-C_{14} mono o policíclico que puede comprender uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes; un grupo arilalquilo C_6-C_{14} mono o policíclico o un grupo heteroarilalquilo C_5-C_{14} mono o policíclico que puede comprender uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes,

- 15 un grupo $-C(O)-NH-R_3$ o $-C(S)-NH-R_3$ donde R_3 es hidrógeno; un grupo alquilo C_1-C_{12} , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, donde R y R' representan independientemente hidrógeno, un alquilo C_1-C_{12} lineal o un arilo sin sustituir; un grupo arilo sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR como se ha definido anteriormente; un grupo acilo; un grupo formilo; un grupo sulfonilo; un grupo sulfinilo, un grupo sililo sin sustituir o sustituido con un grupo arilo C_6-C_{14} mono o policíclico, sin sustituir o sustituido con al menos un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado; un grupo alilo; un residuo de azúcar; un grupo $-C(O)-OR_4$ en el que R_4 es un alquilo C_1-C_{12} lineal o ramificado sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido anteriormente; un grupo amida; un grupo tioamida; un grupo sulfonamida,
- 20 un grupo $-C(O)-R_5$ donde R_5 es un heterocido C_5-C_{14} saturado que comprende 1 o 2 heteroátomos, sin sustituir o sustituido con al menos un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado o un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, donde R y R' representan independientemente hidrógeno, un alquilo C_1-C_{12} o un arilo sin sustituir.

- B representa un grupo $-C(O)-R_6$ donde R_6 es hidrógeno; un alquilo C_1-C_{12} , preferiblemente C_1-C_6 , lineal o ramificado, sin sustituir o sustituido con un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido anteriormente; un grupo arilo, sin sustituir o sustituido por un grupo seleccionado entre OR, NRR', NHR y SR, como se ha definido anteriormente; o de lo contrario R_6 representa OR_7 , en el que R_7 es un alquilo C_1-C_{12} , preferiblemente C_1-C_6 , lineal o ramificado.

- 35 2. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde se cumple al menos una de las siguientes condiciones:

- A representa un grupo $-(R_1)_n-$ donde R_1 es un residuo aminoácido y $n = 2$;

- 40 - A representa un grupo $-(R_1)_n-$ donde R_1 es un residuo aminoácido, $n = 2$ y el extremo N-terminal de dicho aminoácido está sustituido con un grupo arilalcoxycarbonilo, en particular benciloxycarbonilo;

- A representa un radical alanilo unido a un radical glicinilo, opcionalmente sustituido en su extremo N-terminal con un grupo arilalcoxycarbonilo, en particular benciloxycarbonilo;

45

- A representa un radical metionilo unido a un radical glicinilo, opcionalmente sustituido en su extremo N-terminal con un grupo arilalcoxycarbonilo, en particular benciloxycarbonilo.

3. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde A representa un grupo $-C(O)-R_5$ en el que R_5 es un grupo 2,2-dimetil-1,3-dioxolano.

4. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, donde B representa un grupo acilo en el que el grupo alquilo es C₁-C₆, en particular acetilo, o un grupo alcoxicarbonilo en el que el grupo alquilo es C₁-C₆, en particular un grupo *terc*-butoxicarbonilo.
- 5 5. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** se selecciona entre los siguientes compuestos:
- 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-acetamido)propanoato de 7-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.a);
 - 10 - 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-acetamido)propanoato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.b);
 - 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-
 - 15 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.a);
 - 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.b).
- 20 6. Método para la preparación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
- protección de la función hidroxilo en la posición 3 del colesterol con un grupo protector,
 - 25 - introducción de una función cetona en la posición 7,
 - reducción de la función cetona en una función hidroxilo,
 - introducción de un grupo protector en la función hidroxilo en la posición 7, correspondiente al grupo B, y
 - 30 - desprotección de la función hidroxilo en la posición 3,
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que**, después de la desprotección, la función hidroxilo en la posición 3 puede estar sustituida con el grupo Adeseado.
- 35 8. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** dicho
- 40 compuesto de fórmula (I) se usa como el único principio activo, o junto con un agente anticanceroso.
10. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado por que** consiste en un liposoma o una solución de alcohol de al menos un compuesto de fórmula (I), en solitario o en una mezcla con otro principio activo.
- 45 11. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican células astrocíticas transformadas.
12. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso
- 50 en el tratamiento de glioblastoma multiforme.
13. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican células astrocíticas transformadas, siendo dicho tratamiento un tratamiento secuencial que comprende al menos una etapa de administración de un primer compuesto de fórmula (I),
- 55 y al menos una etapa de administración de un segundo compuesto de fórmula (I), diferente del primero.
14. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de glioblastoma multiforme, siendo dicho tratamiento un tratamiento secuencial que comprende al menos una etapa de administración de un primer compuesto de fórmula (I), y al menos una etapa de administración
- 60 de un segundo compuesto de fórmula (I), diferente del primero.

15. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado por que** dicho compuesto de fórmula (I) es 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-acetoxi-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-cidopenta[a]-fenantren-3-ilo (molécula 2.b).

16. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado por que** el primer compuesto de fórmula (I) es 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-acetamido)propanoato de 7-((*terc*-butoxicarbonil)oxil)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 1.a) y el segundo compuesto de fórmula (I) es 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de 7-((*terc*-butoxicarbonil)oxi)-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-cidopenta[a]fenantren-3-ilo (molécula 2.a).

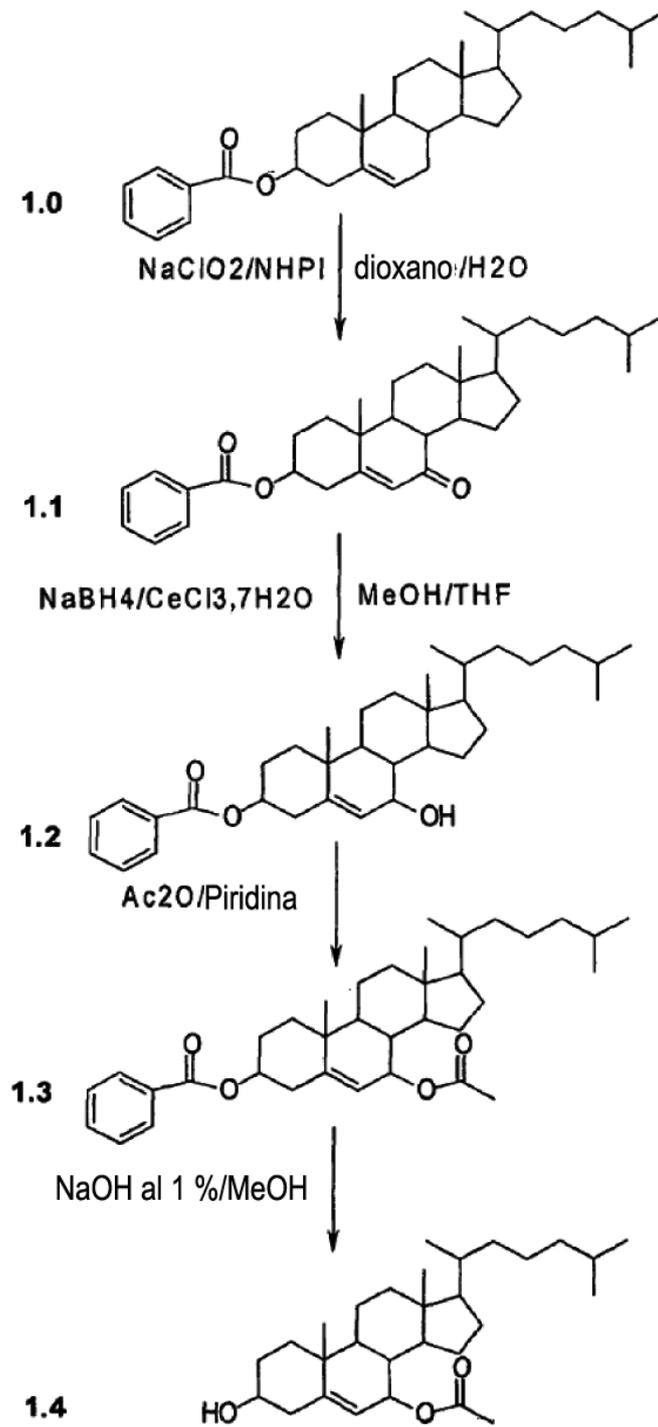


Fig. 1

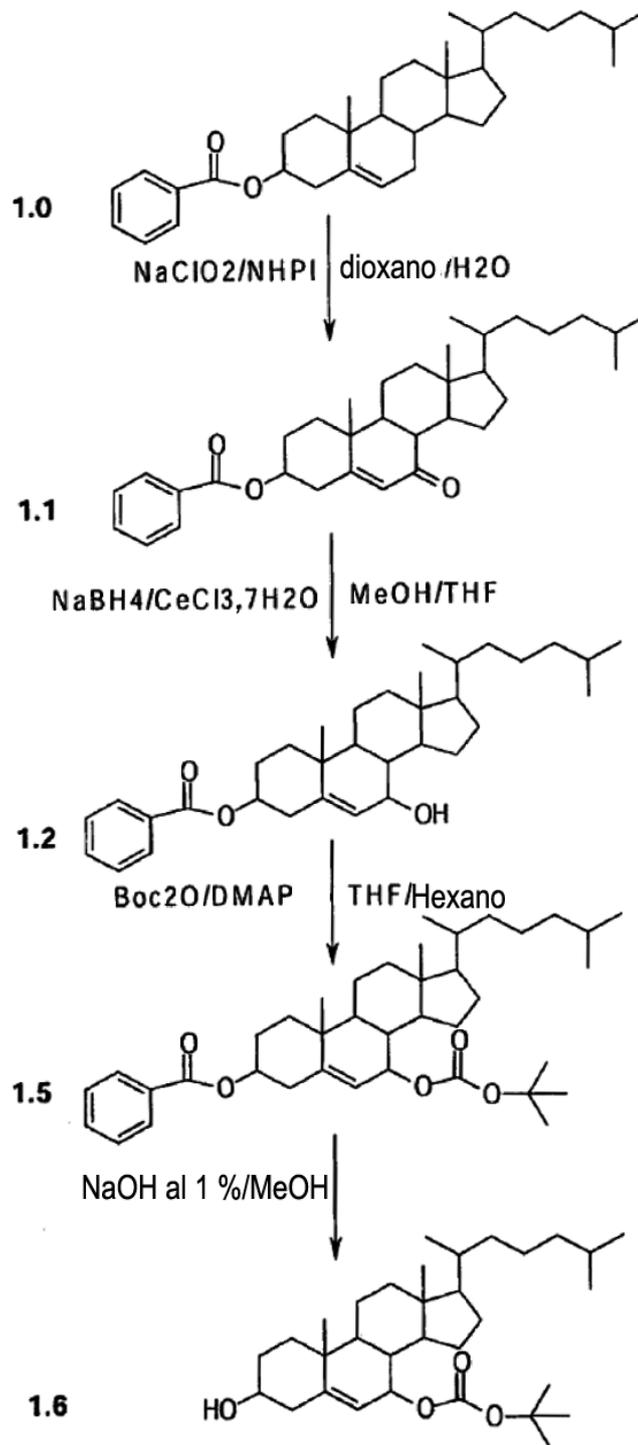


Fig. 2

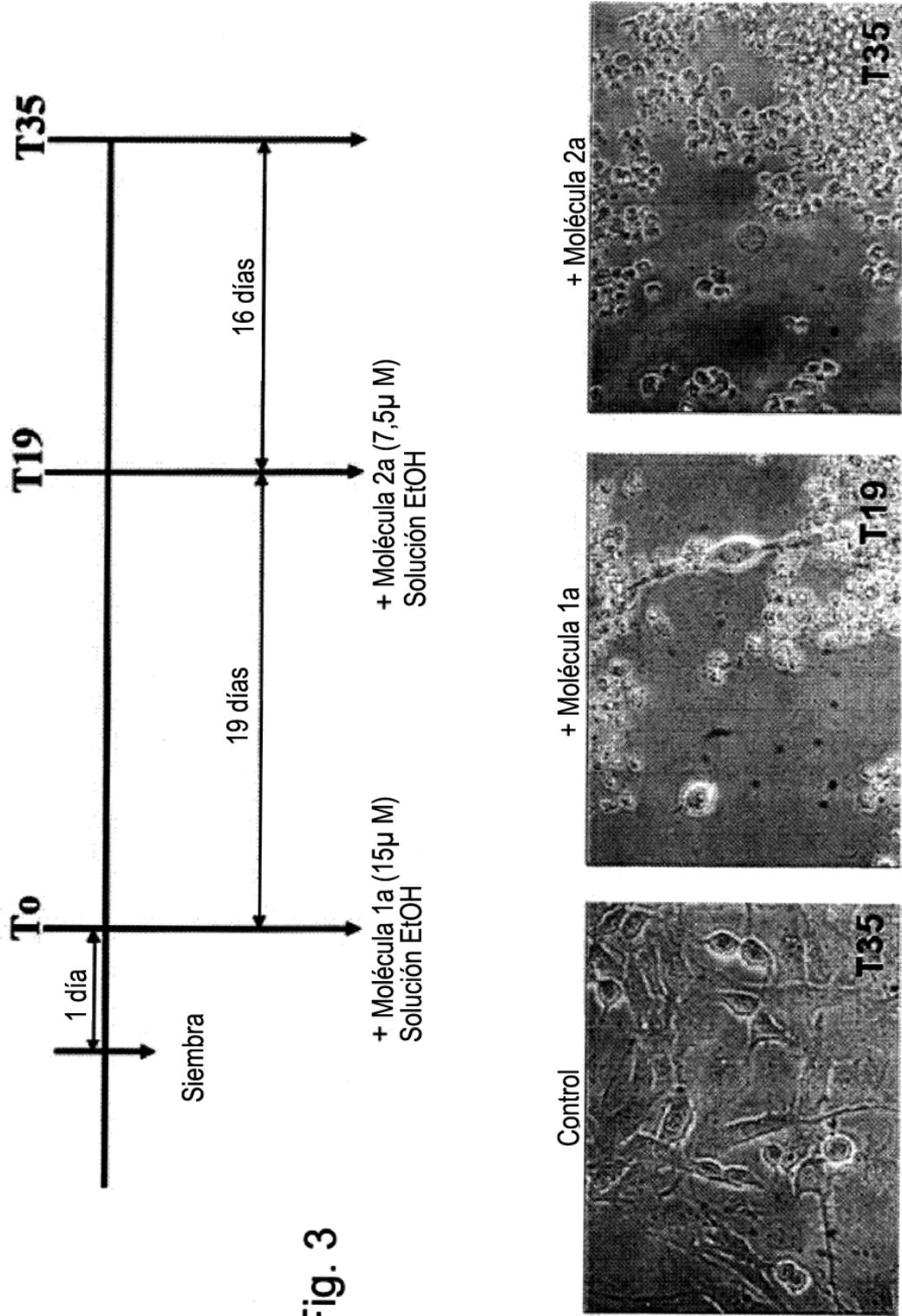


Fig. 3



Fig. 4

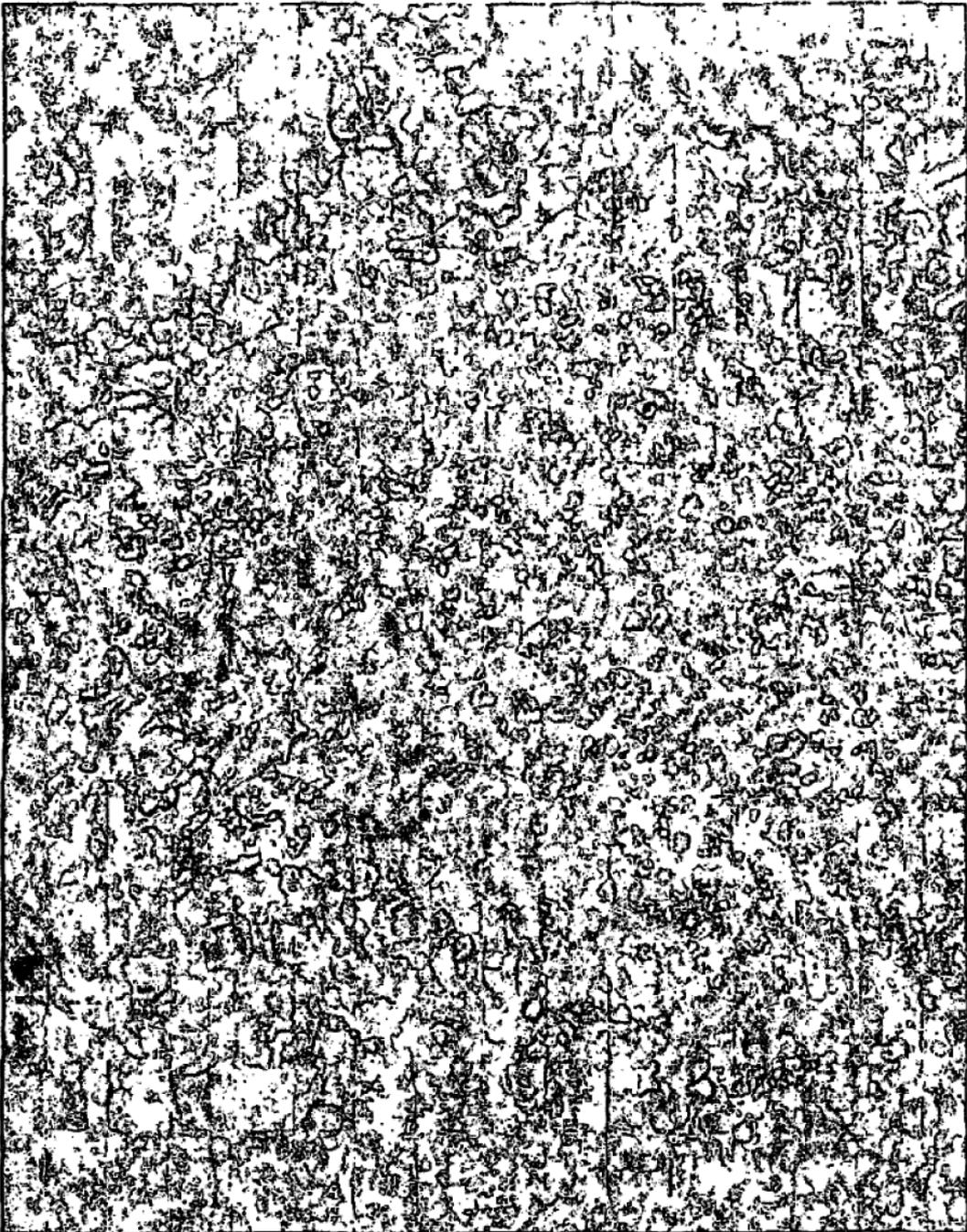


Fig. 5

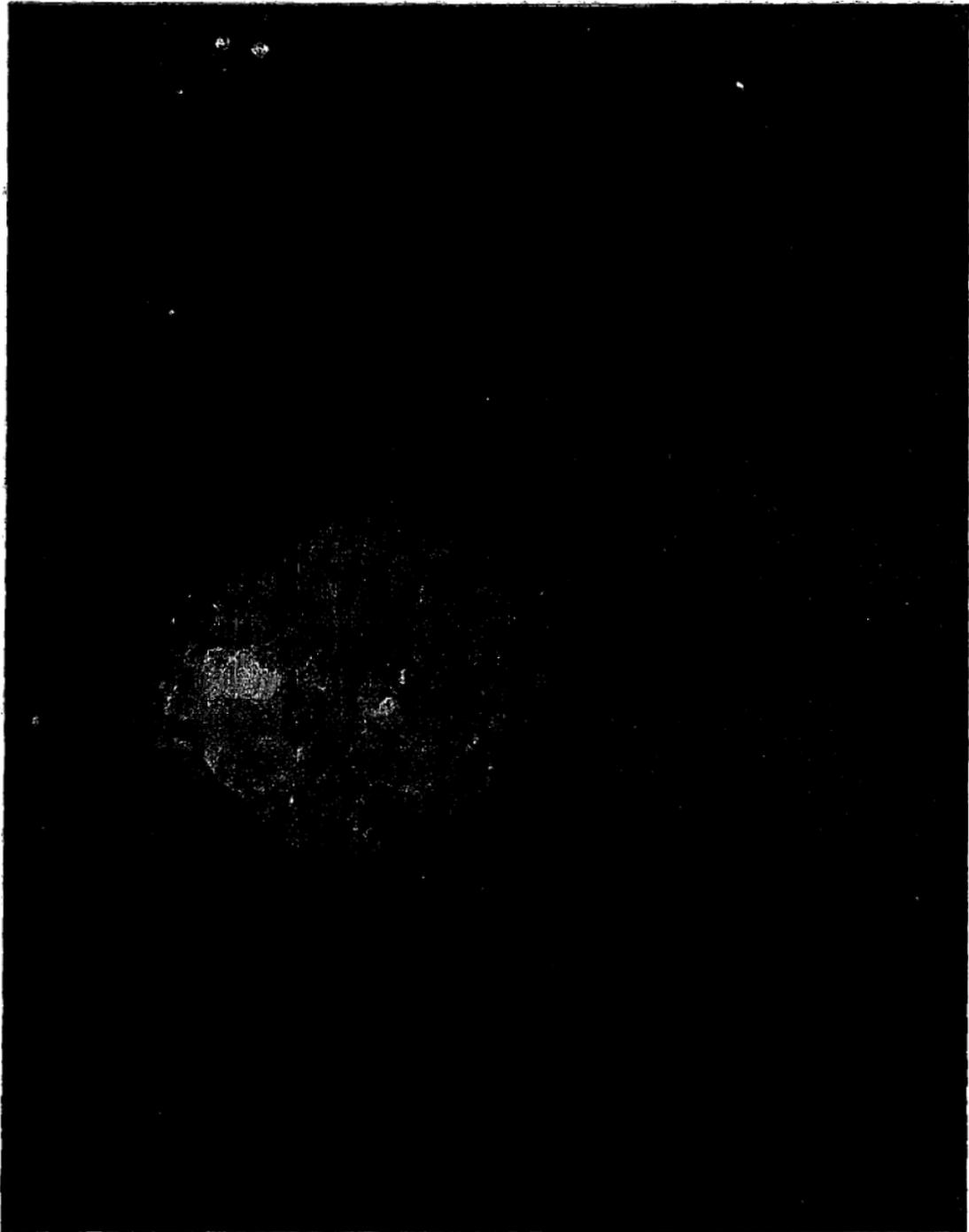


Fig. 6

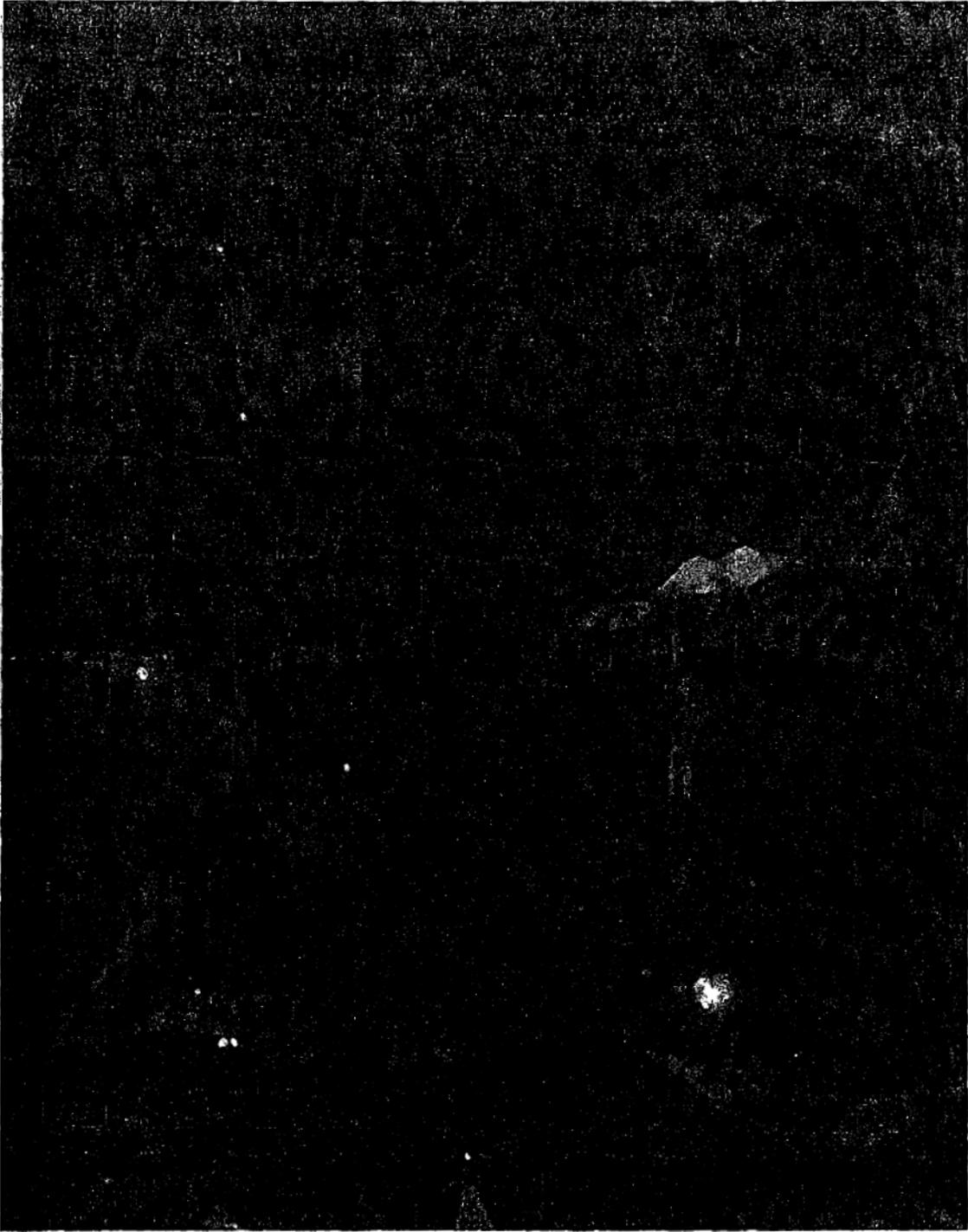


Fig. 7

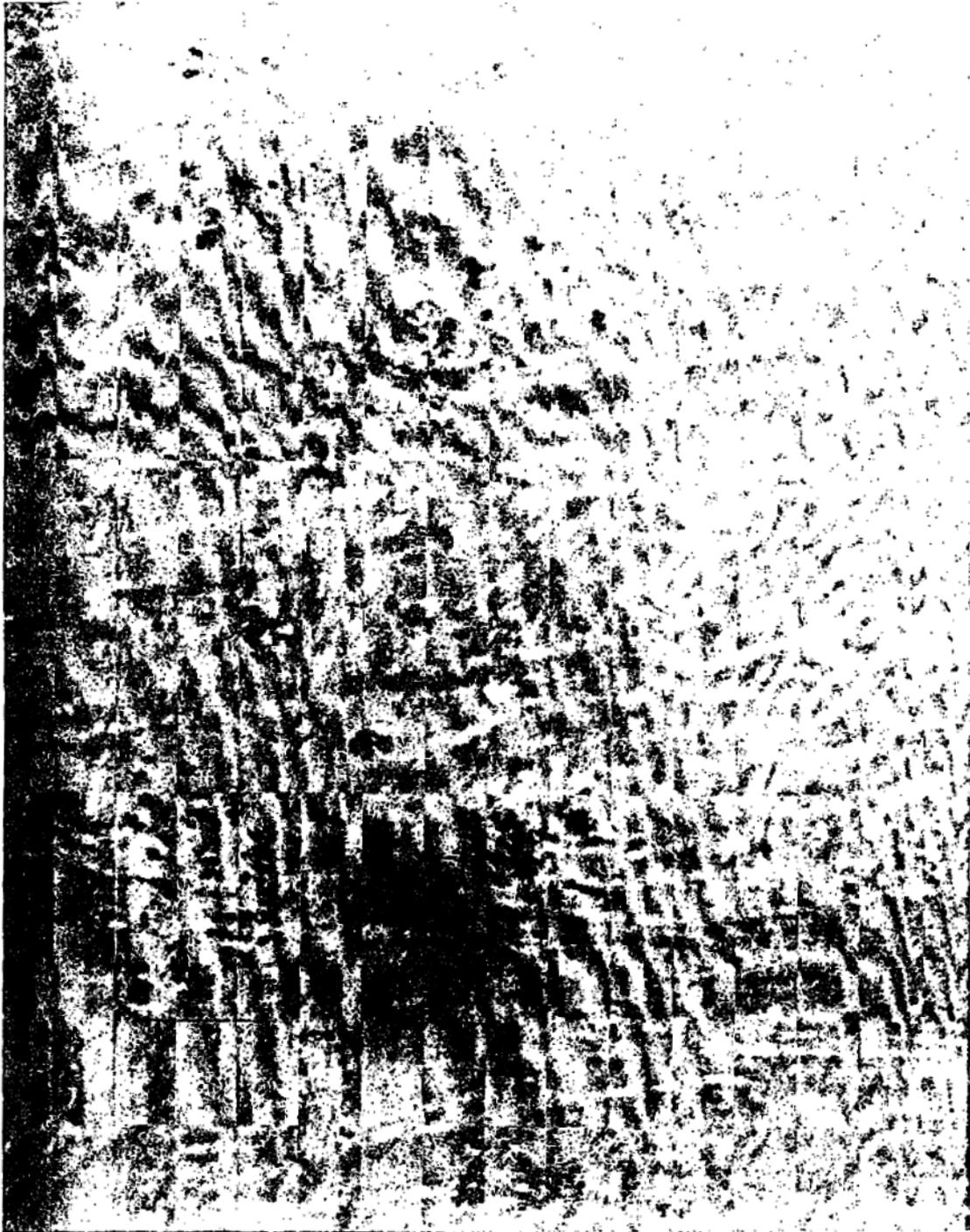


Fig. 8

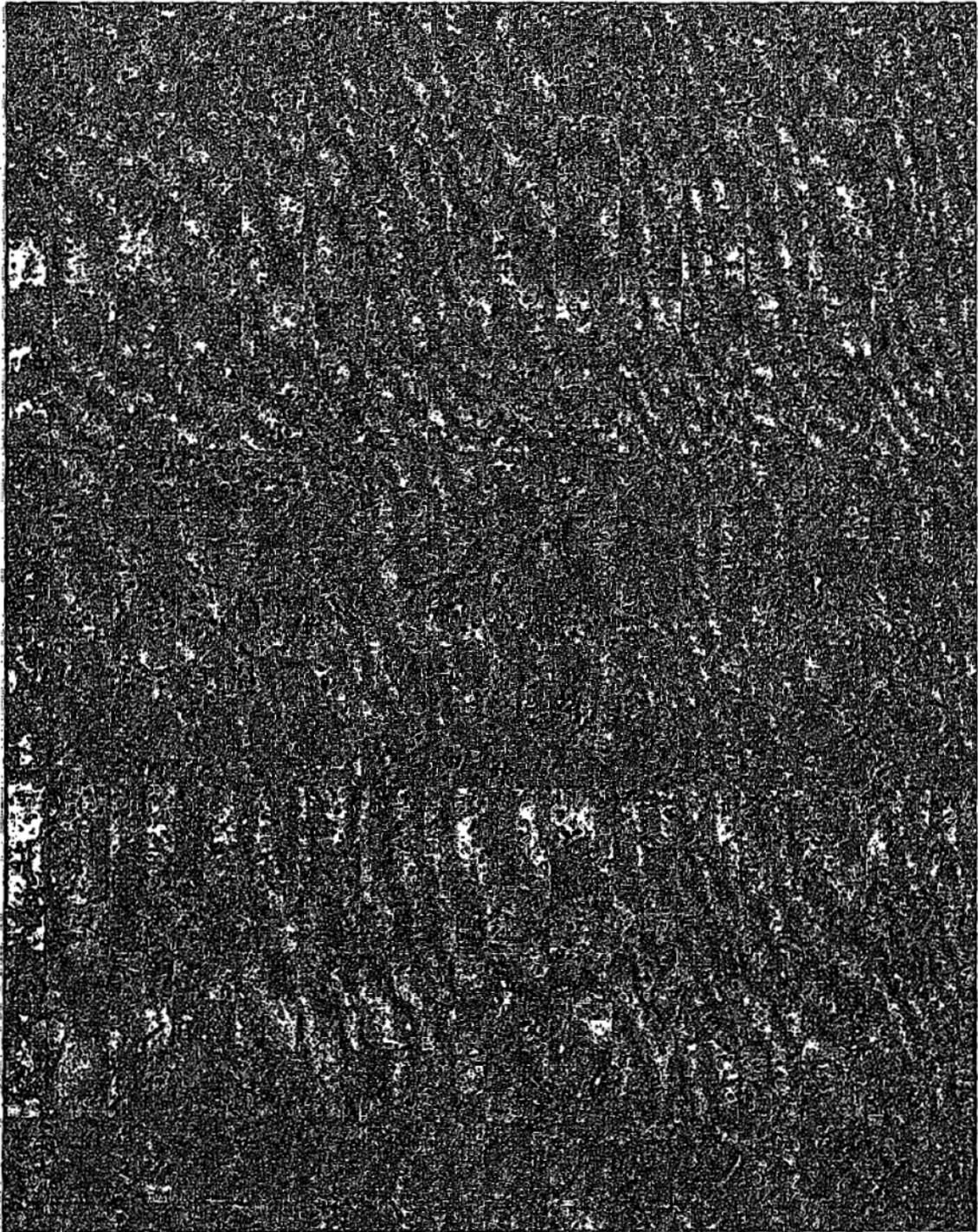


Fig. 9

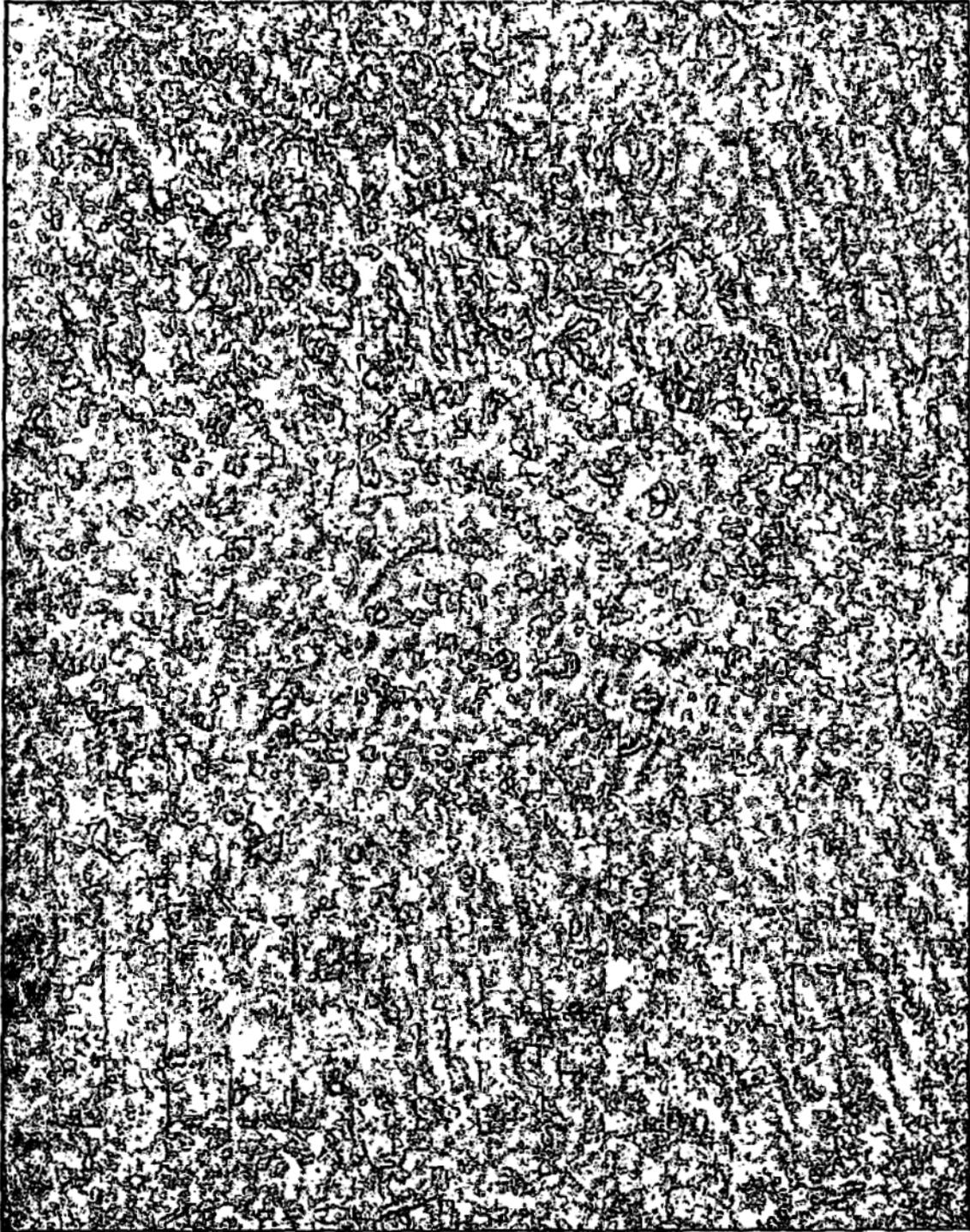


Fig. 10

