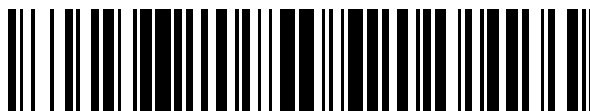


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 872**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/197** (2006.01)  
**A61P 31/16** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)  
**A61P 31/22** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07C 229/08** (2006.01)  
**C07C 229/14** (2006.01)  
**C07C 237/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012 E 12741829 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2674415**

54 Título: **Derivados homo- y hetero-poli aminoácidos de fullereno C60, método para la producción de los mismos, y composiciones farmacéuticas basadas en dichos derivados**

30 Prioridad:

**01.02.2011 RU 2011103574**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.09.2016**

73 Titular/es:

**RASNETSOV, LEV DAVIDOVICH (100.0%)  
ul. Gruzinskaya, 15-39  
Nizhny Novgorod 603000, RU**

72 Inventor/es:

**RASNETSOV, LEV DAVIDOVICH;  
SHVARTSMAN, IAKOV YUDELEVICH y  
SUVOROVA, OLGA NIKOLAEVNA**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 582 872 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

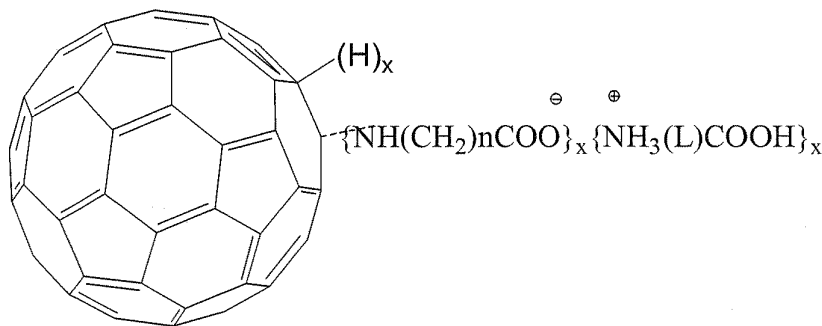
Derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno  $C_{60}$ , método para la producción de los mismos, y composiciones farmacéuticas basadas en dichos derivados

5

## Campo de la invención

[0001] Esta invención se refiere a la industria farmacéutica y a la medicina, concretamente a nuevos derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno  $C_{60}$  de fórmula (I), o también

10  $C_{60}(H)_x\{NH(CH_2)_nCOO-\}_x\{NH_3^+(L)COOH\}_x$ , denominada Fórmula (II), y a un método para la preparación de los mismos y para la preparación de composiciones farmacéuticas que los comprenden.



15 donde  $n = 2-5$ ,  $x = 3$ ,  $L = -(CH_2)_m$ , donde  $m = 2-5$  o  $-CO(CH_2)_kCH(NH_2)-$ , donde  $k = 1-2$ .

## Antecedentes de la invención

20 [0002] El uso médico de derivados del fullereno se basa en las propiedades lipófilas del núcleo del fullereno, que permite a los derivados del fullereno penetrar las membranas celulares, y en la capacidad de los fullerenos para generar oxígeno singlete de elevado rendimiento cuántico, el cual escinde el ADN. Estas propiedades confieren a los derivados del fullereno funcionales propiedades citotóxicas, antivirales y otras (véase Bedrov, D., Smith, G.D., Davande, H., "Passive transport of fullerenes through a lipid membrane," *J. Phys. Chem.*, B, 2008, Vol. 12., págs. 2078-84; Qiao, R., y Roberts A.E., "Translocation of fullerene and its derivatives across a lipid bilayer", *Nano Lett.*, 2007, Vol. 7, págs. 614-9; Nelsen, G.D., et al., "In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives", *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2008, Vol. 103, págs. 197-208; y la patente US 6204391, 2005, "Water soluble fullerenes with antiviral activity").

30 [0003] El principal problema que dificulta los estudios biológicos de derivados del fullereno y la creación de medicamentos basados en estos, radica en la insolubilidad en agua de los fullerenos, lo que dificulta su administración directa al cuerpo humano. Un posible modo de superar estas dificultades es embeber moléculas de fullereno en matrices solubilizantes. Se conocen métodos para preparar especies de fullereno solubles en agua mediante la formación de un aducto con polivinilpirrolidona (véase Kiselev, O.I., et al., *Mol. Materials*, 1998, Vol. 11, 35 pág. 121; Piotrovsky, L.B., et al., *Ibid.*, 2000, Vol. 13, pág. 41). Este aducto se demostró que era eficaz frente a los virus de la gripe A y B.

[0004] Además, se conoce un método para preparar fullerenos, que comprende mezclar fullerenos disueltos previamente en un disolvente orgánico con una matriz polimérica en cloroformo, concentrar la mezcla al vacío hasta 40 que se eliminan los disolventes por completo, y disolver el complejo resultante en un tampón de sal fosfato (pH 7,4-7,6), seguido de un tratamiento del producto con ultrasonidos (véase la patente RU 2162819, 2 de octubre de 2001). Las matrices poliméricas solubles en agua usadas de acuerdo con esta patente son cefalinas de la membrana. Los productos obtenidos como resultado de tales modificaciones son composiciones inestables con potenciales de almacenamiento limitados.

45

[0005] Se propone un método prometedor para la preparación de composiciones de fullereno solubles en agua mediante modificación química de la esfera del fullereno incorporando ligandos solubilizantes hidrófilos. La solicitud internacional WO2005/070827 muestra un conjunto de derivados aminoácidos del fullereno preparados mediante la reacción de cicloadición de restos aminoácidos al fullereno, y los productos de su inserción en sustratos orgánicos 50 biológicamente activos. Los métodos de síntesis divulgados en esa solución técnica son multietapas y difíciles de adaptar. Los compuestos resultantes tienen bajas solubilidades en agua.

[0006] Actualmente, se han preparado una amplia variedad de fullerenos funcionalizados en los que hay presentes restos hidrófilos en las cadenas laterales de ligandos unidos al fullereno (tipo de complejo detergente), así como

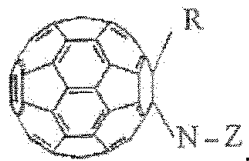
derivados esféricos en los que los grupos polares están distribuidos por toda la esfera del fullereno (este tipo incluye fullerenos y aductos amino).

**[0007]** Los derivados aminoácidos de fullerenos tienen el mayor potencial de uso.

5

**[0008]** Análogos de la presente invención son los compuestos y los métodos para producir los mismos que se describen en la solicitud internacional WO2009/00203 y aquellos descritos en la patente de la Federación Rusa n.º 2236852.

10 **[0009]** La solicitud internacional WO2009/00203 describía derivados aminoácidos polifuncionales de fórmula



15 donde R = H, mono- o di-hidroalquilo, haloalquilo, mono- o dinitroxialquilo, maleinimida; N-Z es un resto de un  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , u  $\omega$  aminoácido de fórmula general  $\text{-NH-C}_m\text{H}_{2m}\text{-COOM}$  o  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N-COOM}$ , donde  $m = 2-5$ , y M es un grupo nitroxialquilo, un grupo alquilo, o una sal de un metal alcalino, o un dipéptido. Estos compuestos se prepararon mediante la reacción de adición equimolar de un aminoácido al fullereno, seguida de la sustitución de un hidrógeno por un ligando orgánico biológicamente activo para formar el tipo de compuesto. Los compuestos resultantes tienen una actividad inhibitoria frente a tumores metastásicos, mejoran la actividad antileucémica de la ciclofosfamida, y

20 pueden ser adecuados como donores de monóxido de nitrógeno o como vasodilatadores de acción rápida para terapia antihipertensiva.

**[0010]** El mayor inconveniente de los compuestos de acuerdo con esa solicitud consiste en que son productos de adición covalente, contienen pequeñas cantidades de grupos polares, y tienen bajas solubilidades en agua.

25

**[0011]** El objeto más pertinente del estado de la técnica en el contexto de la esencia técnica y el resultado que se puede conseguir consiste en un agente para inhibir la reproducción de virus encapsulados y el método para preparar el mismo de acuerdo con la patente RU 2236852. Como resultado de hacer reaccionar un fullereno con una sal de aminoácido en un disolvente orgánico en presencia de un óxido de polialquileno, se prepararon aniones policarboxílicos de fullereno de fórmula general  $\text{C}_{60}\text{H}_n[\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{O}]_n$ , donde  $\text{C}_{60}$  es el núcleo de fullereno,  $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{O}^-$  es un anión aminocarboxílico;  $m$  es un número entero de 1 a 5, y  $n$  es un número entero de 2 a 12.

30

**[0012]** A fin de preparar estos compuestos, a una solución de fullereno en *o*-diclorobenceno (o tolueno u otro disolvente orgánico), se añade un aminoácido en forma de sal (sal de sodio o de potasio) y después se añade un agente solubilizante. El orden de adición del aminoácido y del agente solubilizante es irrelevante; estos se pueden añadir en forma de complejo mezclado previamente. Agentes solubilizantes útiles son diversos óxidos de polialquileno (polietilenglicoles con pesos moleculares de 150 a 400 o superiores a 400 (por ejemplo, el PEG-1500), así como un éster dimetílico de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 500. A fin de aumentar las velocidades de reacción se añade cualquier agente de reducción fuerte (un metal alcalino).

35

40

**[0013]** La proporción de fullereno con respecto al aminoácido se aumenta en más de 50 veces. La conversión de la sal farmacéuticamente aceptable deseada, especialmente una sal de sodio o de potasio, se efectuó mediante tratamiento del ácido con una base adecuada o mediante la adición de una sal de un ácido débil volátil. En particular, un ácido policarboxílico de fullereno insoluble en agua se convierte en una sal farmacéuticamente aceptable soluble en agua más preferente, por ejemplo, en una sal de sodio. La adición de una sal de un ácido débil volátil se efectúa mediante tratamiento de la solución con una sal de metal alcalino de un ácido débil volátil. Tras concentrar la solución mediante evaporación o liofilización, el ácido débil se elimina y se recuperan los ácidos policarboxílicos de fullereno en forma de sales de metales alcalinos del mismo. El producto deseado de la invención tiene una composición constante; el contenido de la sustancia principal en el producto deseado es de tan solo un

45

50 87,8 %. La descripción carece de los protocolos de diagramas de flujo para la determinación de las cantidades óptimas de los compuestos de partida, las proporciones de las cantidades de los disolventes usados y, lo que es más importante, la descripción de métodos para aislar los compuestos deseados.

**[0014]** Un importante inconveniente de los derivados aminoácidos de fullereno preparados mediante el método mostrado en la patente citada consiste en que se produce una mezcla de aniones carboxilato de fullereno en forma de especies tanto ácidas como de sal. No se puede preparar un componente individual mediante el método descrito en la citada patente. Además, los poli(aminoácidos) de fullereno preparados mediante este método del estado de la técnica en forma ácida son casi insolubles en agua. Los intentos por preparar una composición farmacéutica estable con aniones policarboxílicos de fullereno han fracasado, ya que los compuestos precipitan durante su

55

60 almacenamiento.

**[0015]** La necesidad de usar en la síntesis un gran exceso de sal de sodio o de potasio de los aminoácidos y un gran exceso de disolventes da lugar a problemas medioambientales en el reciclado de residuos, y aumenta el coste del proceso de producción. Por razones tecnológicas, no se pueden usar metales alcalinos para aumentar la velocidad de reacción cuando se usan disolventes aromáticos clorados.

5

**[0016]** Sin embargo, las únicas propiedades bioquímicas de los agentes que comprenden compuestos de fullereno con restos de aminoácidos descritos en la patente citada plantean el problema de preparar nuevos derivados de fullereno, desarrollando un proceso a gran escala que se pueda adaptar fácilmente para la producción de los mismos y que se distinga por su simplicidad y eficacia, ausencia de contaminantes, seguridad medioambiental, y disponibilidad de los reactantes de partida.

10

### Divulgación de la invención

**[0017]** Para resolver el problema anterior, los inventores proponen un grupo de invenciones que están unidas entre sí de modo que forman un único concepto inventivo, concretamente: derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno, un método para la preparación de derivados de fullereno, y composiciones farmacéuticas que comprenden derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno como principio activo. Variando las proporciones de los reactantes y los parámetros del proceso, se pueden preparar diferentes derivados de fullereno mediante el método reivindicado.

15

**[0018]** El problema citado anteriormente se resuelve por medio de los derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno de fórmula general (II):



20

donde  $n = 2-5$ ,  $x = 3$ ,  $L = -(CH_2)_m$ , donde  $m = 1-5$ , o  $CO(CH_2)_kCH(NH_2)-$ , donde  $k = 1-2$ .

**[0019]** Cuando  $m = n$ , se preparan derivados homo-poli(aminoácidos) de fullereno; Cuando  $m \neq n$ , se preparan derivados hetero-poli(aminoácidos) de fullereno;

25

**[0020]** El problema se resuelve mediante el método para la preparación de derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno, en el que estos derivados se producen haciendo reaccionar fullereno con un exceso de diez veces de sales potásicas anhidras de aminoácidos en un medio disolvente orgánico con la adición de un catalizador de transferencia de fase a la suspensión resultante y con agitación y calentamiento hasta una temperatura no superior a 60 °C hasta que la solución es completamente incolora y se forma un precipitado sólido, el cual se separa después y se disuelve de nuevo en agua, seguido del tratamiento de las soluciones acuosas de sales potásicas de poli(aminoácidos) de fullereno con una solución 1 N de un ácido orgánico o mineral en un disolvente polar. El método emplea sales potásicas anhidras de aminoácidos recién preparadas en un estado finamente disperso y la separación de un precipitado sólido de sales potásicas de poli(aminoácidos) de fullereno se efectúa mediante filtración, lavado con etanol y secado. A lo largo de los experimentos se ha descubierto que los poli(aminoácidos) de fullereno de la composición especificada solo se pueden preparar cuando se usan sales potásicas anhidras de aminoácidos recién preparadas. Catalizadores de transferencia de fase útiles son los ésteres metílicos de óxidos de polietileno que tienen pesos moleculares de 200, 400 o 500.

30

35

**[0021]** Otro modo de resolver el problema es diseñar composiciones farmacéuticas en las que los principios activos son los derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno de fórmula (II), que tienen actividad antiviral frente al virus del herpes, el virus de la hepatitis C, varios virus de la gripe y el VIH, y actividades antitumorales y antipsoriásicas. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en forma de comprimidos, cápsulas, pomadas, emulsiones, supositorios, soluciones o pulverizaciones.

40

**[0022]** Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la solución técnica reivindicada comprenden un compuesto de fórmula general (II) en una cantidad que es eficaz para alcanzar el resultado deseado, y se pueden administrar como formas farmacéuticas convencionales (por ejemplo, como formas farmacéuticas sólidas, semisólidas o líquidas), que comprenden un compuesto de la solución técnica reivindicada en forma de principio activo formulado con un vehículo o excipiente adecuado para ser administrado por vía intramuscular, intravenosa, oral, sublingual, inhalatoria, tópica, nasal, rectal, o vaginal. El principio activo se pueden formular en la composición junto con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales no tóxicos que son adecuados para la fabricación de soluciones, comprimidos, pastillas, cápsulas, perlas, supositorios, emulsiones, suspensiones, pomadas, geles y otras formas farmacéuticas.

45

**[0023]** La periodicidad y los niveles de administración de un fármaco particular para un paciente particular dependerán de muchos factores, que incluyen la actividad de un derivado de fullereno particular, la estabilidad metabólica y la duración de la acción del mismo; la velocidad de excreción; la edad, peso corporal, estado general de salud, y sexo del paciente; las combinaciones de fármacos; y la gravedad de la enfermedad en el sujeto que se va a tratar.

50

**[0024]** Para administración oral en forma de suspensiones, las composiciones se preparan de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica de preparación de formulaciones farmacéuticas, y pueden comprender celulosa microcristalina o derivados de la misma para proporcionar el peso deseado, ácido alginico o alginato sódico como agente de suspensión, metil celulosa como potenciador de la viscosidad, y agentes edulcorantes y/o aromas conocidos en la técnica. Cuando se fabrican en forma de comprimidos, estas composiciones pueden comprender celulosa microcristalina, fosfato cálcico, almidón, estearato de magnesio, y lactosa y/u otros excipientes, agentes aglutinantes, expansores, disgregantes, diluyentes y lubricantes conocidos en la técnica.

**[0025]** Cuando se pretende administrarlas en forma de aerosoles nasales o mediante inhalación, las composiciones se preparan mediante métodos bien conocidos en la técnica de las formulaciones farmacéuticas, y se pueden producir en forma de soluciones en suero salino fisiológico usando ácido benzoico u otro conservante adecuado, promotores de la adsorción para potenciar su aplicabilidad biológica y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

**[0026]** Se pueden preparar soluciones o suspensiones para inyección de acuerdo con métodos conocidos usando diluyentes o disolventes no tóxicos aplicables por vía parenteral tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, o soluciones de cloruro de sodio isotónicas; o agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados tales como aceites estables, suaves y estériles, que incluyen monoglicéridos o diglicéridos sintéticos, o ácidos grasos, que incluyen el ácido oleico.

**[0027]** Cuando se pretende administrarlas por vía rectal o vaginal en forma de supositorios, las composiciones se pueden preparar mezclando un fármaco con un excipiente no irritante, tal como manteca de cacao, ésteres de glicéridos sintéticos, o polietilenglicoles, que son sólidos a temperatura ambiente pero que se licúan o se disuelven en la cavidad corporal para liberar el fármaco.

**[0028]** Cuando se administran por vía tópica en forma de pomadas, geles, lociones, linimentos, etc., las composiciones se pueden preparar mezclando los principios activos con una base de pomada adecuada.

**[0029]** Bases de pomada útiles son bases hidrófilas, de grasa o vaselina, tales como vaselina, aceite mineral, parafina, cera de abeja, lanolina, polietilenglicol, y otros.

**[0030]** Bases de geles útiles son metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, oxipropil celulosa, polietilenglicol u óxido de polietileno, carbopol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, etc.

**[0031]** El resultado técnico de la invención consiste en lo siguiente: se han preparado nuevos derivados homo- y hetero-poli(aminoácido) de fullereno de fórmula  $C_{60}(H)_x\{NH(CH_2)_nCOO^-\}_x\{NH_3^+(L)COOH\}_x$ , donde  $n = 2-5$ ,  $x = 3$ ,  $L = -(CH_2)_m$ , donde  $m = 1-5$ , o  $CO(CH_2)_kCH(NH_2)-$ , donde  $k = 1-2$ , caracterizados por que los compuestos comprenden grupos aminoácidos unidos covalentemente y formas iónicas polares de aminoácidos; se ha desarrollado un nuevo método a gran escala para producir derivados aminoácidos de fullereno  $C_{60}$  con diversas proporciones de componentes, usando la reacción de adición nucleófila del aminoácido al fullereno para formar productos de poliadición. Se reivindican composiciones farmacéuticas en las que el principio activo son derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno de fórmula (II), teniendo estos derivados una actividad viral frente al virus del herpes, el virus de la hepatitis C, varios virus de la gripe y el VIH, y actividades antitumorales y antipsoriásicas. Las composiciones farmacéuticas se encuentran en forma de comprimidos, cápsulas, pomadas, supositorios, soluciones y pulverizaciones.

**[0032]** Los compuestos tienen las propiedades nuevas siguientes:

- solubilidad en mezclas de dimetilsulfóxido-agua (1:100 o 1:200);
- alta biodisponibilidad;
- alta eficacia en influir en las células infectadas; y
- baja toxicidad.

**[0033]** El método reivindicado proporciona la preparación de diversos derivados homo- y hetero-poli(aminoácido) de fullereno dependiendo de la proporción de los reactantes y de los parámetros del proceso. La idea subyacente del método consiste en que usa, en la etapa de síntesis, proporciones óptimas de los reactantes (1:10) y cantidades mínimas de un disolvente orgánico y un catalizador de transferencia de fase, seguida de la recuperación de una composición reivindicada usando soluciones concentradas de ácidos orgánicos o minerales, seguida después de la adición de aminoácidos de las series  $NH_2LCOOH$ , donde  $L = -(CH_2)_m$ , o  $-CO(CH_2)_kCH(NH_2)$ , proporcionando así la producción cuantitativa de composiciones de aminoácidos de fullereno a medida y haciendo el método reivindicado adecuado para la síntesis a gran escala, eficaz y ambientalmente segura, de estas composiciones.

**[0034]** La invención reivindicada se ilustrará por medio de ejemplos, que siguen a continuación.

**[0035]** Realizaciones diferentes de la invención

**[0036]** Ejemplo 1. Preparación de poli(ácido aminocaproico) de fullereno de fórmula  $C_{60}(H_3)\{NH(CH_2)_5COO-\}_3\{NH_3^+(CH_2)_5COOH\}_3$ .

5 **[0037]** A una solución de 7,2 g (0,01 mol) de fullereno  $C_{60}$  en 400 ml de o-diclorobenceno, se añaden 17 g (0,1 mol) de una sal potásica anhidra de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico finamente dividida y recién preparada. A la suspensión resultante se añade, durante 2 h y con agitación y calentamiento hasta una temperatura no superior a 80 °C, una mezcla de o-diclorobenceno y éter metílico de polietilenglicol 400 en una proporción de 2,5:1. La mezcla de reacción se agita a una temperatura no superior a 60 °C durante 2-3 h hasta que la solución es completamente incolora y se  
10 forma un precipitado sólido. Después de esto, la mezcla se filtra; el precipitado se lava en el filtro con diversas porciones de etanol y se seca al vacío a una temperatura no superior a 60 °C. La sal potásica de aminoácido de fullereno aislada se disuelve en 2 l de agua destilada. A esta solución se añade ácido clorhídrico 1 N lentamente y con agitación hasta que el pH llega a 5,1. La mezcla se deja reposar hasta que el producto precipita por completo. A continuación la capa acuosa se decanta. Al precipitado, que es una suspensión fina de un producto sólido en agua,  
15 se añade una solución de ácido aminocaproico en una mezcla de dimetilsulfóxido/agua (1:10) lentamente y con agitación. La mezcla se agita hasta su completa disolución. Después se eliminan los disolventes mediante destilación al vacío. Se seca un residuo sólido a una temperatura no superior a 60 °C en un secador de vacío.

**[0038]** El rendimiento de producto deseado es cuantitativo con respecto al fullereno inicial. El compuesto es un  
20 sólido marrón oscuro que es soluble en dimetilsulfóxido/agua (1:200) y parcialmente soluble en  $CH_3CN:H_2O$  (1:1) y DMF- $H_2O$ .

**[0039]** El análisis termogravimétrico del producto muestra que el complejo contiene tres moles de ácido aminocaproico unidos débilmente, que se escinden con descomposición a 200 °C. La descomposición térmica del  
25 poli(aminoácido) de fullereno se produce a 345 °C con liberación del fullereno y sus productos de oxidación. La cantidad del residuo sólido tras la descomposición del compuesto, que representa fullereno sin sustituir, tal y como se demuestra por difracción de rayos X, corresponde a la proporción  $C_{60}$ :residuo aminoácido de 1:6.

**[0040]** La hidrólisis ácida del compuesto con una solución de HCl 0,1 M lleva a la liberación del clorhidrato del ácido aminocaproico en una cantidad de 3 moles por mol de sustancia inicial.  
30

**[0041]** La adsorción del compuesto sobre gel de sílice provoca la ruptura de los enlaces iónicos y la liberación del ácido aminocaproico libre. El número de grupos aminoácidos unidos iónicamente se determina en un análisis  
35 fotométrico posterior de los productos de reacción de ácido aminocaproico con ninhidrina. Su número se corresponde con las composiciones de los compuestos reivindicados.

**[0042]** El espectro de absorbancia electrónica del producto no tiene bandas de absorción de fullereno libre.

**[0043]** El espectro de IR del producto presenta bandas de absorción características de aminoácidos N-sustituídos:  
40 para el grupo  $-COOH-$ , a  $1704\text{ cm}^{-1}$  y  $1658\text{ cm}^{-1}$ ; para los grupos  $NH_3^+$ , a  $3100$ ,  $2550$ , y  $2000\text{ cm}^{-1}$ ; para las vibraciones de tensión  $-N-H-$ , a  $3300\text{ cm}^{-1}$ ; para las vibraciones de flexión  $N-H-$ , a  $1552\text{ cm}^{-1}$ ; para el  $C_{60}-NH-R-$ , las bandas de absorción aparecen a  $1104\text{ cm}^{-1}$ ,  $930\text{ cm}^{-1}$ , y  $830\text{ cm}^{-1}$ .

**[0044]** El análisis elemental muestra las siguientes proporciones de elementos en el producto: % C = 76,84; % H =  
45 4,80; % N = 5,15; para la fórmula empírica  $C_{96}H_{75}N_6O_{12}$  (Peso molecular: 1503), calculado: % C = 76,49; % H = 4,90; % N = 5,57.

**[0045]** Ejemplo 2. Preparación de ácido  $\gamma$ -aminobutírico de N-fullereno con  $\beta$ -alanina de fórmula  $C_{60}(H_3)\{NH(CH_2)_3COO-\}_3\{NH_3^+CH_2-CH_2-COOH\}_3$ .

50 **[0046]** A una solución de 7,2 g (0,01 mol) de fullereno  $C_{60}$  en 400 ml de o-diclorobenceno, se añaden 14 g (0,1 mol) de una sal potásica anhidra de ácido  $\gamma$ -aminobutírico recién preparada. A la suspensión resultante se añade, durante 2 h y con agitación y calentamiento hasta una temperatura no superior a 60 °C, una mezcla de o-diclorobenceno y éter metílico de polietilenglicol 400 en una proporción de 3:1. La mezcla de reacción se agita a una temperatura no  
55 superior a 60 °C durante 2-3 h hasta que la solución es completamente incolora y se forma un precipitado sólido. Después de esto, la mezcla se filtra; el precipitado se lava en el filtro con diversas porciones de etanol y se seca al vacío a una temperatura no superior a 60 °C. El producto aislado se disuelve en agua destilada. A esta solución se añade ácido clorhídrico 1 N lentamente y con agitación hasta que el pH llega a 5,1. La mezcla se deja reposar hasta que el producto precipita por completo. A continuación la capa acuosa se decanta. Al precipitado, que es una  
60 suspensión fina de un producto sólido en agua, se añade una solución etanólica de 2,7 g (0,03 mol) de  $\beta$ -alanina lentamente y con agitación. La mezcla se agita durante 2 horas hasta que el precipitado se disuelve por completo. Tras la eliminación del disolvente, se aísla el producto (12 g).

**[0047]** El compuesto es un sólido marrón oscuro que es soluble en dimetilsulfóxido/agua (1:200) y parcialmente  
soluble en mezclas  $CH_3CN:H_2O$  (1:1) y DMF- $H_2O$ .

- [0048]** El análisis termogravimétrico del producto muestra que el complejo contiene tres moles de  $\beta$ -alanina unidos débilmente, que se escinden con descomposición a 210 °C. La descomposición térmica de todo el complejo se produce a 335 °C con la liberación del fullereno en una cantidad que corresponde a la proporción C<sub>60</sub>:residuo aminoácido de 1:6.
- [0049]** La hidrólisis ácida del compuesto resultante con una solución de HCl 0,01 M lleva a la liberación del clorhidrato de  $\beta$ -alanina en una cantidad de 3 moles por mol de sustancia inicial.
- 10 **[0050]** Los espectros del producto registrados en soluciones de dimetilsulfóxido y en NaOH 0,1 N acuoso presentan bandas de absorción en la región de 217, 260, and 335 nm, que son características de derivados del fullereno, y no presentan bandas de absorción de fullereno libre.
- [0051]** El espectro de IR del compuesto presenta bandas de absorción características de aminoácidos N-sustituídos y de las formas catiónicas de aminoácidos: para el grupo -COOH-, a 1717 cm<sup>-1</sup>, 1710 cm<sup>-1</sup>, y 1658 cm<sup>-1</sup>; para el grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, a 3100, 2550, y 2000 cm<sup>-1</sup>; las vibraciones de tensión N-H aparecen a 3400 cm<sup>-1</sup>; las vibraciones de tensión N-H aparecen a 3400 cm<sup>-1</sup>; las vibraciones de flexión N-H aparecen a 1552 cm<sup>-1</sup>; y para el C<sub>60</sub>-NH-R-, las bandas de absorción aparecen a 1104 cm<sup>-1</sup>, 930 cm<sup>-1</sup>, y 830 cm<sup>-1</sup>.
- 15
- 20 **[0052]** El análisis elemental muestra las siguientes proporciones de elementos en el producto: % C = 75,24; % H = 3,80; % N = 6,25; para la fórmula empírica C<sub>81</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> (Peso molecular de 1296), análisis calculado: % C = 75,00, % H = 3,70, % N = 6,48.
- [0053]** Ejemplo 3. Preparación de ácido  $\epsilon$ -aminocaproico de N-fullereno con glutamina de fórmula C<sub>60</sub>(H<sub>3</sub>)  
25 {NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COO<sup>-</sup>}<sub>3</sub>{NH<sup>3+</sup>CO}(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH<sub>3</sub>.
- [0054]** El proceso se llevó a cabo del mismo modo que en el ejemplo 1. La única diferencia consiste en lo siguiente: en la etapa de tratamiento del precipitado después de que la forma ácida de fullereno-ácido aminocaproico haya precipitado, se añade una solución de 4,5 g de glutamina en dimetilsulfóxido-agua. Los disolventes se eliminan mediante destilación al vacío.
- 30
- [0055]** El análisis elemental muestra las siguientes proporciones de elementos en el producto: % C = 71,34; % H = 4,80; % N = 8,25; para la fórmula empírica C<sub>93</sub>H<sub>69</sub>N<sub>9</sub>O<sub>15</sub> (Peso molecular: 1551), calculado: % C = 71,95, % H = 4,50, % N = 8,12.
- 35
- [0056]** El espectro de IR del producto presenta bandas de absorción características de aminoácidos N-sustituídos y de las formas catiónicas de aminoácidos: para el grupo -COOH-, a 1714 cm<sup>-1</sup> y 1707 cm<sup>-1</sup>; para -C=O(NH-C<sub>60</sub>), a 1658 cm<sup>-1</sup>; para el grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, a 3000, 2550, y 2000 cm<sup>-1</sup>; las vibraciones de tensión N-H aparecen a 3400 cm<sup>-1</sup>; las vibraciones de flexión N-H aparecen a 1552 cm<sup>-1</sup>; y las bandas de absorción de C<sub>60</sub>-NH-R-, a 1104 cm<sup>-1</sup>, 930 cm<sup>-1</sup>, y 830 cm<sup>-1</sup>.
- 40
- [0057]** La hidrólisis ácida del compuesto lleva a la liberación del clorhidrato de glutamina en una cantidad de 3 moles por mol de sustancia inicial.
- 45 **[0058]** Se estudió la actividad antiviral de los compuestos frente al VIH, al VHS y al virus de la gripe; y se estudió también su actividad antitumoral. En los ejemplos que siguen, el agente preparado mediante el método descrito en el ejemplo 1 se denominará en este texto agente 1 (poli(ácido aminocaproico) de fullereno).
- [0059]** Ejemplo 4. Estudios de actividad anti-VIH del agente fullereno-poli(ácido aminocaproico).
- 50
- [0060]** Estos estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Virus de la Inmunodeficiencia con el Centro de Ensayos sobre Evaluación Experta de Agentes Antivirales y Desinfectantes (Instituto Ivanovski de Investigación sobre Virología, Academia Rusa de Ciencias Médicas).
- 55 **[0061]** Se añadieron células con la formulación de ensayo y se infectaron con el virus en una dosis de 0,01 TCD<sub>50</sub>/pocillo. Los cultivos de células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y un 98 % de humedad durante un periodo de 4 a 5 días. Los resultados se determinaron tiñendo las células con un colorante y mediante microscopía óptica: estudios del efecto citopático (ECP) del virus y formación de un sincitio inducido por virus (el sincitio es un conglomerado de varias células que tienen una membrana celular que las envuelve a todas formada mediante la fusión de las membranas).
- 60
- [0062]** El grado de destrucción celular se evaluó bajo el microscopio de acuerdo con el sistema de cuatro signos "más" normalmente aceptado usando los símbolos "+" y "-" dependiendo del número de células muertas en cada uno de los cuatro pocillos correspondientes a un parámetro de ensayo.
- 65

++++ significa el 100 % de mortalidad de las células en los cuatro pocillos usados en un ensayo de dilución simple;

+++ significa el 75 % de mortalidad de las células en los cuatro pocillos;

++ significa el 50 % de mortalidad de las células en cada uno de los cuatro pocillos;

5 + significa el 25 % de mortalidad de las células en cada uno de los cuatro pocillos;

+ - significa el inicio de la degeneración; y

- significa la ausencia de destrucción celular.

10 **[0063]** Los resultados de estos estudios se muestran en las Tablas 1 y 2.

**[0064]** Estos resultados (véanse las Tablas 1 y 2) muestran que las muestras de poli(aminoácidos) de fullereno estudiadas tienen actividad antiviral frente al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. La  $CE_{50}$  (concentración eficaz en un 50 %) de la muestra es 0,9 mcg/ml. En concentraciones de 0,5 a 10 mcg/ml, el agente no tiene efecto citotóxico sobre las células.

15 **[0065]** Ejemplo 5. Estudios experimentales *in vitro* de la actividad antiherpética del agente poli(ácido aminocaproico) de fullereno. Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto Ivanovski de Investigación sobre Virología, Academia Rusa de Ciencias Médicas, Moscú.

20 **[0066]** El objeto de estudio fue la actividad citotóxica y antiherpética del agente en cultivos de células Vero.

**[0067]** En el estudio se usaron: un cultivo de células de riñón de mono trasplantables (VERO), adquirido en la Colección de Cultivos de Tejidos del Instituto Ivanovski de Investigación sobre Virología, Academia Rusa de Ciencias Médicas; y el virus del herpes simple, tipo 1, cepa Lg propagada en células Vero. Las células se infectaron con el virus en una dosis de 100  $TCD_{50}/0,2$  ml y de 1000  $TCD_{50}/0,2$  ml.

**[0068]** La muestra de ensayo de la sustancia usada era un polvo de color oscuro.

30 **[0069]** La muestra de ensayo se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) en la proporción 1:20, y después se prepararon concentraciones de trabajo en medio IGLA MEM. Las actividades de las muestras de ensayo se evaluaron como el grado de protección de las células frente al efecto citotóxico inducido por virus del VHS usando un método microscópico y el ensayo MTT como densidad óptica.

35 **[0070]** Resultados de los estudios. Se estudiaron la toxicidad de las sustancias en las concentraciones usadas y la toxicidad del disolvente (1,5 ml DMSO en 50 ml de agua).

**[0071]** El agente con concentraciones finales de 50 a 1000 mcg/ml se añadió a un cultivo monocapa de células VERO y estas se incubaron en atmósfera de  $CO_2$  al 5,0 % a 37 °C durante un periodo de 24 a 48 horas. La monocapa de células se tiñó con solución de azul tripán al 0,4 % y se observó al microscopio.

40 **[0072]** La muestra no causó un efecto tóxico sobre el cultivo de células VERO cuando se usó en concentraciones de hasta 100 mcg/ml; cuando la concentración era de 200 mcg/ml, aparecieron signos del efecto tóxico: la tasa de mortalidad celular era del 25 %. Concentraciones de 500  $\mu$ g/ml o superiores eran tóxicas para las células Vero (Tabla 3).

45 **[0073]** Las propiedades protectoras de la muestra se estudiaron en un esquema de administración, concretamente una hora antes de la infección y con dos dosis de virus 100 ( $TCD_{50}$  y 1000  $TCD_{50}$ ).

50 **[0074]** Los resultados se muestran en las Tablas 3 a 7. Los estudios anteriormente descritos muestran que la administración del agente 60 minutos antes de infectar un cultivo celular con el virus del herpes simple a una dosis de 100  $TCD_{50}$  protege totalmente a las células del efecto destructivo celular del virus para todas las concentraciones ensayadas, que eran de 5,0 mcg/ml y superiores (véanse las Tablas 4 y 5).

55 **[0075]** Cuando se aumentó la dosis de virus del herpes a 1000  $TCD_{50}/0,2$  ml (véanse las Tablas 6 y 7), la muestra de agente proporciona la protección completa a un cultivo celular sensible del efecto destructivo celular del virus en el esquema de ensayo seleccionado (en el que las células son infectadas con el virus 60 minutos después de añadir el agente al medio de cultivo).

60 **[0076]** Ejemplo 6. Estudios de actividad antiviral del poli(ácido aminocaproico) de fullereno (agente n.º 1) frente al virus de la gripe A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1.

**[0077]** Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto Ivanovski de Investigación sobre Virología, Academia Rusa de Ciencias Médicas, Moscú. El objetivo era estudiar la actividad antiviral de estos agentes en un cultivo de células MDCK frente al virus de la gripe A/IIV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1.

65



**[0078]** El agente se diluyó con DMSO (5 mg de sustancia + 0,5 ml DMSO), seguido de la adición de 4,5 ml de medio de cultivo celular MEM para obtener de este modo una solución madre con una concentración de 1,0 Mr/ml. Seguidamente, las soluciones madre se diluyeron con el medio MEM para obtener las siguientes series de concentraciones de trabajo: 6,5 mcg/ml - 12,5 - 25,0 - 50,0 - 100 mcg/ml.

5

**[0079]** La actividad antiviral se evaluó a partir de la disminución de la reproducción del virus de la gripe en el cultivo de células MDCK, determinada mediante un análisis ELISA.

**[0080]** Para este fin, se hicieron crecer células MDCK sobre placas de 96 pocillos para obtener una monocapa completa, se lavaron del medio de crecimiento, y se añadieron con sustancias en una concentración del doble en 100 mcl de medio MEM. La infección con el virus en una dosis de trabajo que variaba entre 100 y 1000 TCD<sub>50</sub> se llevó a cabo en dos protocolos: 2 horas después de la adición de las sustancias y simultáneamente. Las placas se incubaron en un termostato con atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación, el medio se retiró y las células se fijaron con acetona al 80 % en PBS durante 15 minutos y después se secaron bien, y se efectuó un análisis ELISA mediante la adsorción consecutiva de reactivos específicos, concretamente anticuerpos monoclonales, conjugado y sustrato (orto-fenilendiamina). El grado de reacción se controló mediante la medición de la densidad óptica a 492 nm en un espectrofotómetro Biokom. Cada dilución de virus se estudió por triplicado, para los cuales se calculó un valor de densidad óptica (DO) promedio. El porcentaje de inhibición se determinó como el cociente de la diferencia entre la DO experimental y la DO del control celular, dividida por la diferencia entre la DO del control del virus y las DO del control celular, multiplicada por 100 %. Los datos obtenidos de este modo se usaron para determinar la concentración mínima del agente que provoca una inhibición del 50,0 % de la reproducción viral (MIC<sub>50</sub>).

**[0081]** La inhibición de la replicación del virus de la gripe A(H1N1) se evaluó en tres experimentos con diferentes multiplicidades de infección. Los resultados se muestran en la Tabla 8 (como protocolos de los tres experimentos) y en la Tabla 9 (como resultados promedio de los tres experimentos).

**[0082]** En la Tabla 9 se puede observar que hay un caso claro de correlación entre el grado de reproducción y la concentración del agente: a medida que aumenta la concentración, la reproducción del virus disminuye. Además, no hay una diferencia detectable en los valores independientemente del protocolo de infección (2 horas después de la adición del agente o simultáneamente).

**[0083]** Por tanto, los resultados de actividad obtenidos para diferentes diluciones del agente frente al virus de la gripe A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1 demuestran una gran actividad inhibidora de la reproducción en el cultivo de células MDCK. El protocolo de adición del agente (2 horas antes de la infección o simultáneamente a la infección) no influye en la actividad del agente en el cultivo de células MDCK.

**[0084]** Ejemplo n.º 7 Estudios de actividad antiviral del poli(ácido aminocaproico) de fullereno (agente n.º 1) frente a la neumonía gripal inducida en ratones.

40

**[0085]** Estos estudios se llevaron a cabo en el Centro de Química Médica (TsKhLS-VNIKhFI), Moscú.

**[0086]** El agente usado en los estudios estaba en forma de un polvo cristalino marrón oscuro. Las dosis del agente requeridas para administración oral se prepararon disolviendo porciones previamente pesadas en una solución de almidón al 1 % hervido en agua. Para administración intraperitoneal o intramuscular, se disolvieron porciones previamente pesadas del agente en una solución de DMSO al 1,5 %.

**[0087]** El virus usado era el virus de la gripe A/Aichi/2/69 (H3N2) adaptado a ratón. Este virus se usa ampliamente para determinar la eficacia de los agentes antivirales en neumonía gripal inducida en ratones y se adquirió en el Museo de Cepas Virales y Cultivos Celulares del Instituto Ivanovski de Investigación sobre Virología, Academia Rusa de Ciencias Médicas. A fin de preparar el material de infección, los ratones fueron infectados por vía intranasal con el virus en fluido alantoideo; una vez desarrollados los síntomas de la enfermedad, los ratones se sacrificaron y se preparó un homogeneizado de tejido pulmonar en condiciones estériles. A continuación, este homogeneizado se usó para infectar embriones de pollo de 10 días de edad, a partir de los cuales se obtuvo el virus en fluido alantoideo que se iba a usar, tras valorarlo en ratones, para infectar a los animales.

**[0088]** Se adquirieron ratones blancos sin pedigrí (hembras) con pesos corporales de 12 a 14 g en el criadero Andreevka (provincia de Moscú) y se mantuvieron con una ración convencional en condiciones de criadero reguladas.

60

**[0089]** Ratones previamente pesados (ratones hembra no lineales con pesos corporales promedio de 12 a 14 g) se infectaron por vía intranasal bajo anestesia ligera de éter con el virus de la gripe A/Aichi/2/69 (H3N2) (10 LD<sub>50</sub> en 100 mcl). La LD<sub>50</sub> se determinó en un experimento preliminar mediante valoración del virus en fluido alantoideo en los mismos ratones que se usaron en el experimento principal. El esquema de tratamiento con el agente de ensayo fue el siguiente: 24 horas antes de la infección, 1 hora antes de la infección, 24 horas después de la infección, y

65

después una vez al día en 24 horas durante 5 días. Para administración oral se usó una jeringa de insulina con una aguja especial (lavado); cada dosis se administró en una cantidad de 100 mcl. Para administración intraperitoneal e intramuscular, se inyectó cada dosis también en una cantidad de 100 mcl. El grupo de control del virus estaba comprendido por 10 ratones que fueron infectados con el virus pero que no se trataron con los agentes. En el experimento había también dos grupos de 10 ratones sin infectar cada uno, recibiendo cada ratón por vía intraperitoneal e intramuscular 100 mcl de DMSO al 1,5 %, que se usaba como disolvente para los agentes. Los otros grupos estaban comprendidos también cada uno inicialmente por 10 animales. Los animales tratados y de control se controlaron diariamente; En los primeros cinco días después de la infección, los ratones se pesaron cada día, y después cada dos días. La actividad quimioterapéutica del agente sobre la neumonía gripal se determinó mediante tres criterios, concretamente: un porcentaje de protección frente a la infección viral mortal, un aumento del tiempo de vida promedio, y una disminución de la pérdida de peso corporal en grupos de animales tratados con el agente, en comparación con el grupo de control.

**[0090]** El tratamiento con fullereno-ácido aminocaproico fue eficaz en cuanto a disminuir la tasa de mortalidad por neumonía gripal en ratones y la pérdida de peso de los mismos, y en cuanto a aumentar el tiempo de vida promedio en comparación con el control del virus. La eficacia de este tratamiento depende de la dosis del agente y del esquema de tratamiento. Los resultados se muestran en las Tablas 10 y 11.

**[0091]** El tratamiento intramuscular con poli(ácido aminocaproico) de fullereno era el más eficaz en términos de los tres parámetros (porcentaje de protección frente a mortalidad, tiempo de vida promedio, y pérdida de peso); cuando se administró en dosis de 100 y 200 mg/kg/día, este tratamiento evitó la muerte de un 60 a un 70 % de los animales infectados y la pérdida de peso de los mismos, y también aumentó su tiempo de vida en casi el doble. El tratamiento intraperitoneal con poli(ácido aminocaproico) de fullereno solo fue eficaz en dosis de 50 y 100 mg/kg/día. La tasa de mortalidad, una considerable reducción del tiempo de vida promedio y del peso corporal en ratones tras el tratamiento intraperitoneal de los mismos con poli(ácido aminocaproico) de fullereno con una dosis de 200 mg/kg/día implican que esta dosis con este método de tratamiento es tóxica para los ratones infectados.

**[0092]** Ejemplo n.º 8 Estudios de actividad antitumoral del poli(ácido aminocaproico) de fullereno (agente n.º 1) en tumores trasplantables de leucosis L1210, adenocarcinoma de mama Ca-755, y carcinoma de Lewis.

**[0093]** Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto de Toxicología, San Petersburgo, 2006, de acuerdo con las "Directrices para el Estudio de la Actividad Antitumoral de Agentes Farmacológicos" (Manual on Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Agents", Ministerio de Salud Pública de la Federación Rusa, Remedium, Moscú, 2000, págs. 319 -325).

**[0094]** Las cepas de células tumorales de leucemia L1210, adenocarcinoma de mama Ca-755, y carcinoma de Lewis (3LL) se adquirieron en el Instituto Petrov de Investigación Oncológica, Ministerio de Salud Pública de la Federación Rusa (San Petersburgo).

**[0095]** Estos estudios emplearon los siguientes sistemas de ensayo:

ratones de línea DBA/2 con células de leucemia L1210 trasplantadas. Edades de los ratones: de 6 a 8 semanas; pesos corporales: de 19 a 25 g.  
 ratones de línea C 57 BL/6J con células de Ca-755 trasplantadas. Edades de los ratones: de 6 a 8 semanas; pesos corporales: de 19 a 25 g.  
 ratones de línea C 57 BL/6J con células de LL-3 trasplantadas. Edades de los ratones: de 6 a 8 semanas; pesos corporales: de 18 a 24 g.

**[0096]** El efecto antitumoral se determinó a través de los siguientes parámetros:

- la acumulación de líquido ascítico como ganancia de peso corporal del animal;
- el tiempo de vida de los animales; y
- el crecimiento tumoral. Se midieron la dimensión mayor (longitud) y la dimensión menor perpendicular a la misma (anchura) del tumor. El volumen del tumor se calculó, y la inhibición del crecimiento tumoral se calculó mediante una fórmula. El criterio de determinación fue el día en que cada tumor individual alcanzó un volumen de 500 mm<sup>3</sup>.

**[0097]** Los resultados del efecto del agente sobre el desarrollo de la leucemia L1210 se muestran en la Tabla 12.

**[0098]** La Tabla 13 muestra los tiempos de vida promedio en animales con tumores trasplantables de leucemia L1210 y el grupo de control, así como el incremento de tiempo de vida en comparación con el grupo de control en porcentaje.

**[0099]** En la Tabla 13 se puede observar que el tiempo de vida promedio en los ratones del grupo de control con células de leucemia L1210 trasplantadas era de 6,0 ± 0,21 días. La administración del agente aumentaba de forma

significativa los tiempos de vida en los ratones hasta  $10,7 \pm 0,37$  días y  $10,60 \pm 0,37$  días. El porcentaje de aumento del tiempo de vida en comparación con el control fue del 78,33 % y del 76,67 % para dosis de agente de 100 mg/kg y 200 mg/kg, respectivamente; sin embargo, las diferencias entre los grupos experimentales parecían estadísticamente no significativas.

5

**[0100]** Durante el experimento, los animales se pesaron diariamente con el fin de evaluar la acumulación de líquido ascítico y estudiar los agentes comparados en este proceso.

**[0101]** Los resultados de la evaluación de la ganancia de peso corporal se muestran en la Tabla 14. En la Tabla 14 se puede observar que el agente ensayado reducía de forma significativa la acumulación de líquido ascítico en ratones con tumores de leucemia L1210 trasplantados. La ganancia de peso corporal en ratones que recibieron el agente ensayado era significativamente menor que en el grupo de control; además, en los animales que recibieron el agente ensayado en una dosis de 250 mg/kg, la ganancia de peso corporal promedio era significativamente menor (en un factor de 1,5) que el mismo parámetro en los animales que recibieron el agente ensayado en una dosis de 100 mg/kg.

**[0102]** Por tanto, los resultados anteriores implican que el agente tiene una actividad antitumoral bien definida e inhibe el crecimiento de tumores de leucemia L1210 en ratones, lo que se manifiesta en el aumento significativo del tiempo de vida (del 78,33 % y del 76,67 %) para dosis de 100 mg/kg y 250 mg/kg, respectivamente, y en una inhibición significativa de la acumulación de líquido ascítico en animales experimentales (del 78 al 43 %). No se detectaron signos de intoxicación en los antecedentes de la administración del agente ensayado. Una revisión de los resultados muestra diferencias significativas entre una dosis de 100 mg/kg y una dosis de 250 mg/kg: el aumento de la dosis del agente lleva a un descenso significativo de la acumulación de líquido ascítico en animales experimentales.

25

**[0103]** Para otros parámetros, el contraste (la diferencia de promedios para los grupos que recibieron antes diferentes dosis del agente ensayado) estaba en el nivel de los errores debidos a la varianza natural.

**[0104]** Los resultados del efecto del agente sobre el desarrollo del adenocarcinoma de mama Ca-755 se muestran en la Tabla 15.

**[0105]** La Tabla 16 muestra los tiempos de vida promedio en animales con tumores trasplantados de adenocarcinoma de mama Ca-755 y en animales del grupo de control, así como el incremento del tiempo de vida en comparación con el grupo de control en porcentaje.

35

**[0106]** En la Tabla 16 se puede observar que el tiempo de vida promedio en los ratones del grupo de control con células tumorales de adenocarcinoma de mama Ca-755 trasplantadas era de  $37,9 \pm 0,74$  días. La administración del agente aumentaba de forma significativa los tiempos de vida en los ratones hasta  $71,9 \pm 2,58$  días y  $73,4 \pm 0,92$  días; el porcentaje de aumento del tiempo de vida en comparación con el control fue del 89,71 % y del 93,67 % para dosis de agente de 100 mg/kg y 200 mg/kg, respectivamente; sin embargo, las diferencias entre los grupos experimentales parecían estadísticamente no significativas.

**[0107]** Por tanto, los resultados anteriores implican que el agente tiene un efecto antitumoral pronunciado e inhibe el crecimiento de células tumorales de adenocarcinoma de mama Ca-755 en ratones, lo que se manifiesta en un aumento significativo del tiempo de vida (del 89,71 % y del 93,67 %) para dosis de 100 mg/kg y 250 mg/kg. No se detectaron signos de intoxicación en los antecedentes de la administración del agente ensayado.

**[0108]** El efecto del agente sobre el volumen promedio de los tumores de carcinoma de Lewis se determinó en diferentes días después del trasplante. En el grupo de control, los tumores se desarrollaron en 21 de los 26 ratones (80,8 %); los primeros tumores aparecieron el día 7 después del trasplante y se observaron hasta el día 40. Los primeros tumores en el grupo tratado con el agente en una dosis de 100 mg/kg se observaron el día 7 después del trasplante y se observaron hasta el día 60; en el grupo tratado con el agente en una dosis de 250 mg/kg aparecieron el día 8 después del trasplante y se observaron hasta el día 60. El agente tenía un efecto antitumoral pronunciado sobre el desarrollo del carcinoma de pulmón de Lewis; el porcentaje de inhibición en el grupo tratado con el agente en una dosis de 100 mg/kg del día 10 al día 17 era significativamente del 71,77 % y del 58,5 % en comparación con el grupo de control; en el grupo tratado con el agente en una dosis de 250 mg/kg en comparación con el grupo de control, el porcentaje de inhibición del día 10 al día 17 era del 84,37 % y del 54,2 %, respectivamente.

**[0109]** La Tabla 17 muestra el efecto del agente sobre el desarrollo del carcinoma de pulmón de Lewis; los parámetros analizados eran los periodos de tiempo para que el tumor consiguiera un tamaño de  $500 \text{ mm}^3$ ; en el grupo de control este parámetro variaba de 12 a 20 días, y en los grupos experimentales de 17 a 28 días. Como se puede observar en esta tabla, el agente aumentó significativamente este parámetro de un 22 a un 27 % en comparación con el control.

**[0110]** En los ratones del grupo de control, la muerte se producía como resultado de la progresión del desarrollo

tumoral del foco principal, y debido a la lesión metastásica extensiva del pulmón. Los tiempos de vida individuales (ILT) en los ratones del grupo de control variaban entre 28 y 39 días; en los grupos en los que los ratones recibieron el agente, entre 51 y 60 días. La Tabla 18 muestra el efecto del agente sobre el tiempo de vida promedio (ALT) de los ratones después del trasplante del tumor. Se puede observar en la Tabla 18 que el agente aumentó significativamente el tiempo de vida promedio en aproximadamente un 70 % frente al grupo de control; la diferencia entre los grupos de ensayo no es estadísticamente significativa.

**[0111]** Los valores individuales del peso de los pulmones y del número de metástasis en los pulmones de los ratones del grupo de control y de los ratones de los grupos de ensayo que recibieron los agentes en comparación, se muestran en la Tabla 19.

**[0112]** Se puede observar en la Tabla 19 que el agente disminuyó significativamente el peso de los pulmones y el número de metástasis en los pulmones en un factor de 1,5 a 2. La diferencia entre los grupos de ensayo no es estadísticamente significativa.

Tabla 1

Citotoxicidad del agente estudiado en un modelo de células linfoblastoides humanas		
Parámetros operación, concentración, mcg/ml	Tasa supervivencia celular, %	Número de células x 10 <sup>3</sup> /ml
Control celular	98	800
Agente n.º 1	0,5	833
	1,0	833
	5,0	799
	10,0	767
	100	600

Tabla 2

Actividad antiviral del agente estudiado en un modelo de células humanas infectadas con VIH-1				
Parámetros operación	Concentración, mcg/ml	Tasa supervivencia celular, %	Número de células x 10 <sup>3</sup> /ml	ECP/sincitio (+)
Control celular	0	98	800	0
Control del virus	0	20	66	4,0
Agente n.º 1	0,5	18	33	4,0
	1,0	26	495	4,0
	5,0	98	633	0
	10	98	600	0

20

Tabla 3

Efecto citotóxico de la muestra de poli(ácido aminocaproico) de fullereno sobre un cultivo de células Vero	
Concentración del agente, Mcg/ml	Efecto citotóxico en las células, %
50	0,0
100	0,0
200	25,0
500	100,0
1000	100,0

Nota: el DMSO en la concentración usada para la disolución no causa un efecto citotóxico en las células.

Tabla 4

Actividad antiherpética de una muestra de poli(ácido aminocaproico) de fullereno sobre un cultivo de células Vero con una dosis de infección del virus del herpes de 100 TCD <sub>50</sub> /0,2 ml	
Concentración del agente, mcg/ml	Protección de las células frente al efecto citotóxico del virus del herpes, %
5,0	81,25 ± 12,5
10,0	100 ± 0,0
50,0	100 ± 0,0
100,0	100 ± 0,0

Nota: Las células se infectaron una hora después de la adición de la muestra.

Tabla 5

Efecto protector del agente frente al efecto destructivo del virus del herpes tipo 1 para una dosis de infección del virus de 100 TCD <sub>50</sub>		
Concentración del agente, mcg/ml	Agente n.º 1	
	Densidad óptica	La diferencia respecto al control es significativa para p
0	0,403 ± 0,02	
5,0	1,110 ± 0,08	< 0,01
10,0	1,015 ± 0,07	< 0,01
50,0	1,153 ± 0,06	< 0,01
100,0	1,79 ± 0,05	< 0,01
Control celular	1,133 ± 0,07	< 0,01

5

Tabla 6

Actividad antiherpética de una muestra de poli(ácido aminocaproico) de fullereno sobre un cultivo de células Vero con una dosis de infección del virus del herpes de 1000 TCD <sub>50</sub> /0,2 ml	
Concentración del agente, mcg/ml	Protección de las células frente al efecto citotóxico del virus del herpes, %
5,0	100 ± 0,0
10,0	100 ± 0,0
50,0	100 ± 0,0
100,0	100 ± 0,0

Nota: Las células se infectaron una hora después de la adición de la muestra.

Tabla 7

Efecto protector del agente n.º 1 frente a la acción citopática del virus del herpes tipo 1 para una dosis de infección del virus del herpes de 1000 TCD <sub>50</sub>		
Concentración del agente, mcg/ml	Densidad óptica	La diferencia respecto al control es significativa para p
0	0,796 ± 0,06	
5,0	1,027 ± 0,04	< 0,01
10,0	1,021 ± 0,04	< 0,01
50,0	1,033 ± 0,03	< 0,01
100,0	1,083 ± 0,01	< 0,01
Control celular	1,133 ± 0,07	

Tabla 8

Valores de actividad del agente n.º 1 frente al virus de la gripe A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1		
Concentración del agente (mcg/ml)	Protocolo de administración	Porcentaje (%) de reducción de la reproducción del virus de la gripe en un cultivo de células MDCK respecto al control en presencia de las series de agente n.º 1
6,25	2 h antes de la infección	27,0 - 28,0 - 0
	simultáneamente a la infección	18,0 - 0 - 0
12,5	2 h antes de la infección	47,0 - 74,0 - 9,5
	simultáneamente a la infección	39,0 - 13,0 - 0
25,0	2 h antes de la infección	41,0 - 79,0 - 12
	simultáneamente a la infección	40,0 - 0
50,0	2 h antes de la infección	28,0 - 72,0 - 31,0
	simultáneamente a la infección	33,0 - 10,0
100,0	2 h antes de la infección	4,0 - 0 - 20,0
	simultáneamente a la infección	29,0 - 28,0

**[0113]** Las diferencias entre los valores de las dos operaciones depende de la multiplicidad de la infección viral del cultivo de células MDCK.

5

Tabla 9

Valores de actividad de los agentes frente al virus de la gripe A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, valores promedio		
Concentración del agente (mcg/ml)	Protocolo de administración	Porcentaje de reducción de la reproducción del virus de la gripe en un cultivo de células MDCK respecto al control en presencia de las series de agente n.º 1
6,25	2 h antes de la infección	18,0
	simultáneamente a la infección	6,0
12,5	2 h antes de la infección	44,0
	simultáneamente a la infección	26
25,0	2 h antes de la infección	44,0
	simultáneamente a la infección	20,0
50,0	2 h antes de la infección	44,0
	simultáneamente a la infección	22,0
100,0	2 h antes de la infección	8
	simultáneamente a la infección	29,0

Tabla 10

Eficacia del poli(ácido aminocaproico) de fullereno en la infección de gripe inducida en ratones				
Dosis del agente	LD70*		LD90**	
	Porcentaje protección frente a mortalidad (%)	Tiempo de vida promedio (días)**	Porcentaje protección frente a mortalidad (%)	Tiempo de vida promedio (días)*
Poli(aminoácido) de fullereno, vía oral				
100 mg/kg/día	40	13,1 (1-8 d, 1-10 d, 1-11 d)	30	10,8 (2-7 d, 1-9 d, 2-10 d, 1-11 d)
200 mg/kg/día	70	> 16	60	13,4 (1-10 d, 2-11 d)
300 mg/kg/día	40	12,8 (1-8 d, 2-9 d)	No estudiado	No estudiado
Poli(aminoácido) de fullereno, vía intramuscular				
50 mg/kg/día	50	13,3 (1-7 d, 1-8 d)	40	11,4 (2-7 d, 1-8 d, 2-11 d)
100 mg/kg/día	70	> 16	60	13,0 (1-8 d, 1-9 d, 1-11 d)
200 mg/kg/día	50	13,8 (1-7 d, 1-13 d)	60	13,1 (1-7 d, 2-11 d)
1,5 % Solución DMSO		> 16		> 16
Poli(aminoácido) de fullereno, vía intraperitoneal				
50 mg/kg/día	50	13,4 (2-8 d)	40	11,5 (2-7 d D-9d, 2-11 d)
100 mg/kg/día	60	13,7 (1-3 d)	30	10D3-7d, 2-8 d, 1-9 d)
200 mg/kg/día				
1,5 % solución DMSO	0	3,1 (3-1 d, 1-2 d, 2-3 d, 1-8 d)	No estudiado	No estudiado
		> 16		> 16
Control del virus (10 LD <sub>50</sub> )		10,1 (4-8 d, 2-10 d, 1-11 d)		7,3 (5-7 d, 4-8 d)
Notas: *En los experimentos la tasa de mortalidad en el grupo de control del virus fue del 70 %; es decir, siete de cada 10 ratones murieron. ** En los experimentos la tasa de mortalidad en el grupo de control del virus fue del 90 %; es decir, nueve de cada diez ratones murieron. *Esquema de tratamiento: 24 horas y 1 hora <i>antes</i> de la infección, después a las 24, 48, 72 y 96 horas tras la infección.				

Tabla 11

Cambio de peso en animales infectados con el virus de la gripe A/Aichi/2/69 (dosis LD70) y tratados con los agentes.									
Dosis del agente	Porcentaje de cambio del peso corporal en días tras la infección								
	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	día 7	día 9	día 11	día 13
Poli(aminoácido) de fullereno, vía oral									
100 mg/kg/día	+ 19	+ 23	+ 25	+ 22	+ 16	+ 17	+ 24	+ 43	+ 51

Poli(aminoácido) de fullereno, vía oral									
200 mg/kg/día	+ 26	+ 31	+ 36	+ 36	+ 36	+ 38	+ 47	+ 51	+ 57
300 mg/kg/día	+ 24	+ 27	+ 28	+ 24	+ 19	+ 23	+ 35	+ 36	+ 38
Poli(aminoácido) de fullereno, vía intramuscular									
50 mg/kg/día	+ 20	+ 22	+ 22	+ 17	+ 11	+ 9	+ 11	+ 19	+ 26
100 mg/kg/día	+ 21	+ 25	+ 27	+ 23	+ 20	+ 21,5	+ 32	+ 35,5	+ 38
200 mg/kg/día	+ 25	+ 27	+ 28	+ 24	+ 20	+ 23	+ 22	+ 25	+ 36,5
Poli(aminoácido) de fullereno, vía intraperitoneal									
50 mg/kg/día	+ 21	+ 27	+ 29	+ 21	+ 16	+ 15	+ 31	+ 36	+ 40
100 mg/kg/día	+ 19	+ 23	+ 22	+ 18	+ 15	+ 18	+ 25	+ 33	+ 41
200 mg/kg/día	+ 7	+ 6	+ 5	- 4	- 3	- 7	+ 4	+ 6	+ 15
Control del virus	+ 19	+ 24	+ 31	+ 9	+ 0,9	- 11	+ 4	+ 27	+ 37

Tabla 12

Efecto del agente sobre el tiempo de vida en ratones con tumores de leucemia L1210 trasplantables										
Nombre del grupo	N.º de animales y sus tiempos de vida en días									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	6	7	7	6	6	5	6	6	5	6
Agente n.º 1, 100 mg/kg	9	1 1	1 3	1 1	1 2	1 0	1 1	1 0	1 0	1 0
Agente n.º 1, 250 mg/kg	1 0	1 0	1 0	9	1 0	1 1	1 3	1 0	1 1	1 2

5

Tabla 13

Efecto del agente sobre el tiempo de vida promedio en animales con tumores de leucemia L1210 trasplantables		
Nombre del grupo	ALT, en días, M ± m	ILT, %
Control	6,0 ± 0,21	
Agente n.º 1, 100 mg/kg	10,7 ± 37*	78,33
Agente n.º 1, 250 mg/kg	10,60 ± 0,37*	76,67

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

[0114] Tabla 14. Efecto del agente sobre el desarrollo de líquido ascítico en ratones con tumores de leucemia L1210 trasplantables

Día	Grupo de Control	Agente 100 mg/kg		Agente 250 mg/kg	
	Ganancia de peso corporal promedio, M ± m	Ganancia de peso corporal promedio, M ± m	Porcentaje de inhibición con respecto al control	Ganancia de peso promedio, M ± m	Porcentaje de inhibición con respecto al control
	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2		0,3 ± 0,1	
	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,4		0,5 ± 0,3	
	5,0 ± 0,8	2,5 ± 0,5	50,0 %*	1,1 ± 0,4	78,0 %*
	11,4 ± 1,1	4,2 ± 1,0	63,2 %*	2,8 ± 0,9	75,4 %*
	16,3 ± 2,0	8,4 ± 1,2	48,5 %*	4,7 ± 1,2	71,2 %*



Día	Grupo de Control	Agente 100 mg/kg		Agente 250 mg/kg	
	Ganancia de peso corporal promedio, M ± m	Ganancia de peso corporal promedio, M ± m	Porcentaje de inhibición con respecto al control	Ganancia de peso promedio, M ± m	Porcentaje de inhibición con respecto al control
	21,2 ± 2,1	12,1 ± 2,1	42,9 %*	8,4 ± 1,6	60,4 %*
	26,3 ± 1,7	14,2 ± 2,2	46,0 %*	10,0 ± 1,3	62,0 %*

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

Tabla 15

Efecto del agente sobre el tiempo de vida en ratones con tumores de leucemia CA-755 trasplantables										
Nombre del grupo	N.º de animales y sus tiempos de vida en días									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	36	39	41	34	35	40	39	38	40	37
Agente n.º 1, 100 mg/kg	79	81	73	82	80	66	63	60	67	68
Agente n.º 1, 250 mg/kg	77	72	70	78	76	71	73	70	72	75

Tabla 16

Efecto del agente sobre el tiempo de vida promedio en animales con tumores de adenocarcinoma de mama Ca-755 trasplantables		
Nombre del grupo	ALT, en días, M ± m	ILT, %
Control	37,9 ± 0,74	
Agente n.º 1, 100 mg/kg	71,9 ± 2,58*	89,71
Agente n.º 1, 250 mg/kg	73,40 ± 0,92*	93,67

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

5

Tabla 17

Efecto del agente sobre el tamaño del carcinoma de Lewis (consecución de un V = 10 500 mm <sup>3</sup> )		
Grupo	Día en el que el tumor alcanza un volumen de 500 mm	
	M ± m	Porcentaje de aumento, significación estadística
Control	16,7 ± 0,65	
Agente n.º 1, 100 mg/kg	21,3 ± 1,21	27,3 % *
Agente n.º 1, 250 mg/kg	20,5 ± 1,20	22,9 %*

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

Tabla 18

Efecto del agente sobre el tiempo de vida media en ratones tras el trasplante del carcinoma de Lewis		
Grupo	Tiempo de vida	
	M ± m	Porcentaje de aumento, significación estadística
Control	32,81 ± 0,86	
Agente 100 mg/kg	55,92 ± 0,98	70,42 %*
Agente 250 mg/kg	56,38 ± 0,68	71,85 %*

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

10

Tabla 19

Efecto del agente sobre la formación de metástasis del carcinoma de Lewis en ratones			
Grupo n.º (número de animales)	Peso de los pulmones, mg M + m	Número de metástasis en los pulmones, M ± m	Número de metástasis grandes (> 3 mm) en los pulmones, M ± m
Control (n = 21)	1486,7 ± 64,08	70,5 ± 5,50	13,4 ± 2,05
Agente n.º 1, 100 mg/kg (n = 12)	491,9 ± 63,72*	53,5 ± 11,23*	5,8 ± 1,91*
Agente n.º 1, 250 mg/kg (n = 13)	505,4 ± 68,82*	55,8 ± 11,60*	5,7 ± 1,54*

Nota: \*Diferencia significativa respecto al control (para p < 0,05).

## REIVINDICACIONES

1. Derivados homo- y hetero-poli(aminoácidos) de fullereno de fórmula general  $C_{60}(H)_x\{NH(CH_2)_nCOO-\}_x\{NH_3^+(L)COOH\}_x$ , donde  $n = 2-5$ ,  $x = 3$ ,  $L = -(CH_2)_m$ , donde  $m = 1-5$ , o  $-CO(CH_2)_kCH(NH_2)-$ , donde  $k = 1-2$ , **caracterizados por que** los compuestos comprenden grupos aminoácidos unidos covalentemente y formas iónicas polares de aminoácidos.
2. Derivados de fullereno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados por que** los grupos aminoácidos son restos de aminoácidos alifáticos de fórmula general  $NH(CH_2)_nCOOH$ , donde  $n = 2-5$ .
3. Derivados de fullereno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados por que** las formas iónicas polares de aminoácidos son restos de amidas de aminoácidos dicarboxílicos de fórmula general  $NH_2(CO)(CH_2)_kCH(NH_2)COOH$ , donde  $k = 1-2$ .
4. Un método para la preparación de derivados de fullereno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los derivados de fullereno se obtienen mediante reacción del fullereno con un exceso molar de diez veces de sales potásicas anhidras de aminoácidos de fórmula general  $NH_2(CH_2)_nCOOK$ , donde  $n = 2-5$ , en un medio disolvente orgánico aromático, que comprende la adición a la suspensión resultante de un catalizador de transferencia de fase con agitación y calentamiento hasta una temperatura no superior a  $60-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta que la solución se vuelve completamente incolora y se forma un precipitado sólido, separándose después dicho precipitado, tras lo cual las soluciones acuosas de sales potásicas de poli(aminoácidos) de fullereno se tratan con una solución 1 N de ácidos orgánicos o minerales, seguido de la adición a la solución, en disolventes polares, de un aminoácido de fórmula general  $NH_2(L)COOH$ , donde  $L = -(CH_2)_m$ , donde  $m = 1-5$ , o  $-CO(CH_2)_kCH(NH_2)-$ , donde  $k = 1-2$ , agitación, eliminación de los disolventes, lavado y secado del precipitado.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** se usan sales potásicas anhidras de aminoácidos recién preparadas en un estado finamente disperso y la separación de las sales potásicas de poli(aminoácidos) de fullereno se efectúa mediante filtración, lavado con etanol y secado.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4, **caracterizado por que** el catalizador de transferencia de fase es un éster metílico de óxido de polietileno que tiene un peso molecular de 200, 400 o 500.
7. Una composición farmacéutica **caracterizada por que** el principio activo es el derivado de fullereno de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Una composición farmacéutica que comprende el derivado de fullereno de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del virus del herpes, el virus de la hepatitis C, los virus de la gripe, el VIH, tumores y psoriasis.