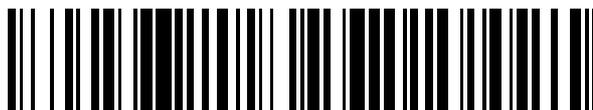


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 459**

51 Int. Cl.:

C07J 71/00 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.12.2012 PCT/CN2012/087360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13097681**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2012 E 12862540 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2799444**

54 Título: **Derivado de esteroI, procedimiento de preparación y finalidad del mismo**

30 Prioridad:

26.12.2011 CN 201110441993
26.12.2011 CN 201110442009
18.01.2012 CN 201210015475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2018

73 Titular/es:

**BEIJING PEKING UNIVERSITY WBL BIOTECH
CO., LTD (100.0%)**
**Block A Room 701-705 No. 30 South Haidian
Road Haidian District
Beijing 100080, CN**

72 Inventor/es:

DUAN, ZHENWEN;
GUO, SHUREN y
LI, XUEMEI

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 666 459 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

Derivado de esteroles, procedimiento de preparación y finalidad del mismo

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención pertenece al campo químico-farmacéutico y se refiere a un derivado de esteroles, así como a un procedimiento de preparación y usos del mismo.

10 **Técnica anterior**

[0002] El arroz fermentado con *Monascus* es un koji de arroz rojo púrpura preparado con arroz como materia prima a través de su fermentación con *Monascus*. El arroz fermentado con *Monascus*, también denominado Danqu (丹曲) en la antigua China, se obtiene mediante una fermentación en la que el koji, un cultivo de moho con *Monascus* como componente principal, se cultiva sobre arroz cocido; es de color rojo y, por tanto, también se denomina koji rojo o poso de vino rojo; y también se denomina koji de Fujian, arroz de Fujian, etc., porque se produce principalmente en Fujian.

[0003] China tiene una larga historia de utilización de *Monascus*, que se ha usado para la preparación de koji desde la dinastía Han. El arroz fermentado con *Monascus* es una medicina tradicional china que se usa como alimento y como fármaco. Desde hace mucho tiempo, ha tenido un uso muy extendido como colorante alimentario, en la elaboración de vino, en la fermentación y en la medicina tradicional china. En “Principle of Correct Diet” (《饮膳正要》) se registra que el arroz fermentado con *Monascus* es de “sabor dulce y naturaleza neutra, agradable al paladar y no tóxico” y “vigorizante para el bazo, aporta Qi y calienta el bazo y el estómago”;

25 “Compendium of Materia Medica” (《本草纲目》) se registra que es “dulce, cálido y no tóxico”, “capaz de tratar la dismenorrea y la hemorragia postparto, al molerlo con vino de arroz y beberlo”; en “Addendum for Amplification on Materia Medica” (《本草衍义补遗》) se registra que “activa la sangre, ayuda a la digestión, es vigorizante para el bazo y calienta el estómago, y es capaz de tratar el flujo vaginal rojo y blanco y la diarrea, así como lesiones traumáticas”.

30

[0004] Desde los años 70, cuando el profesor japonés Endo aisló por primera vez una sustancia fisiológicamente activa del *Monascus* rojo (*Monascus ruber*), monacolina K, numerosos investigadores, tanto a nivel nacional como internacional, han seguido descubriendo otras sustancias fisiológicamente activas a partir de los metabolitos de *Monascus*, incluidos compuestos de monacolina, el pigmento de *Monascus*, el componente reductor de la presión GABA y el componente antioxidante ácido dimerúmico, así como algunos terpenoides aislados recientemente. Con el desarrollo de la bioquímica y la farmacología modernas, se continúan describiendo funciones del arroz fermentado con *Monascus*, tales como una función hipolipémica, reductora de la presión sanguínea, hiperglucémica, contra la obesidad, contra el cáncer, profiláctica y de tratamiento de la demencia senil y la osteoporosis, lo que añade más connotaciones al arroz fermentado con *Monascus* tradicional.

40

[0005] Las cápsulas de “Xuezhikang” son una medicina china eficaz, segura y moderna para la regulación de los lípidos que se preparan mediante fermentación con *Monascus* y han sido desarrolladas por Beijing Peking University WBL Biotechnology Co., Ltd. Son útiles para el tratamiento de indicaciones como enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares causadas por hiperlipemia y aterosclerosis. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis endógena de colesterol, la reducción del colesterol sérico total (TC), los triglicéridos sanguíneos (TG) y la lipoproteína de baja densidad (LDL) y el aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL) a través de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Las cápsulas de Xuezhikang contienen un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus*, que es rico en una serie de estatinas naturales. Además de estatinas, las cápsulas de Xuezhikang contienen también pigmentos, isoflavonas, esteroides, 20 tipos de aminoácidos, ácidos grasos insaturados y numerosos oligoelementos. Por consiguiente, todavía es necesario encontrar nuevos compuestos capaces de reducir los lípidos o inhibir la actividad de la HMG-CoA-reductasa.

[0006] Además, el Xuezhikang puede comprender también algunos ingredientes desconocidos contra el cáncer. Por consiguiente, también es necesario encontrar nuevos compuestos contra el cáncer.

55

[0007] La obesidad es una enfermedad metabólica universal que afecta a la secreción interna y tiende a

extenderse ampliamente en todo el mundo. No solo afecta a la postura y la actividad, sino que está estrechamente asociada con hiperlipemia, aterosclerosis, cardiopatía coronaria, diabetes, etc. La aparición de la obesidad se relaciona con muchos factores, tales como factores genéticos, factores ambientales y factores dietéticos, entre los cuales, una dieta rica en grasa es un factor importante de la obesidad. En los últimos años, la farmacoterapia ha resultado un medio eficaz para el tratamiento de la obesidad y su objetivo terapéutico se alcanza normalmente mediante la reducción de la absorción de grasa. Las lipasas del páncreas y el estómago son necesarias para la digestión y la absorción de las grasas en el tubo intestinal. Después que las grasas de los alimentos se han hidrolizado a monoacilglicerol y ácidos grasos libres, se absorben en el tubo intestinal y entonces, las grasas se sintetizan de nuevo *in vivo*, lo que causa la acumulación de grasa y resulta finalmente en obesidad. El uso de inhibidores de lipasa puede inhibir eficazmente los efectos de descomposición y catálisis de las lipasas sobre las grasas en el tubo intestinal, para así lograr el objetivo de reducir la absorción de grasa y el control y el tratamiento de la obesidad (CHEN Jin, etc., *Advances in studying drug therapy of obesity*, Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 25(5): 947-948; WU Jing, etc., *Advances in drug therapy of obesity*, Medical Recapitulate, 2006, 12(11): 693-693).

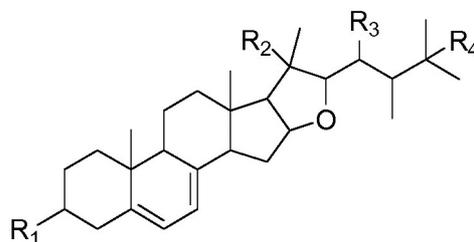
[0008] Actualmente, solamente hay dos fármacos aprobados por la FDA de los EE. UU. para el tratamiento a largo plazo de la obesidad: sibutramina (ayuda a la reducción de peso actuando sobre el sistema nervioso central) y orlistat (inhibidor de lipasa en el tubo gastrointestinal). Sin embargo, los dos fármacos tienen reacciones adversas significativas: sibutramina tiene efectos secundarios que incluyen principalmente sed, sensación astringente, mareos e insomnio, mientras que orlistat tiene reacciones adversas que incluyen principalmente síntomas gastrointestinales como diarrea, dolores abdominales, manchas aceitosas, flatulencia, etc. y sus efectos a largo plazo deben seguirse evaluando.

[0009] El documento WO 2011003284 describe un compuesto de 3,16,20,22,25-hexahidroxiesteroide con actividad de inhibición de la HMG-CoA-reductasa y un procedimiento de preparación del mismo.

[0010] Por consiguiente, en la actualidad todavía es necesario encontrar nuevos fármacos con una función de inhibición de lipasas.

[0011] Con una gran cantidad de experimentos y trabajo inventivo, los inventores de la presente invención han obtenido un nuevo derivado de esteroide y han encontrado sorprendentemente que el compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la HMG-CoA-reductasa y, por tanto, es un fármaco potencial para la reducción o la regulación de la grasa sanguínea o la profilaxis y/o el tratamiento de la dislipidemia, la hiperlipemia, la hipercolesterolemia o la aterosclerosis. Además, también sorprendentemente, los inventores han encontrado que: 1) el compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la proliferación de las células cancerosas (células tumorales) y es un fármaco potencial para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante del cáncer; 2) el compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la actividad de la lipasa, por lo que es un fármaco potencial para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o enfermedades asociadas con la obesidad. Por consiguiente, se proporcionan las invenciones siguientes.

[0012] Un aspecto de la presente descripción se refiere a un compuesto de la fórmula I o a una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo,



Fórmula I

45 en el que,

R₁ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O (carbonilo), H y alquilo C₁-C₃;

R₂ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;

R₃ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O, H y alquilo C₁-C₃;

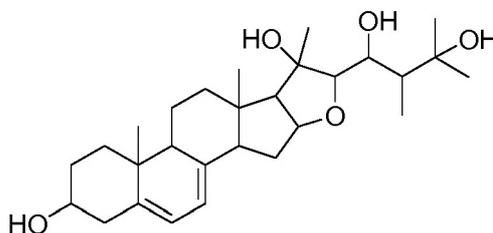
R₄ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;

5 y ninguno, uno, dos, tres o cuatro de R₁, R₂, R₃ y R₄ son -OH.

[0013] En cuanto al éster o éter del compuesto de la fórmula I, los sitios para la formación del éster o éter son ninguno, uno, dos, tres o cuatro de R₁, R₂, R₃ y R₄.

10 **[0014]** En una realización de la presente descripción, R₁ es -OH o =O (carbonilo) y R₂, R₃ y R₄ son todos H.

[0015] Un aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula II o a una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo,



Fórmula II.

15

[0016] El nombre químico del compuesto de la fórmula II es: 16,22-epoxi ergosta-5,7-dieno-3,20,23,25-tetraol.

[0017] En el compuesto de la fórmula II o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo, dicho éster o éter puede seleccionarse del grupo que consta de formiato, acetato, propionato, *p*-tolilsulfonato y trifluorometilsulfonato; o dicho éter puede ser éter *terc*-butildimetilsilílico.

[0018] En el compuesto de la fórmula II o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo, dicho éster o éter puede seleccionarse del grupo que consta de tetraacetato del compuesto de la fórmula II, tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II, tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II y tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II.

[0019] La presente invención se refiere además a un hidrato o solvato del compuesto de la fórmula II.

30 **[0020]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto de la fórmula II que comprende las etapas siguientes:

1) Proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus*, llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado. Opcionalmente, el extracto alcohólico puede obtenerse por el procedimiento siguiente: usar etanol al 50-100 % o metanol al 50-100 % en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener el extracto alcohólico.

40 Sin limitarse a ninguna teoría, dado que el Xuezhikang mismo es un extracto alcohólico del arroz fermentado con *Monascus*, el arroz fermentado con *Monascus* puede usarse directamente como materia prima y las etapas de extracción son sustancialmente las mismas para obtener el contenido de Xuezhikang, aunque el arroz fermentado con *Monascus* tiene un contenido relativamente bajo del compuesto. Las cepas específicas del arroz fermentado con *Monascus* no están específicamente limitadas, sino que incluyen cualquier cepa de *Monascus*. Las cápsulas de Xuezhikang (por ejemplo, las producidas por Beijing Peking University WBL Biotechnology Co., Ltd.) están disponibles comercialmente en hospitales y farmacias.

45 2) Cargar el extracto refinado obtenido en la etapa 1) en una columna de gel de sílice para su separación y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de petróleo y el acetato de

etilo es de 75:25, 50:50 - 25:75, 0:100 secuencialmente.

3) Tomar la fracción de elución eluida con éter de petróleo-acetato de etilo en la relación volumétrica de 50:50 o 25:75 de la etapa 2) y someterla a cromatografía de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente.

5 4) Tomar la fracción de elución eluida con metanol-agua en la relación volumétrica de 50:50 o 75:25 de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 %, 45:55, como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

5) Liofilizar el producto de la etapa 4) para obtener un compuesto de la fórmula II.

10

[0021] El extracto alcohólico del arroz fermentado con *Monascus* puede ser el contenido de las cápsulas de Xuezhikang.

[0022] El procedimiento de preparación de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención satisface uno cualquiera o más de los puntos siguientes (1) a (5):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es preferentemente diclorometano;

(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

(3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;

20 (4) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos; y

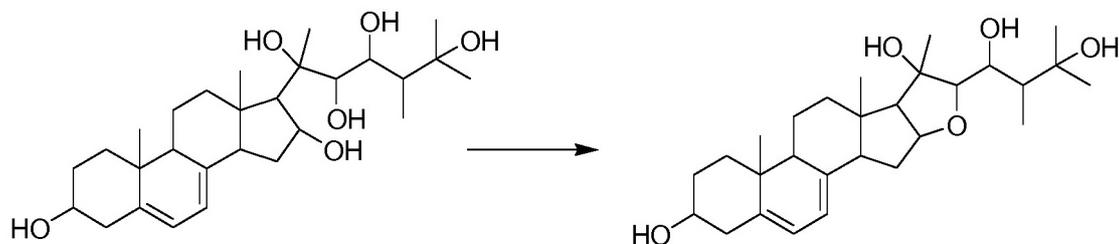
(5) en la etapa 5), las condiciones de la liofilización son: la temperatura de la trampa fría es de -40 °C a -85 °C y el grado de vacío es de 0-100 Pa; preferentemente, la temperatura de la trampa fría es de -50 °C a -82,7 °C y el grado de vacío es de 2-13 Pa; con mayor preferencia, la temperatura de la trampa fría es de -82,7 °C y el grado de vacío es de 2 Pa o la temperatura de la trampa fría es de -50 °C y el grado de vacío es de 8,5 Pa.

25

[0023] Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula II que comprende las etapas siguientes:

uso de hexahidroxiesteroide (por ejemplo, 3,16,20,22,23,25-hexahidroxiesteroide, abreviado como compuesto A) como sustrato y deshidratación en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado o cloruro de 2,4,6-triisopropilsulfonilo para generar un compuesto de la fórmula II:

30



Compuesto A

Fórmula II

35 **[0024]** El compuesto A puede prepararse por referencia al procedimiento de preparación de la publicación de patente china CN 101469014 A (el número de solicitud es 200710304346.0).

[0025] La relación molar entre el compuesto A y el ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado puede estar en el intervalo de 5:1 a 2:1. El compuesto A y el ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado en disolución en tolueno pueden reaccionar a reflujo durante 5-10 horas para obtener el compuesto de la fórmula II.

40

[0026] La relación molar entre el compuesto A y el cloruro de 2,4,6-triisopropilsulfonilo puede estar en el intervalo de 5:1 a 2:1. El compuesto A y el cloruro de 2,4,6-triisopropilsulfonilo en disolución en piridina pueden reaccionar a una temperatura de 30 °C a 70 °C durante 10 a 30 horas para obtener el compuesto de la fórmula II.

45

[0027] En ciertas condiciones, el compuesto de la fórmula II puede usarse para generar distintos derivados del mismo, por ejemplo, derivados éster como acetato o sulfonato.

[0028] Los derivados éster del compuesto de la fórmula II pueden prepararse por reacción de un compuesto de la fórmula II con un anhídrido, un cloruro de acilo, un cloruro de sulfonilo o un ácido sulfónico. Puede haber presente un catalizador útil para la reacción con anhídridos, en que dicho catalizador se selecciona entre piridina, ácido sulfúrico concentrado, NaHCO₃, etc.

Derivados ejemplares:

[0029] Tetraacetato del compuesto de la fórmula II (correspondiente a un compuesto de la fórmula I, en el que R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = -OC(=O)-CH₃), preparado por: la reacción de un compuesto de la fórmula II con anhídrido acético como agente de reacción y disolvente, en presencia de una cantidad catalítica de ácido sulfónico concentrado a 40-80 °C, durante 1-3 horas.

[0030] Tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II (correspondiente a un compuesto de la fórmula I, en el que R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = -OTs), preparado por: la reacción de un compuesto de la fórmula II con cloruro de *p*-toluenosulfonilo en una relación molar de 1:4 a 1:8, en diclorometano a 20-40 °C, en presencia de trietilamina como agente secuestrante de ácido.

[0031] Tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II (correspondiente a un compuesto de la fórmula I, en el que R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = CF₃SO₃-), preparado por: la reacción de un compuesto de la fórmula II con anhídrido trifluorometanosulfónico en una relación molar de 1:4 a 1:6, en diclorometano a 20-30 °C, en presencia de piridina, durante 1-5 horas.

[0032] Un compuesto de la fórmula II puede reaccionar en ciertas condiciones para formar un derivado éter silílico, como un éter *terc*-butildimetilsilílico del compuesto de la fórmula II. Por ejemplo:

tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II (correspondiente a un compuesto de la fórmula I, en el que R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = TBDMSO-), preparado por: la reacción de un compuesto de la fórmula II con hidruro de sodio en la relación molar de 1:4 en tetrahidrofurano y la posterior reacción con *terc*-butildimetilclorosilano a 20-40 °C, durante 1-3 horas.

[0033] Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un extracto que comprende un compuesto de la fórmula II de la presente invención, en que dicho extracto es un extracto del polvo seco contenido en cápsulas de Xuezhikang o un extracto de arroz fermentado con *Monascus*, en que dicho extracto es uno de los siguientes (1) a (3):

- (1) la fracción de elución eluida con éter de petróleo-acetato de etilo en una relación volumétrica de 50:50 o 25:75, según se prepara en las etapas anteriores 1) a 2) de la reivindicación 4; preferentemente, la relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo es 25:75;
- (2) la fracción de elución eluida con metanol-agua en una relación volumétrica de 50:50 o 75:25, según se prepara en las etapas 1) a 3) de la reivindicación 4; preferentemente, la relación volumétrica metanol-agua es 75:25; y
- (3) las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos, según se preparan en las etapas 1) a 4) de la reivindicación 4.

[0034] El compuesto de la fórmula II puede estar presente en una cantidad del 0,0001-5 % (p/p), 0,001-2 % (p/p) o 0,001-1 % (p/p). La cantidad del compuesto de la fórmula II puede regularse variando la concentración del extracto de la presente invención. La concentración puede realizarse por un procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

[0035] Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de la fórmula II y/o el extracto de la presente invención; opcionalmente comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede ser una composición farmacéutica.

[0036] Normalmente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende el 0,1-90 % en peso de un compuesto de la fórmula II y/o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición farmacéutica puede prepararse de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica. El compuesto de la fórmula I o la fórmula II y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede combinarse con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables sólidos o líquidos para obtener una forma de administración o forma de dosificación adecuada.

[0037] El compuesto de la fórmula II o la sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en una forma de dosificación unitaria. La vía de administración puede ser administración por vía intestinal o administración por vía parenteral, por ejemplo, 5 administración por vía oral, muscular, subcutánea, nasal, de la mucosa bucal, cutánea, peritoneal o rectal. La forma de dosificación para administración puede ser, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras de gotas, aerosoles, píldoras, polvos, disoluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, liposomas, agentes transdérmicos, comprimidos bucales, supositorios e inyecciones de polvos liofilizados. Las formas de dosificación para administración pueden ser 10 preparaciones normales, preparaciones de liberación sostenida, preparaciones de liberación controlada o diversos sistemas de administración particulados. Con el fin de preparar comprimidos adecuados para usar como forma de dosificación unitaria para administración, pueden usarse ampliamente diversos vehículos conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales vehículos incluyen, por ejemplo, diluyentes y absorbentes como almidón, dextrina, sulfato de calcio, lactosa, manitol, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, urea, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina, silicato de aluminio, etc.; humectantes y aglutinantes como agua, glicerol, polietilenglicol, etanol, 15 propanol, lechada de almidón, dextrina, jarabe, miel, disolución de glucosa, mucílago de acacia, mucílago de gelatina, carboximetilcelulosa de sodio, goma laca, metilcelulosa, fosfato de potasio, polivinilpirrolidona; desintegrantes como almidón seco, alginatos, polvo de agar, laminarina, bicarbonato de sodio y ácido cítrico, carbonato de calcio, polioxietileno, ésteres de ácido graso de sorbitol, dodecilsulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa; inhibidores de la desintegración como sacarosa, triestearina, manteca de cacao, aceite hidrogenado; 20 mejoradores de la absorción como sales de amonio cuaternario, dodecilsulfato de sodio; lubricantes como polvos de talco, dióxido de silicio, almidón de maíz, estearatos, ácido bórico, parafina líquida, polietilenglicol. También pueden procesarse adicionalmente para formar comprimidos recubiertos como comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de una fina membrana, comprimidos con recubrimiento entérico o comprimidos bicapa o comprimidos multicapa. Con el fin de preparar píldoras como unidad de administración, pueden usarse ampliamente 25 diversos vehículos conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos son, por ejemplo, diluyentes o absorbentes como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceite vegetal hidrogenado, polivinilpirrolidona, Gelucire, caolín, polvo de talco, etc.; aglutinantes como goma de acacia, goma de tragacanto, gelatina, etanol, miel, azúcar líquido, pasta de arroz o pasta de harina, etc.; desintegrantes como polvo de agar, almidón seco, alginatos, dodecilsulfato de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, etc. Con el fin de preparar supositorios como unidad de administración, pueden usarse ampliamente diversos vehículos conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos son, por ejemplo, 30 polietilenglicol, lecitina, manteca de cacao, alcoholes grasos, ésteres de alcoholes grasos, gelatina, glicéridos semisintéticos, etc. Con el fin de preparar cápsulas como unidad de administración, el compuesto de la fórmula I o la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, puede mezclarse con uno o más de los diversos vehículos anteriores y la mezcla obtenida puede incluirse subsiguientemente en cápsulas de gelatina dura o cápsulas blandas. El compuesto de la fórmula II o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo, como principio activo, también puede procesarse para formar microcápsulas y después suspenderse en un medio acuoso para formar una suspensión, usarse como relleno de cápsulas duras o procesarse para dar lugar a una inyección. Con el fin de preparar preparaciones inyectables como unidad de administración, por ejemplo, 40 disoluciones, emulsiones, inyecciones de polvo liofilizado y suspensiones, pueden usarse todos los diluyentes usados normalmente en la técnica, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propano-1,3-diol, alcohol isostearílico etoxilado, alcohol isostearílico polioxidado, éster de ácido graso de sorbitol y polioxietileno, etc. Además, con el fin de preparar disoluciones de inyección isotónicas, puede añadirse una cantidad adecuada de cloruro de sodio, glucosa o glicerol a las preparaciones para inyección y también pueden añadirse disolventes auxiliares convencionales, tampones, reguladores del pH, etc.

45 **[0038]** Además, en caso necesario, también pueden añadirse a las preparaciones colorantes, conservantes, perfumes, correctivos, edulcorantes u otros materiales.

[0039] La dosis del compuesto de la fórmula II o un éster, éter o sal farmacéuticamente aceptable del mismo 50 de la presente invención puede depender de numerosos factores, como las características y la gravedad de la enfermedad que ha de prevenirse o tratarse, el género, la edad, el peso corporal y la reacción individual del paciente o animal, el compuesto específico para usar, la vía de administración y la frecuencia de administración. La dosis puede administrarse en forma de dosis única o en varias series, como 2, 3 o 3 series.

55 **[0040]** El término "composición", según se usa en este documento, se refiere a un producto que comprende diversos componentes en cantidades determinadas y cualquier producto derivado directa o indirectamente de los diversos componentes en cantidades determinadas en combinación.

[0041] Los niveles de dosificación reales de los diversos componentes activos en la composición

farmacéutica de la presente invención pueden modificarse, de manera que los efectos terapéuticos esperados puedan conseguirse por medio de la cantidad resultante en relación con un paciente, una composición y un modo de administración específicos. El nivel de dosificación debe seleccionarse de acuerdo con la actividad del compuesto específico, la vía de administración, la gravedad de la enfermedad que ha de tratarse, el estado del paciente y el historial médico. Sin embargo, la práctica en la técnica es aumentar gradualmente la dosis del compuesto desde un nivel inferior al necesario para alcanzar los efectos terapéuticos deseados hasta una dosis capaz de alcanzar los efectos terapéuticos deseados.

10 **[0042]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso en la reducción o la regulación de la grasa sanguínea o en la profilaxis y/o el tratamiento de la dislipidemia, la hiperlipemia, la hipercolesterolemia o la aterosclerosis.

15 **[0043]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso como inhibidor de la HGM-CoA-reductasa.

20 **[0044]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la inhibición de la HGM-CoA-reductasa *in vitro*, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención.

[0045] Los resultados experimentales del ejemplo 1 confirman que el compuesto de la presente invención tiene actividad inhibitoria sobre la HGM-CoA-reductasa y que la actividad depende de la dosis.

25 **[0046]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de un cáncer. El cáncer puede ser cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer linfático o melanoma.

30 **[0047]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso como medicamento o agente para la inhibición de células tumorales. Las células tumorales pueden ser células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma.

35 **[0048]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la inhibición de células tumorales *in vitro*, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención. Las células tumorales pueden ser células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma. Los resultados experimentales del ejemplo 2 confirman que el compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente células tumorales.

40 **[0049]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o una enfermedad asociada con la obesidad o para uso como agente contra la obesidad. La enfermedad asociada con la obesidad puede ser hiperlipidemia, aterosclerosis, cardiopatía coronaria o diabetes.

50 **[0050]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención para uso como medicamento o agente para la inhibición de la lipasa *in vivo* o *in vitro*.

55 **[0051]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la inhibición de la lipasa, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención, el extracto de la presente invención o la composición de la presente invención. El procedimiento para la inhibición de la lipasa puede ser un procedimiento para la inhibición de la lipasa *in vivo* o *in vitro*.

[0052] Los resultados experimentales del ejemplo 3 confirman que el compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la lipasa.

[0053] En el tratamiento y/o la profilaxis y/o el tratamiento adyuvante anterior, un compuesto de la presente invención puede usarse en una cantidad eficaz, desde el punto de vista terapéutico y/o profiláctico y/o terapéutico-adyuvante, en forma del compuesto puro o en forma de sales, ésteres o éteres farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, el compuesto de la invención puede administrarse por medio de una composición farmacéutica que comprende el compuesto y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Debe entenderse que la cantidad total diaria del compuesto o la composición de la presente invención debe ser determinada por el médico, dentro del margen de las decisiones médicas fiables. En cuanto a los pacientes específicos, la cantidad terapéuticamente específica debe determinarse a partir de diversos factores, incluidas las enfermedades que han de tratarse y su gravedad, la actividad del compuesto específico usado, la composición específica usada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del paciente, el momento y la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico usado, el fármaco o fármacos administrados en combinación o simultáneamente con el compuesto específico y factores similares bien conocidos en la técnica de la medicina. Por ejemplo, un procedimiento común en la técnica es aumentar gradualmente la dosis del compuesto desde un nivel inferior al necesario para alcanzar los efectos terapéuticos deseados hasta un nivel suficiente para alcanzar los efectos terapéuticos deseados. En general, la dosis de un compuesto de la fórmula II para mamíferos, en particular humanos, puede ser de 0,001-1.000 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo, 0,01-100 mg/kg de peso corporal al día, por ejemplo, 0,01-10 mg/kg de peso corporal al día.

[0054] El compuesto de la presente invención puede prevenir y/o tratar eficazmente las diversas enfermedades y trastornos que se mencionan en la presente invención.

[0055] En la presente invención, el término “alquilo C₁-C₃” comprende metilo, etilo, propilo e isopropilo.

[0056] El término “obesidad” incluye, pero no se limita a obesidad simple (sin una causa significativa en la secreción interna ni el metabolismo, relacionada con factores hereditarios y los hábitos dietéticos), obesidad secundaria (normalmente asociada con una enfermedad subyacente concreta, por ejemplo, hiperadrenocorticismos). En tales casos, la obesidad (secundaria) puede eliminarse cuando se cura la enfermedad subyacente). La obesidad puede ser obesidad de un mamífero. El mamífero puede ser un humano o un cerdo.

[0057] El término “enfermedad asociada con la obesidad” incluye, pero no se limita a hiperlipidemia, aterosclerosis, cardiopatía coronaria y diabetes.

[0058] El término lipasa (número de clasificación enzimática: EC3.1.1.3) incluye, pero no se limita a una lipasa de un mamífero como una lipasa de un humano o una lipasa de un cerdo; la lipasa de un humano puede ser la lipasa pancreática humana y la lipasa de un cerdo puede ser la lipasa pancreática porcina.

[0059] El término “cantidad eficaz” se refiere a una dosis que puede consumir el tratamiento, la profilaxis y/o la remisión de las enfermedades o trastornos de la presente invención en un sujeto.

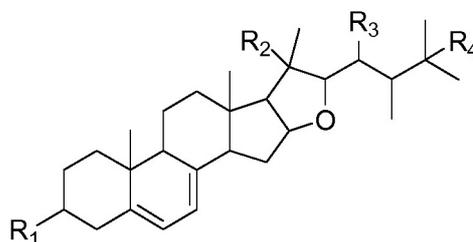
[0060] En la presente invención, si no se describe específicamente, el contenido en porcentaje de un ingrediente se refiere al porcentaje en peso (p/p).

[0061] La presente descripción se refiere además a los aspectos 1 a 22 siguientes:

1. Uso de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de un cáncer; específicamente, dicho cáncer es cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer linfático o melanoma,

1) un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

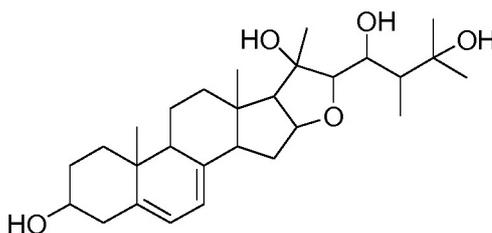
50



Fórmula I

en el que,

- 5 R₁ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O, H y alquilo C₁-C₃;
 R₂ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;
 R₃ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O, H y alquilo C₁-C₃;
 R₄ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;
 y dos, tres, cuatro o cualquiera de R₁, R₂, R₃ y R₄ son simultáneamente -OH;
 10 (2) un compuesto de la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



Fórmula II ;

- (3) un extracto que comprende un compuesto de la fórmula II; y
 15 (4) una composición que comprende uno cualquiera de los puntos anteriores (1)-(3).
2. Uso de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) del aspecto 1 en la preparación de un medicamento o un agente para la inhibición de células tumorales *in vivo* o *in vitro*; específicamente, dichas células tumorales son células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma.
 20
3. El uso de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en que el extracto del punto (3) es un extracto de arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto de un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang).
- 25 4. El uso de acuerdo con el aspecto 3, en que el extracto del punto (3) es una fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75), según se prepara en las etapas siguientes 1) a 2); o una fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 3); o las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos según se preparan en las etapas siguientes 1) a 4):
- 30 1) proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang, que es un polvo seco), llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado;
- 35 2) someter el extracto refinado obtenido en la etapa 1) a separación cromatográfica en una columna de gel de sílice y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de

petróleo y el acetato de etilo es de 75:25, 50:50 - 25:75, 0:100 secuencialmente;

3) tomar la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) de la etapa 2) y someterla a separación cromatográfica de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50 - 75:25, 100:0 secuencialmente; y

5

4) tomar la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

10

5. El uso de acuerdo con el aspecto 4, caracterizado por uno cualquiera o más de los puntos (1) a (8):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es diclorometano;

(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

15

(3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;

(4) en la etapa 2), la relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo es 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente;

(5) en la etapa 3), se toma la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 o 25:75) de la etapa 2);

20

(6) en la etapa 3), la relación volumétrica metanol-agua es 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente;

(7) en la etapa 4), se toma la fracción de elución de metanol-agua (50:50 o 75:25) de la etapa 3);

(8) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

6. El uso de acuerdo con el aspecto 1 o 2, en que la composición del punto (4) comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

7. Un procedimiento para la inhibición de células tumorales *in vivo* o *in vitro*, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) del aspecto 1; específicamente, dichas células tumorales son células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma.

30

8. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 7, en que el extracto del punto (3) es un extracto de arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto de un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang).

35 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que el extracto del punto (3) es la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 2); o la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 3); o las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos según se preparan en las etapas siguientes 1) a 4):

40 1) proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang, que es un polvo seco), llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado;

45

2) someter el extracto refinado obtenido en la etapa 1) a separación cromatográfica en una columna de gel de sílice y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de petróleo y el acetato de etilo es de 75:25, 50:50 - 25:75, 0:100 secuencialmente;

3) tomar la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) de la etapa 2) y someterla a separación cromatográfica de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50 - 75:25, 100:0 secuencialmente; y

50

4) tomar la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

55

10. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 9, caracterizado por uno cualquiera o más de los puntos (1) a (8):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es diclorometano;

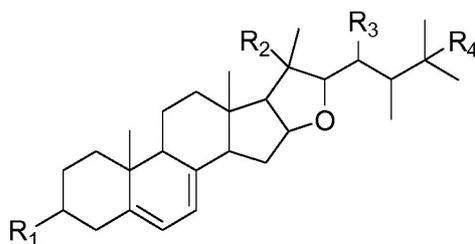
(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

- (3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;
 (4) en la etapa 2), la relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo es 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente;
 5 (5) en la etapa 3), se toma la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 o 25:75) de la etapa 2);
 (6) en la etapa 3), la relación volumétrica metanol-agua es 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente;
 (7) en la etapa 4), se toma la fracción de elución de metanol-agua (50:50 o 75:25) de la etapa 3);
 (8) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

10 11. El procedimiento del aspecto 7, en que la composición del punto (4) comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Uso de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o una enfermedad asociada con la obesidad o un agente
 15 contra la obesidad; específicamente, dicha enfermedad asociada con la obesidad es hiperlipidemia, aterosclerosis, cardiopatía coronaria o diabetes:

1) un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



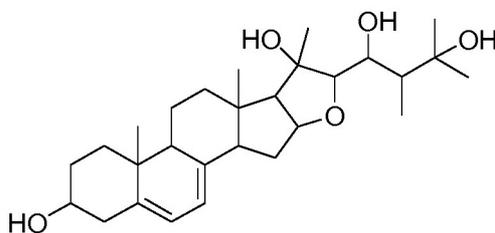
Fórmula I

20

en el que,

- R₁ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O, H y alquilo C₁-C₃;
 25 R₂ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;
 R₃ se selecciona del grupo que consta de -OH, =O, H y alquilo C₁-C₃;
 R₄ se selecciona del grupo que consta de -OH, H y alquilo C₁-C₃;
 y dos, tres, cuatro o cualquiera de R₁, R₂, R₃ y R₄ son simultáneamente -OH;

30 (2) un compuesto de la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



Fórmula II;

- (3) un extracto que comprende un compuesto de la fórmula II; y
 35 (4) una composición que comprende uno cualquiera de los puntos anteriores (1)-(3).

13. Uso de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) del aspecto 12 en la preparación de un medicamento o un agente para la inhibición de la lipasa *in vivo* o *in vitro*.

14. El uso de acuerdo con el aspecto 12 o 13, en que el extracto del punto (3) es un extracto de arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto de un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang).

15. El uso de acuerdo con el aspecto 14, en que el extracto del punto (3) es la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75), según se prepara en las etapas siguientes 1) a 2); o la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 3); o las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos según se preparan en las etapas siguientes 1) a 4):

1) proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang, que es un polvo seco), llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado;

2) someter el extracto refinado obtenido en la etapa 1) a separación cromatográfica en una columna de gel de sílice y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de petróleo y el acetato de etilo es de 75:25, 50:50 - 25:75, 0:100 secuencialmente;

3) tomar la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) de la etapa 2) y someterla a separación cromatográfica de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50 - 75:25, 100:0 secuencialmente; y

4) tomar la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

16. El uso de acuerdo con el aspecto 15, caracterizado por uno cualquiera o más de los puntos (1) a (8):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es diclorometano;

(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

(3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;

(4) en la etapa 2), la relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo es 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente;

(5) en la etapa 3), se toma la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 o 25:75) de la etapa 2);

(6) en la etapa 3), la relación volumétrica metanol-agua es 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente;

(7) en la etapa 4), se toma la fracción de elución de metanol-agua (50:50 o 75:25) de la etapa 3);

(8) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

17. El uso de acuerdo con el aspecto 12 o 13, en que la composición del punto (4) comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Un procedimiento para la inhibición de la lipasa *in vivo* o *in vitro*, que comprende una etapa de uso de una cantidad eficaz de uno cualquiera de los puntos (1) a (4) del aspecto 12.

19. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 18, en que el extracto del punto (3) es un extracto de arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto de un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang).

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en que el extracto del punto (3) es la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 2); o la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) según se prepara en las etapas siguientes 1) a 3); o las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos según se preparan en las etapas siguientes 1) a 4):

1) proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* (por ejemplo, el contenido de cápsulas de Xuezhikang, que es un polvo seco), llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de

diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado;

2) someter el extracto refinado obtenido en la etapa 1) a separación cromatográfica en una columna de gel de sílice y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de petróleo y el acetato de etilo es de 75:25, 50:50 - 25:75, 0:100 secuencialmente;

3) tomar la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 - 25:75) de la etapa 2) y someterla a separación cromatográfica de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50 - 75:25, 100:0 secuencialmente; y

4) tomar la fracción de elución de metanol-agua (50:50 - 75:25) de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

21. El procedimiento de acuerdo con el aspecto 20, caracterizado por uno cualquiera o más de los puntos (1) a (8):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es diclorometano;

(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

(3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;

(4) en la etapa 2), la relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo es 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente;

(5) en la etapa 3), se toma la fracción de elución de éter de petróleo-acetato de etilo (50:50 o 25:75) de la etapa 2);

(6) en la etapa 3), la relación volumétrica metanol-agua es 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente;

(7) en la etapa 4), se toma la fracción de elución de metanol-agua (50:50 o 75:25) de la etapa 3);

(8) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos.

22. El procedimiento del aspecto 18, en que la composición del punto (4) comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Efectos beneficiosos de la invención

[0062]

1. El compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la HMG-CoA-reductasa y la actividad de inhibición de la HGM-CoA-reductasa es dependiente de la dosis; como resultado, el compuesto de la presente invención es un fármaco potencial para la reducción o la regulación de la grasa sanguínea o para la profilaxis y/o el tratamiento de la dislipidemia, la hiperlipemia, la hipercolesterolemia o la aterosclerosis.

2. El compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la proliferación de células cancerosas (células tumorales) y la actividad inhibitoria presenta una relación concentración-efecto; como resultado, el compuesto de la presente invención es un fármaco potencial para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante del cáncer.

3. El compuesto de la presente invención puede inhibir eficazmente la actividad de la lipasa y la actividad inhibitoria presenta una relación concentración-efecto; como resultado, el compuesto de la presente invención es un fármaco potencial para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o enfermedades asociadas con la obesidad.

Breve descripción de los dibujos

[0063]

Figura 1: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células HCT116.

Figura 2: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células H22

Figura 3: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células HepG2

Figura 4: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células S180

Figura 5: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células YAC-1

Figura 6: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células THP1

Figura 7: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células U937

Figura 8: curva de inhibición de un compuesto de la fórmula II sobre el crecimiento de células B16-F10

Figura 9: curva de trabajo de la absorbancia del ácido oleico.

Ejemplos específicos de realización de la invención

[0064] La presente invención se ilustra adicionalmente con los ejemplos siguientes. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que los ejemplos siguientes se usan meramente para ilustrar la presente invención, más bien que para limitar el alcance de la protección de la presente invención. En los casos en los que en este documento no se describe específicamente una tecnología o unas condiciones en concreto, la tecnología o las condiciones son una tecnología o unas condiciones conocidas en la técnica o de acuerdo con una especificación de producto. En los casos en los que en este documento no se describe el fabricante de reactivos e instrumentos, el reactivo/instrumento es un producto convencional disponible comercialmente.

Ejemplo 1: Preparación del compuesto de la fórmula II (1)

[0065] Etapas de operación:

- 1) Se proporcionó aproximadamente 1 kg de polvo seco del contenido de cápsulas de Xuezhikang (producidas por Beijing Peking University WBL Biotechnology Co., Ltd.) y se llevó a cabo tres veces una extracción ultrasónica con diclorometano como disolvente en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez; se combinaron todas las disoluciones extraídas, se concentraron y se sometieron a la recuperación del disolvente a presión reducida, para obtener 91 g de extracto refinado en diclorometano.
- 2) Se cargaron 50 g del extracto refinado en diclorometano en una columna de gel de sílice para su separación cromatográfica y la elución se realizó con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo. La relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo fue de 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente.
- 3) Se tomaron 5,0 g de la fracción de éter de petróleo-acetato de etilo (25:75) y se separaron mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18; la elución se realizó con un gradiente de metanol-agua (10:90 - 100:0) para obtener cuatro fracciones (metanol-agua 10:90, 50:50, 75:25, 100:0), en que 1,3 g de la fracción de elución de metanol-agua (75:25) se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil, una tasa de flujo de 4 ml/min y una columna cromatográfica semipreparativa C18 (10 x 250 mm, 5 µm) como fase estacionaria; la longitud de onda de detección del detector DAD fue de 270 nm; se recogieron los picos cromatográficos a 9,2 minutos, acumulando los de varias veces y después se concentraron y se liofilizaron para obtener aproximadamente 40 mg del compuesto.

Ejemplo 2: Preparación del compuesto de la fórmula II (2)

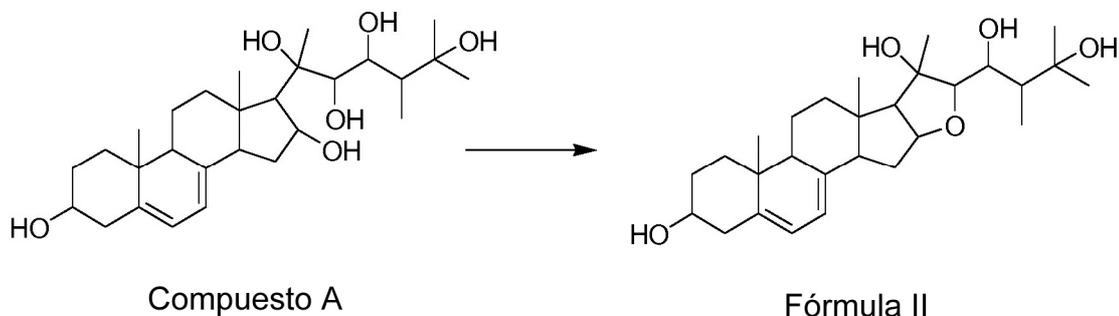
[0066] Etapas de operación:

- 1) Se proporcionaron 5 kg de polvo seco de arroz fermentado con *Monascus* y se llevó a cabo tres veces una extracción ultrasónica con diclorometano como disolvente en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez; se combinaron todas las disoluciones extraídas, se concentraron y se sometieron a la recuperación del disolvente a presión reducida, para obtener 78 g de extracto refinado en diclorometano.
- 2) Se cargaron 30 g del extracto refinado en diclorometano en una columna de gel de sílice para su separación cromatográfica y la elución se realizó con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo. La relación volumétrica éter de petróleo-acetato de etilo fue de 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente.
- 3) Se tomaron 3,0 g de la fracción de éter de petróleo-acetato de etilo (25:75) y se separaron mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18; la elución se realizó con un gradiente de metanol-agua (10:90 - 100:0) para obtener cuatro fracciones (metanol-agua 10:90, 50:50, 75:25, 100:0), en que 0,8 g de la fracción de elución de metanol-agua (75:25) se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 % (45:55) como fase móvil, una tasa de flujo de 4 ml/min y una columna cromatográfica semipreparativa C18 (10 x 250 mm, 5 µm) como fase estacionaria; la longitud de onda de detección del detector DAD fue de 270 nm; se recogieron los picos cromatográficos a 9,2 minutos, acumulando los de varias veces y después se concentraron y se liofilizaron para obtener aproximadamente 25 mg del compuesto.

Ejemplo 3: Preparación del compuesto de la fórmula II (3)

[0067] Se añadió tolueno (350 ml) a un matraz de reacción, después se añadieron el compuesto A (4,4 g, 9,2 mol) y ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (0,59 g, 3,1 mol), se calentó a reflujo y el agua se eliminó por destilación azeotrópica durante 7 horas; después de la reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, el

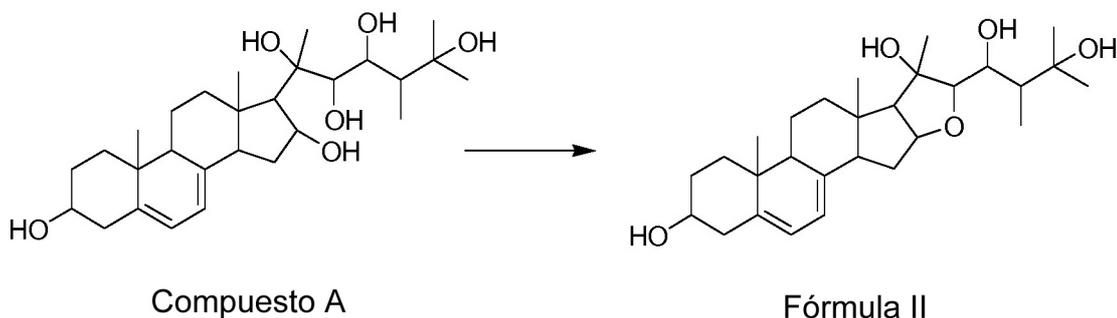
disolvente se eliminó a presión reducida y después se llevó a cabo una purificación por cromatografía en columna de gel de sílice para obtener un compuesto aceitoso y pegajoso, es decir, el compuesto de la fórmula II.



5

Ejemplo 4: Preparación del compuesto de la fórmula II (4)

[0068] Se añadió piridina (100 ml) a un matraz de reacción, después se añadieron el compuesto A (4,4 g, 9,2 mmol) y cloruro de 2,4,6-triisopropilsulfonylo (0,93 g, 3,1 mmol), se calentó y se dejó reaccionar a 50 °C durante 20 horas; el disolvente se eliminó a presión reducida y después se llevó a cabo una purificación por cromatografía en columna de gel de sílice para obtener un compuesto aceitoso y pegajoso, es decir, el compuesto de la fórmula II.



15 Ejemplo 5: Identificación de la estructura de los compuestos

[0069] Las muestras usadas fueron los compuestos preparados en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Los resultados confirmaron que todos los compuestos preparados en los ejemplos 1-4 eran el mismo, es decir, el compuesto de la fórmula II.

20

1. Datos físicos y químicos de los compuestos

[0070] Polvo blanco, actividad óptica: $[\alpha]^{25}_D -50,00$ (c 0.118, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 1,1$); el espectro de UV mostró tres picos de absorción máxima por separado, $\lambda_{\text{max}} (\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}) = 271,6 \text{ nm}, 282,2 \text{ nm}, 293,8 \text{ nm}$.

25

[0071] Espectro IR-TF (KBr, cm^{-1}): 3.392 (-OH), 2.969, 2.933 (hidrocarburo saturado), 1.652, 1.647 (C=C), 1.456, 1.378 (gem-dimetilo).

2. Determinación de la fórmula molecular

30

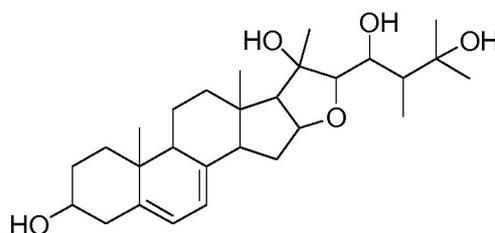
[0072] El análisis de EM-IES de alta resolución dio una m/z de 483,3104 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculada 483,3081, error 2,3), de manera que el peso molecular deducido para el compuesto fue de 460,32. Los análisis de RMN ^1H y RMN ^{13}C mostraron que había 40 señales de hidrógeno y 28 señales de carbono. El análisis de DEPT mostró que había 6 carbonos cuaternarios, 10 CH, 6 CH_2 y 6 CH_3 . En RMN ^{13}C , se observaron 4 señales de carbono olefínico a 117,2

ppm, 119,6 ppm, 139,1 ppm y 140,6 ppm. El análisis de la combinación de HSQC y RMN ^{13}C mostró que había 6 carbonos oxigenados unidos a átomos de oxígeno a 70,5 ppm, 72,4 ppm, 74,5 ppm, 80,4 ppm, 83,4 ppm y 84,4 ppm. A la vista del peso molecular con los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y DETP combinados, si el compuesto tuviera 6 átomos de oxígeno, su peso molecular sería mayor de 460,32, por lo que pudo deducirse que el compuesto debería tener 5 átomos de oxígeno y 4 átomos de hidrógeno que no presentaban señales en el espectro de RMN ^1H . Por consiguiente, de entre los 5 átomos de oxígeno anteriores, 4 átomos de oxígeno pertenecerían a 4 hidroxilos, mientras que el quinto oxígeno existiría en forma de éter. De acuerdo con el análisis anterior, pudo determinarse que la molécula tenía 28 átomos de carbono, 44 átomos de hidrógeno y 5 átomos de oxígeno y que la fórmula molecular era $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_5$.

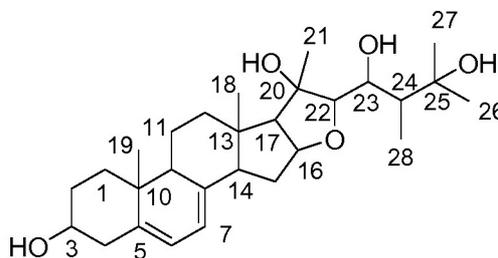
10

3. Determinación de la estructura química

[0073] Al analizar los espectros de RMN ^{13}C y DEPT del compuesto se observó que había 28 átomos de carbono, de los cuales, 6 átomos de carbono eran formas metílicas. Dado que tres picos de absorción máxima, a 15 271,6 nm, 282,2 nm y 293,8 nm, en el espectro de UV eran sustancialmente idénticos a los del ergosterol, se determinó en primer lugar que el compuesto tenía la estructura del ergosterol. Basado en el cálculo de la fórmula molecular, su grado de insaturación era de 7. Por consiguiente, pudo deducirse que además de los 6 grados de insaturación que incluían los 2 enlaces dobles y 4 anillos de la estructura del ergosterol, el compuesto tenía un grado de insaturación adicional y que este debía ser un anillo, de manera que este anillo pudo determinarse como un epoxi 20 formado con el quinto átomo de oxígeno como centro. Los espectros de HSQC y HMBC se analizaron en combinación y mostraron que los 6 átomos de carbono unidos a átomos de oxígeno se asignaban individualmente a 4 átomos de carbono unidos a 4 hidroxilos (70,5, 72,4, 74,5, 80,4 ppm) y 2 átomos de carbono unidos al átomo de oxígeno restante (83,8, 84,4 ppm). El análisis en profundidad de los espectros de HMBC mostró que el quinto sistema de anillo era un anillo de 5 miembros que constaba de C-16 (83,8 ppm), C-17 (66,9 ppm), C-20 (80,4 ppm), 25 C-22 (84,4 ppm) y un átomo de oxígeno. Esto satisfacía el grado de insaturación y el número de átomos de carbono unidos a átomos de oxígeno. El análisis adicional del espectro de masas dio el peso molecular y la fórmula molecular, lo que confirmó el análisis anterior. En resumen, el análisis anterior indicó que el nuevo compuesto era: 16,22-epoxi ergosta-5,7-dieno-3,20,23,25-tetraol. La estructura química se muestra en la fórmula II a continuación:



Fórmula II



Fórmula II' .

30

4. Datos de RMN del compuesto de la fórmula II

[0074] Los datos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Datos de RMN del compuesto de la fórmula II (600 MHz, CDCl₃, J en Hz)

N.º	RMN ¹ H, (ppm)	RMN ¹³ C, (ppm)	DEPT	HMBC (H→C)
1	1,28 (1H, m) 1,90 (1H, m)	38,4	CH ₂	-
2	1,48 (1H, m) 1,89 (1H, m)	32,1	CH ₂	-
3	3,62 (1H, m)	70,5	CH	-
4	2,39 (1H, m) 2,46 (1H, m)	40,9	CH ₂	-
5	-	140,6	C	-
6	5,56 (1H, m)	119,6	CH	4,7
7	5,38 (1H, m)	117,2	CH	-
8	-	139,1	C	-
9	1,95 (1H, m)	46,0	CH	-
10	-	37,3	C	-
11	1,60 (1H, m) 1,77 (1H, m)	20,8	CH ₂	-
12	1,25 (1H, m) 2,08 (1H, m)	39,3	CH ₂	-
13	-	43,0	C	-
14	1,87 (1H, m)	54,0	CH	13
15	1,75 (1H, m) 2,23 (1H, m)	34,2	CH ₂	14
16	4,66 (1H, m)	83,8	CH	13, 14, 15
17	1,90 (1H, m)	66,9	CH	20, 22
18	1,12 (3H, s)	14,6	CH ₃	27, 12, 13, 14
19	0,96 (3H, s)	16,6	CH ₃	9, 10, 1
20	-	80,4	C	-
21	1,43 (3H, s)	27,8	CH ₃	20, 22, 24
22	4,19 (1H, sa)	84,4	CH	21, 24, 23, 20
23	3,66 (1H, sa, J = 9,0 Hz)	72,4	CH	28, 24, 25, 20
24	1,75 (1H, m)	46,4	CH	27, 28
25	-	74,5	C	-
26	1,20 (3H, s)	30,3	CH ₃	25, 24
27	1,23 (3H, s)	24,0	CH ₃	25, 24
28	0,82 (3H, d, J = 7,2 Hz)	14,0	CH ₃	23, 25, 24

Notación: "-" representa que la señal en cuestión no existe.

5 Ejemplo 6: Preparación del tetraacetato del compuesto de la fórmula II

[0075] La mezcla del compuesto A (4,23 g, 9,2 mmol) y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado en 20 ml de anhídrido acético se calentó en un baño de agua a 50 °C, se dejó reaccionar durante dos horas, se enfrió, se le añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo tres veces con tolueno; la capa orgánica se evaporó con rotación para obtener un producto, que después se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el tetraacetato del compuesto de la fórmula II. Para evitar la reversión de la configuración pudo usarse una catálisis de piridina.

Ejemplo 7: Preparación del tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II

15 [0076] A un matraz seco de 25 ml se añadieron el compuesto de la fórmula II (4,23 g, 9,2 mmol) y 50 ml de diclorometano seco, la mezcla se enfrió a 0 °C y se le añadieron cloruro de *p*-tolilsulfonilo (10,56 g, 55,3 mmol) y trietilamina (7,46 g, 73,6 mmol) gota a gota con agitación. Después de finalizar la adición gota a gota, la disolución de la mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante una hora, se lavó con agua (50 ml x 3), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se secó por evaporación para obtener un producto crudo que se sometió a una
20 cromatografía en columna rápida para obtener el tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II.

Ejemplo 8: Preparación del tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II

[0077] El compuesto de la fórmula II (4,23 g, 9,2 mmol) y piridina (4,36 g, 55,2 mmol) se añadieron 5 secuencialmente a un matraz que contenía 50 ml de diclorometano seco con agitación, después se añadió lentamente gota a gota sulfonato de trifluorometilo (12,46 g, 44,2 mmol) a temperatura ambiente (25 °C) en un plazo de aproximadamente 20 minutos, se dejó reaccionar durante 2 horas, se concentró por filtración y el residuo se sometió a separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II.

10

Ejemplo 9: Preparación del tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II

[0078] A un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadieron 20 ml de THF y 1,26 g de NaH (contenido: 70 %, 36,8 mmol) en aceite mineral y se agitó para dispersar suficientemente el NaH; el compuesto de la fórmula II 15 (4,23 g, 9,2 mmol) en THF (10 ml) se añadió gota a gota y se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación vigorosa durante 1 hora. Se disolvió TBDMS-C1 (*terc*-butildimetilclorosilano) (5,53 g, 36,8 mmol) en 10 ml de THF y se añadió gota a gota a la disolución de reacción anterior con agitación; la velocidad de la adición gota a gota se controló para que la temperatura de la reacción no se elevara demasiado; después de finalizar la adición gota a gota, la reacción se dejó continuar a temperatura ambiente con agitación durante 1,5 horas. La disolución de 20 reacción se vertió en agua y se extrajo con diclorometano; la fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se lavó con salmuera saturada y se secó con sulfato de sodio anhidro. El filtrado se concentró y se separó mediante cromatografía en columna para obtener el tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II.

Ejemplo experimental 1: Prueba de actividad de inhibición de la HMG-CoA-reductasa

25

1. Materiales de prueba

1.1 Fármacos

30 Compuesto de la fórmula II: preparado en los ejemplos 1-4.

[0079] Muestra estándar de lovastatina: adquirida de Sigma.

1.2 Enzimas

35

[0080] Microsomas de hígado de rata (HMG-CoA-reductasa): pudieron ser disponibles comercialmente o preparados por el procedimiento de preparación siguiente: extracción del hígado de una rata macho, lavado con una disolución tampón de KESD, centrifugación a 1.200 g durante 15 minutos, recogida del sobrenadante, después centrifugación a 105.000 dos veces, durante 90 minutos cada vez y recogida del depósito de centrifugación. Al 40 depósito de centrifugación se le añadió el 8,3 % de glicerol y se calentó en un baño a 37 °C durante 1 hora. El producto crudo de microsomas de hígado de rata se purificó con sulfato de amonio saturado y se recogió el 35-50 % de la fracción purificada. La fracción purificada obtenida pudo almacenarse en un congelador a -80 °C.

1.3 Reactivos

45

[0081] Cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, ácido etilendiaminotetraacético, ditiotreititol: adquiridos de Beijing Chemical Reagents Co., Ltd.; dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH): adquirido de Merk; 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA (HMG-CoA): adquirida de Sigma.

50 2. Procedimientos de prueba

[0082] El compuesto de la fórmula II se disolvió en una disolución de etanol al 75 %, con una concentración inicial de 8,0 mg/l, y se diluyó en gradiente para alcanzar 4,0 mg/l, 2,0 mg/l y 1,0 mg/l; como control positivo se usó lovastatina, disuelta con una disolución de etanol al 75 % para alcanzar la concentración de 2,0 mg/ml; en el sistema 55 de prueba, el volumen total fue de 250 µl y las concentraciones de los ingredientes fueron, individualmente: cloruro de potasio 200 mM, dihidrogenofosfato de potasio 160 mM, ácido etilendiaminotetraacético 4 mM, ditiotreititol 10 mM, la concentración individual del dinucleótido de nicotinamida y adenina y de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A como los dos sustratos fue de: 200 µM y 50 µM, pH 6,8; se añadieron 30 µl de enzima y a 4 grupos de prueba individuales se añadieron 10 µl de disoluciones del nuevo compuesto en diferentes concentraciones; al grupo del control positivo

se le añadieron 10 µl de la disolución de lovastatina y al grupo del control blanco se le añadieron 10 µl de una disolución de etanol al 75 %; los cambios dinámicos de la DO₃₄₀ se detectaron mediante un aparato Versamax ELISA a 37 °C. La tasa de disminución de la DO₃₄₀ (expresada como valor de la pendiente) detectada en un plazo de 5 minutos se usó para evaluar la actividad de la HMG-CoA-reductasa y después para evaluar la actividad del inhibidor enzimático y los resultados se muestran en la tabla 2.

3. Resultados de la prueba

[0083] Los resultados se muestran en la tabla 2.

10

Tabla 2: Resultados de la prueba de actividad de los inhibidores enzimáticos

Nombre de la muestra	Concentración del inhibidor (mg/ml)	Volumen del inhibidor (µl)	Concentración final en el sistema (µg/ml)	Pendiente	Tasa de inhibición (%)
Control blanco	-	-	-	16,0	-
Lovastatina	2,0	10	80	7,3	54,4
Compuesto de la fórmula II	8,0	10	320	7,5	53,1
	4,0	10	160	8,7	45,6
	2,0	10	80	11,3	29,4
	1,0	10	40	13,7	14,4

* El control blanco fue disolvente; lovastatina fue el control positivo.

[0084] Los resultados de la prueba demostraron que el compuesto de la presente invención, especialmente el compuesto de la fórmula II, tenía un efecto inhibitorio sobre la actividad de la HMG-CoA-reductasa y presentaba una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 250 µg/ml, lo que indicó que el compuesto tenía buenos efectos inhibitorios sobre la actividad de la HMG-CoA-reductasa.

[0085] Estudios adicionales demostraron que los derivados éster o derivados éter del compuesto de la fórmula II, por ejemplo, "tetraacetato del compuesto de la fórmula II", "tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II", "tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II" y "tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II", según se preparan en los ejemplos 6-9, también tenían una actividad similar de inhibición de la HMG-CoA-reductasa.

Ejemplo experimental 2: Prueba de inhibición de células cancerosas con el compuesto de la fórmula II

25

1. Materiales de prueba

1.1 Líneas celulares

[0086] HCT116 y H22, adquiridas del banco coreano de líneas celulares, Seúl, Corea; S180, HepG-2, YAC-1, Thp1, U937 y B16-F10, adquiridas del banco de células del Comité de la Colección de Cultivos Tipo de la Academia China de las Ciencias.

1.2 Fármacos

35

[0087] El compuesto nuevo (compuesto de la fórmula II) preparado en los ejemplos 1-4.

1.3 Reactivos

[0088] MTT se adquirió de Amresco; RPMI1640 y los dos antibióticos se adquirieron de Sigma; el suero bovino fetal (FBS) se adquirió de Gibco en los EE. UU.; todos los demás reactivos fueron de calidad analítica y producidos en China.

2. Procedimientos de prueba

45

[0089] Se inocularon células cancerosas en fase de crecimiento exponencial en una placa de 96 pocillos, 2 x 10⁴ células/pocillo, se les añadieron los fármacos hasta concentraciones finales de dichos fármacos de: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 7,8124 µg/ml y se cultivaron a 37 °C con el 5 % de CO₂ en un incubador de células

durante 72 horas, al cabo de las cuales se les añadió MTT, 10 µl/pocillo, y se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 4 horas; el medio de cultivo se retiró, se añadieron 150 µl de DMSO o isopropanol acidificado, se agitó por vibración durante 5 minutos y después se midieron los valores de la DO a una longitud de onda de 570 nm. Esto se repitió tres veces y se preparó un control blanco. Estas líneas celulares usaron el mismo medio de cultivo, es decir el medio de cultivo RPMI1640 que contenía el 10 % del suero bovino fetal y el 1 % de los dos antibióticos (penicilina y estreptomycin).

[0090] Fórmula de cálculo:

10 Tasa de supervivencia celular = (valor DO del grupo de prueba/valor DO del grupo de control) x 100 %.

[0091] Para las etapas de la prueba, también puede hacerse referencia a YANG Xiuwei y col., "Screening for antitumor activities of strychnos alkaloids in vitro", Journal of Modern Chinese Medicine, 2006, 8(9): 11-13.

15 3. Resultados de la prueba

3.1 Actividad del compuesto de la fórmula II contra el cáncer (cáncer de colon) *in vitro*

[0092] Los resultados se muestran en la figura 1. Los resultados demostraron que el compuesto de la fórmula II tenía un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon humano HCT116 y presentaba una relación concentración-efecto. Pudo apreciarse que este compuesto tenía potencial para la profilaxis y el tratamiento del cáncer de colon.

3.2 Actividad del compuesto de la fórmula II contra el cáncer (cáncer de hígado) *in vitro*

25

[0093]

3.2.1 Como se muestra en la figura 2, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular de hepatoma de ratón H22 y presentó una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 50 µg/ml, lo que sugirió que este compuesto tenía un buen efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de hepatoma de ratón.

3.2.2 Como se muestra en la figura 3, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular de hepatoma humano Hep22 y presentó una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 200 µg/ml, lo que sugirió que este compuesto tenía un buen efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de hepatoma humano.

3.2.3 Como se muestra en la figura 4, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular de sarcoma de ratón S180 y presentó una relación concentración-efecto.

[0094] Pudo apreciarse que este compuesto tenía potencial para la profilaxis y el tratamiento del cáncer de hígado.

3.3 Actividad del compuesto de la fórmula II contra el cáncer (linfoma) *in vitro*

[0095]

45

3.3.1 Como se muestra en la figura 5, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células de linfoma de ratón YAC-1 y presentó una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 62,5 µg/ml, lo que sugirió que este compuesto tenía un buen efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de linfoma de ratón.

50 3.3.2 Como se muestra en la figura 6, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células de linfoma monocítico humano THP1 y presentó una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 250 µg/ml, lo que sugirió que este compuesto tenía un buen efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de linfoma monocítico humano. Figura 6.

55 3.3.3 Como se muestra en la figura 7, el compuesto de la fórmula II tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células de linfoma histocítico humano U937 y presentó una relación concentración-efecto. Su valor CI₅₀ fue de aproximadamente 50 µg/ml, lo que sugirió que este compuesto tenía un buen efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células de linfoma histocítico humano.

[0096] Pudo apreciarse que este compuesto tenía potencial para la profilaxis y el tratamiento del cáncer

linfático (linfoma).

3.4 Actividad del compuesto de la fórmula II contra el cáncer (melanoma) *in vitro*

5 **[0097]** Los resultados se muestran en la figura 8. Los resultados demostraron que el compuesto de la fórmula II tenía un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células de melanoma de ratón B16-F10 y presentaba una relación concentración-efecto. Su valor CI_{50} fue de aproximadamente 62,5 $\mu\text{g/ml}$, lo que sugirió que este compuesto tenía potencial para la profilaxis y el tratamiento del melanoma.

10 **[0098]** En resumen, el compuesto de la presente invención, especialmente el compuesto de la fórmula II, tuvo efectos inhibitorios eficaces sobre numerosos tipos de células tumorales y es un fármaco potencial para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante del cáncer.

15 **[0099]** Estudios adicionales demostraron que los derivados éster o derivados éter del compuesto de la fórmula II, por ejemplo, "tetraacetato del compuesto de la fórmula II", "tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II", "tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II" y "tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II", según se preparan en los ejemplos 6-9, también tenían una actividad similar de inhibición de células tumorales y eran fármacos potenciales para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante del cáncer.

20

Ejemplo experimental 3: Prueba de actividad de inhibición de la lipasa

1. Materiales de prueba

25 1.1 Fármacos

El compuesto de la fórmula II.

30 **[0100]** Orlistat: adquirido de Golden Elephant Pharmacy.

1.2 Enzimas

[0101] Lipasa pancreática porcina: adquirida de Sigma.

35 1.3 Reactivos

[0102] Ácido oleico: adquirido de Sigma.

40 **[0103]** Tolueno, aceite de oliva, piridina, acetato de cobre, NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 : todos de pureza analítica y producidos en China.

2 Procedimientos de prueba

45 **[0104]** Las etapas se muestran a continuación y también puede hacerse referencia a JIANG Huifang, WANG Yaqin, LIU Chunuo, Comparison and improvement of three methods for measurement of lipase activity, Journal of Chemistry & Bioengineering, 2007, 24(8): 72-75; y ZHU Xiaoqing, LU Jingci, HUO Shixin y col., Inhibitory Effect on Lipase of Alkaloid Derived from Lotus Leaf, Journal of Shanghai University (Natural Science), 2007, 13(1): 85-87.

50 2.1 Preparación de una curva de trabajo de la absorbancia óptica de un ácido graso: se tomaron 4 ml de cada una de una serie de disoluciones de ácido oleico en tolueno con diferentes concentraciones (0-3,5 mmol/l, con concentraciones individuales de 0, 0,225, 0,45, 0,675, 0,9, 1,125, 1,35, 1,8, 2,25, 2,7 y 3,5 mmol/l) y se pusieron 4 ml de cada uno en un matraz cónico, se les añadió 1 ml de un agente revelador de color y se agitó con fuerza magnética durante 3 minutos; las moléculas de ácido oleico y los iones de cobre formaron un compuesto complejo verde y después de una centrifugación, se tomó la fase orgánica de la capa superior y se midió a 714 nm para
55 determinar la absorbancia óptica.

2.2 La disolución enzimática fue una disolución de lipasa pancreática de 0,5 mg/ml; la disolución tampón fue una disolución tampón de fosfato de NaH_2PO_4 - K_2HPO_4 0,07 M (pH 7,0); el agente revelador de color fue una disolución de acetato de cobre al 5 %, regulada con piridina para tener un pH de 6,1.

2.3 Medición de la actividad de la lipasa:

se precalentaron 3 ml de la disolución tampón de fosfato 0,07 M y 1 ml de aceite de oliva a una temperatura constante de 37 °C durante 5 minutos en un baño de agua con agitación con un agitador magnético, se añadieron 1,3 ml de la disolución enzimática (el control negativo fue aquel sin inhibidor enzimático; el control positivo es aquel al que se añadieron 100 µl de la disolución de orlistat de 0,1 mg/ml; se añadieron 0,6, 0,9, 1,1, 1,3, 1,8 mg/ml de las disoluciones del compuesto de la fórmula II, en cada caso 100 µl) y se agitó con fuerza magnética durante 10 minutos; inmediatamente se añadieron 8 ml de tolueno, se agitó continuamente durante 2 minutos y la reacción se terminó y se extrajo el ácido oleico generado. Las disoluciones se transfirieron a un tubo de centrifuga, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos y la fase orgánica y la fase acuosa se separaron y clarificaron. Se tomaron 4 ml de la fase orgánica de la capa superior y se pusieron en un matraz cónico pequeño, se añadió 1 ml del agente revelador de color y se agitó con un agitador magnético durante 3 minutos; el ácido oleico generado reaccionó con los iones de cobre para formar un compuesto complejo verde. Después de una centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos, se tomó la capa superior de la disolución de tolueno que contenía el oleato de cobre y se midió con un espectrofotómetro a 714 nm para determinar su absorbancia óptica. Por el mismo procedimiento, se preparó una disolución blanca sin lipasa como control y la concentración del ácido orgánico puede determinarse por referencia a la curva de trabajo de la absorbancia óptica del ácido oleico.

3. Definición y fórmula de cálculo de la actividad enzimática

[0105] La unidad de actividad enzimática de la lipasa se definió como sigue: la cantidad de enzima para liberar 1 µmol de ácido graso en determinadas condiciones se definió como 1 unidad de actividad de la lipasa (U).

[0106] Para calcular la actividad enzimática se usó la fórmula siguiente: $X = (cV)/(tV')$, en la que: X representa la actividad enzimática de la lipasa, U/ml; c representa la concentración del ácido graso, µmol/ml; V representa el volumen de la disolución del ácido graso, ml; V' representa la cantidad de la disolución enzimática, ml; t representa el tiempo de acción, minutos.

Tasa de inhibición = [(actividad enzimática de la lipasa - actividad enzimática de la lipasa después de la inhibición) / actividad enzimática de la lipasa] x 100 %

4. Resultados de la prueba

4.1 Curva de trabajo de la absorbancia óptica del ácido oleico

[0107] Según se muestra en la figura 9.

4.2 Resultados de la prueba de actividad de los inhibidores enzimáticos

[0108] Según se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Resultados de la prueba de actividad de los inhibidores enzimáticos

Nombre de la muestra	Concentración del inhibidor (mg/ml)	Concentración final del inhibidor en el sistema (µg/ml)	Absorbancia	Concentración del ácido oleico generado (mM)	Actividad enzimática U/ml	Tasa de inhibición (%)
Control blanco	-	-	0,6680	2,75	1,69	-
Orlistat	0,1	1,85	0,2042	0,81	0,50	69,84 %
Compuesto de la fórmula II	6	111	0,5665	2,32	1,43	15,38 %
	9	166	0,5035	2,06	1,27	24,85 %
	11	203	0,3998	1,63	1,00	40,83 %
	13	240	0,2743	1,10	0,68	59,76 %
	18	333	0,2611	1,04	0,64	62,13 %

en que la actividad enzimática se calculó de acuerdo con la fórmula de cálculo de la sección 3 anterior, en la que:

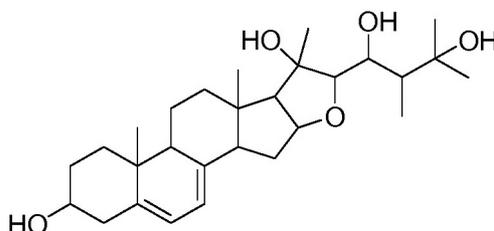
$V = 8 \text{ ml}; \quad V' = 1,3 \text{ ml}; \quad t = 10 \text{ minutos.}$

[0109] Los resultados de la prueba demostraron que el compuesto de la presente invención, especialmente el compuesto de la fórmula II, tenía un buen efecto inhibitorio sobre la actividad de la lipasa, con un CI_{50} de aproximadamente 220 $\mu\text{g/ml}$, y presentó una relación concentración-efecto en el efecto inhibitorio. Pudo apreciarse que los compuestos de la presente invención eran fármacos potenciales para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o enfermedades asociadas con la obesidad.

[0110] Estudios adicionales demostraron que los derivados éster o derivados éter del compuesto de la fórmula II, por ejemplo, "tetraacetato del compuesto de la fórmula II", "tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II", "tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II" y "tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II", según se preparan en los ejemplos 6-9, también tenían una actividad similar de inhibición de la lipasa y eran fármacos potenciales para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o enfermedades asociadas con la obesidad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula II o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo,



Fórmula II

5

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho éster se selecciona del grupo que consta de formiato, acetato, propionato, *p*-tolilsulfonato y trifluorometilsulfonato; o en que dicho éter es éter *terc*-butildimetilsilílico.

10

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una sal, éster o éter farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho éster o éter se selecciona del grupo que consta de tetraacetato del compuesto de la fórmula II, tetra-*p*-tolilsulfonato del compuesto de la fórmula II, tetra(trifluorometilsulfonato) del compuesto de la fórmula II y tetra(éter *terc*-butildimetilsilílico) del compuesto de la fórmula II.

15

4. Un procedimiento para la preparación del compuesto de la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

20 1) proporcionar arroz fermentado con *Monascus* y/o un extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus*, llevar a cabo una extracción ultrasónica una o más veces con uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consta de diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol y etanol en 2-6 veces el volumen durante 20-40 minutos cada vez, combinar las disoluciones extraídas y eliminar el disolvente para obtener un extracto refinado;

25 2) cargar el extracto refinado obtenido en la etapa 1) en una columna de gel de sílice para su separación y eluir con un gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo; la relación volumétrica entre el éter de petróleo y el acetato de etilo es de 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 secuencialmente;

30 3) tomar la fracción de elución eluida con éter de petróleo-acetato de etilo en la relación volumétrica de 50:50 o 25:75 de la etapa 2) y someterla a cromatografía de fase inversa en una columna C18, con metanol-agua para la elución en gradiente y una relación volumétrica metanol-agua de 10:90, 50:50, 75:25, 100:0 secuencialmente;

35 4) tomar la fracción de elución eluida con metanol-agua en la relación volumétrica de 50:50 o 75:25 de la etapa 3), someterla a purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento semipreparativa, con acetonitrilo y una disolución acuosa de ácido acético al 0,2 %, 45:55, como fase móvil y una columna C18 semipreparativa como fase estacionaria, y recoger las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos; y

5) liofilizar el producto de la etapa 4) para obtener el compuesto de la fórmula II.

35

5. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4, en que dicho extracto alcohólico de arroz fermentado con *Monascus* es el contenido de cápsulas de Xuezhikang.

6. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que satisface uno cualquiera o
40 más de los puntos siguientes (1) a (5):

(1) en la etapa 1), dicho disolvente orgánico es diclorometano;

(2) en la etapa 1), dicha extracción ultrasónica se realiza tres veces;

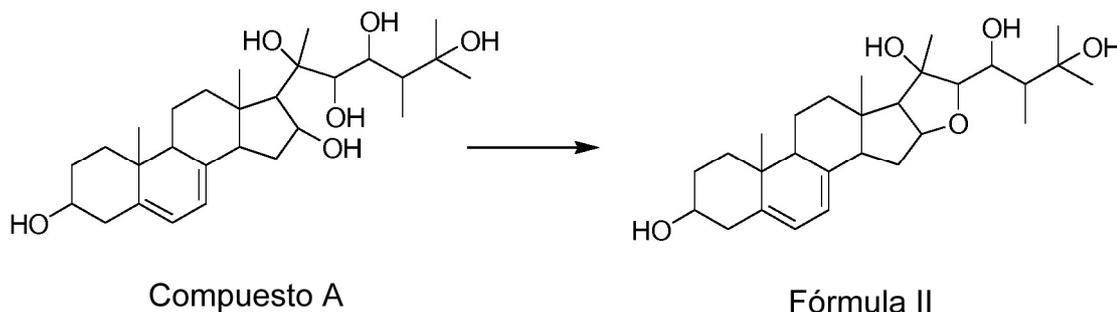
(3) en la etapa 1), el disolvente se elimina por concentración a presión reducida;

45 (4) en la etapa 4), se combinan las fracciones recogidas del pico cromatográfico a 9,2 minutos; y

(5) en la etapa 5), las condiciones de la liofilización son: la temperatura de la trampa fría es de -40 °C a -85 °C y el grado de vacío es de 0-100 Pa.

7. Un procedimiento para la preparación del compuesto de la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

uso de 3,16,20,22,23,25-hexahidroxiesteroide, abreviado como compuesto A, como sustrato y deshidratación en presencia de ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado o cloruro de 2,4,6-triisopropilsulfonilo para generar un compuesto de la fórmula II:



10 8. Un extracto que comprende el compuesto de la fórmula II de la reivindicación 1; en que dicho extracto es un extracto del polvo seco contenido en cápsulas de Xuezhikang o un extracto de arroz fermentado con *Monascus*; y dicho extracto es uno cualquiera de los siguientes (1) a (3):

- 15 (1) la fracción de elución eluida con éter de petróleo-acetato de etilo en una relación volumétrica de 50:50 o 25:75, según se prepara en las etapas anteriores 1) a 2) de la reivindicación 4;
- (2) la fracción de elución eluida con metanol-agua en una relación volumétrica de 50:50 o 75:25, según se prepara en las etapas 1) a 3) de la reivindicación 4; y
- (3) las fracciones del pico cromatográfico a 9,2 minutos, según se preparan en las etapas 1) a 4) de la reivindicación 4.

20 9. El extracto de acuerdo con la reivindicación 8, en que el compuesto de la fórmula II está en una cantidad del 0,0001-5 % (p/p), 0,001-2 % (p/p) o 0,001-1 % (p/p).

10. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1 y/o el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9; y opcionalmente comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. El compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10 para uso como medicamento para la reducción o la regulación de la grasa sanguínea o la profilaxis y/o el tratamiento de la dislipidemia, la hiperlipemia, la hipercolesterolemia o la aterosclerosis o para uso como inhibidor de la HMG-CoA-reductasa.

12. Un procedimiento para la inhibición de la HMG-CoA reductasa *in vitro*, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz del compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las 35 reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10.

13. El compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10 para uso como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de un cáncer, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer linfático o melanoma.

40 14. El compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10 para uso como medicamento o agente para la inhibición de células tumorales *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, para la inhibición de células de cáncer de colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma.

45 15. Un procedimiento para la inhibición de células tumorales *in vitro*, por ejemplo, células de cáncer de

colon, células de cáncer de hígado, células de cáncer linfático o células de melanoma, que comprende la etapa del uso de una cantidad eficaz del compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10.

- 5 16. El compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10 para uso como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la obesidad o una enfermedad asociada con la obesidad, por ejemplo, hiperlipidemia, aterosclerosis, cardiopatía coronaria o diabetes, o para uso como agente contra la obesidad.
- 10 17. El compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10 para uso como medicamento o agente para la inhibición de la lipasa *in vivo* o *in vitro*.
18. Un procedimiento para la inhibición de la lipasa *in vitro*, que comprende la etapa del uso de una
15 cantidad eficaz del compuesto de la reivindicación 1, el extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la composición de la reivindicación 10.

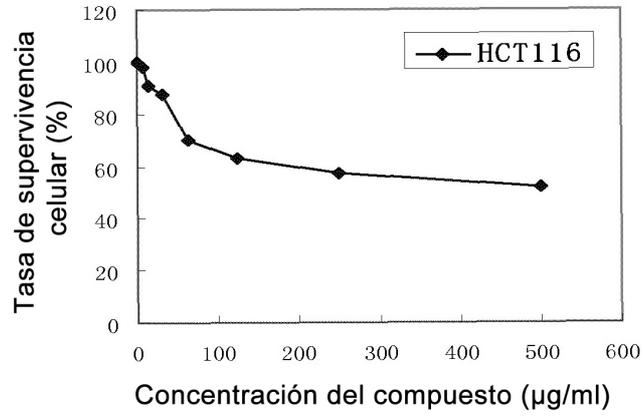


Fig.1

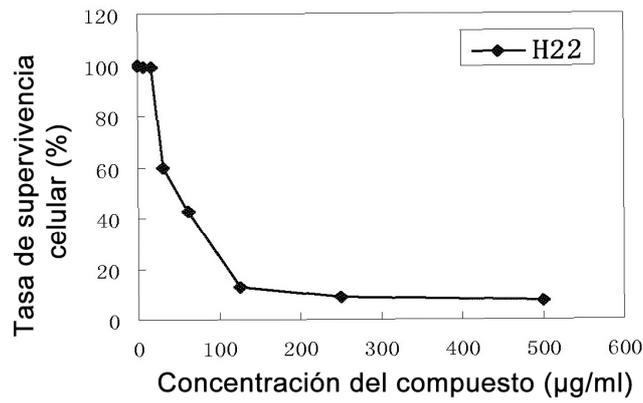


Fig.2

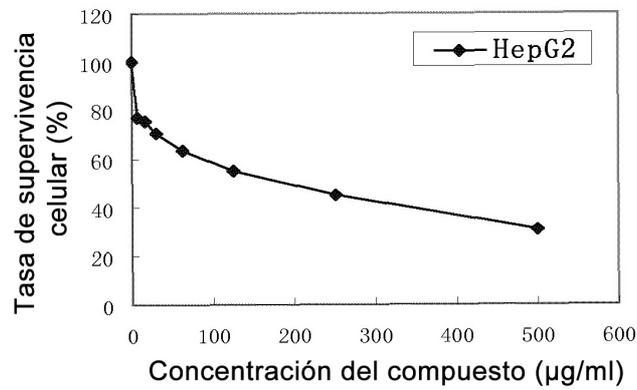


Fig.3

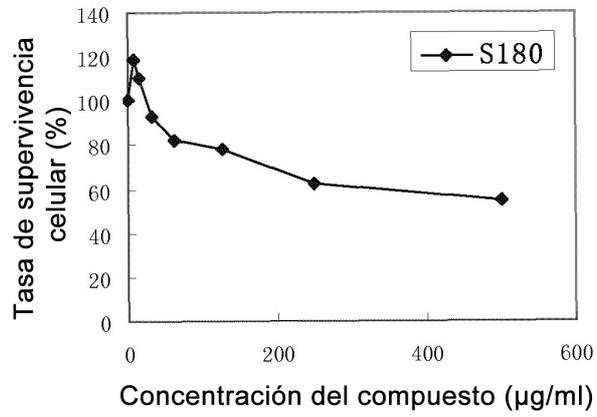


Fig.4

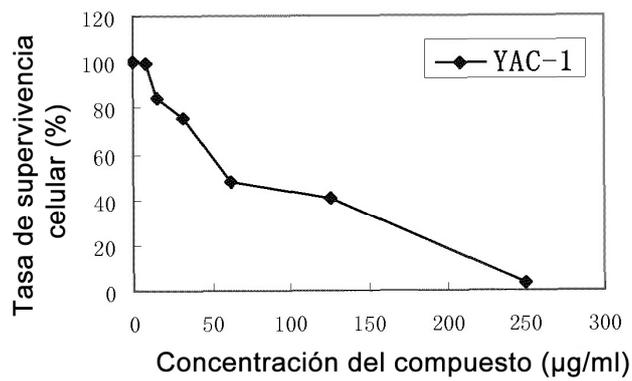


Fig.5

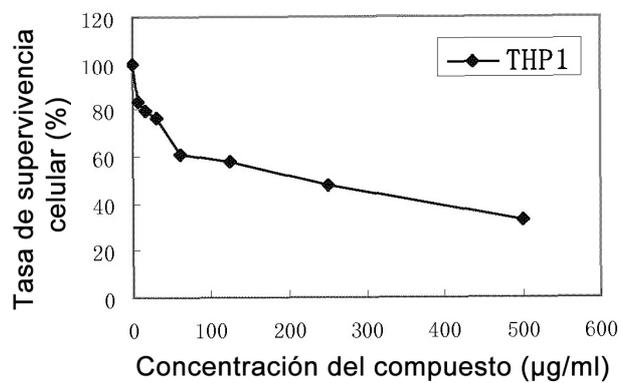


Fig.6

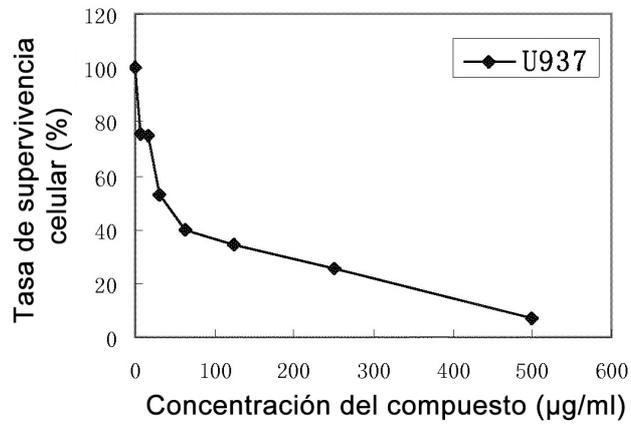


Fig.7

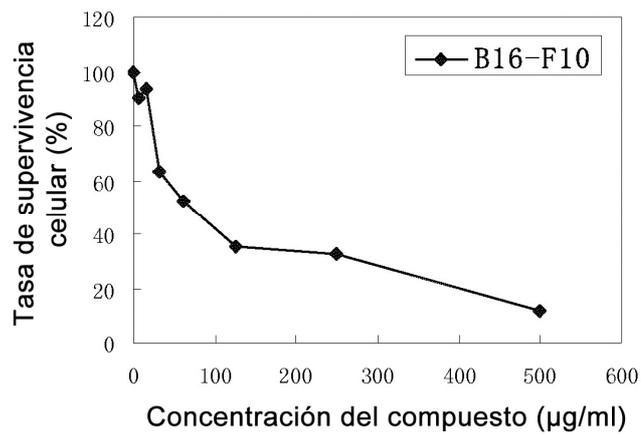


Fig.8

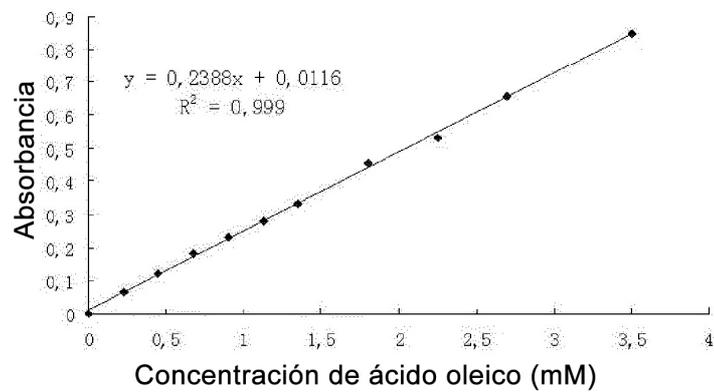


Fig.9