



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 695**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/195** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05707260 .5**  
96 Fecha de presentación : **08.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1713461**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **Compuestos que tienen actividad antitumoral.**

30 Prioridad: **12.02.2004 IT MI04A0230**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.01.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.01.2011**

73 Titular/es: **DEFIANTE FARMACÉUTICA, S.A.**  
**Rua da Alfândega, nº 78 – 3º andar**  
**9000-059 Funchal, Madeira, PT**

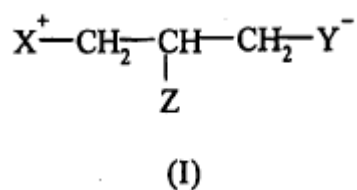
72 Inventor/es: **Peluso, Gianfranco y**  
**Calvani, Menotti**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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**

La presente invención se refiere a una nueva clase de compuestos que tiene actividad antitumoral. De forma específica la invención proporciona el uso de compuestos de la fórmula general (I):



10 en la que  $X^+$  se selecciona del grupo que está constituido por  $N^+(R_1, R_2, R_3)$  y  $P^+(R_1, R_2, R_3)$ , en el que  $R_1, R_2$  y  $R_3$ , que son el mismo o diferente, se seleccionan del grupo que está constituido por hidrógeno y grupos alquilo  $C_1-C_9$  de cadena lineal o ramificada,  $-CH=NH(NH_2)$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ; o dos o más  $R_1, R_2$  y  $R_3$ , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un sistema heterocíclico monocíclico o bicíclico, saturado o insaturado; con la condición

15 de que al menos uno de  $R_1, R_2$  y  $R_3$  sea distinto a hidrógeno.

$Z$  se selecciona de:

- $-OR_4$ ,
- $-OCOOR_4$ ,
- $-OCONHR_4$ ,
- 20  $-OCSNHR_4$ ,
- $-OCSOR_4$ ,
- $-NHR_4$ ,
- $-NHCOR_4$ ,
- $-NHCSR_4$ ,
- 25  $-NHCOOR_4$ ,
- $-NHCSOR_4$ ,
- $-NHCONHR_4$ ,
- $-NHCSNHR_4$ ,
- $-NHSOR_4$ ,
- 30  $-NHSONHR_4$ ,
- $-NHOSO_2R_4$ ,

–NHSO<sub>2</sub>NHR<sub>4</sub>,

–SR<sub>4</sub>,

en el que R<sub>4</sub> es un grupo alquilo C<sub>2</sub>–C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado;

Y– se selecciona del grupo que está constituido por –COO–, PO<sub>3</sub>H–, –OPO<sub>3</sub>H–, tetrazolato–5–

ilo;

para la preparación de un medicamento antitumoral.

Un primer grupo de compuestos preferidos comprende los compuestos de la fórmula (I) en la que X es N<sup>+</sup>(R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>), más preferiblemente trimetilamonio. Un segundo grupo de compuestos preferidos comprende los compuestos de la fórmula (I) en la que dos o más R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un sistema heterocíclico, que se selecciona preferiblemente de morfolinio, piridinio, pirrolidinio, quinolinio, quinuclidinio.

Un tercer grupo de compuestos preferidos comprende los compuestos de la fórmula (I) en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno y R<sub>3</sub> selecciona del grupo que está constituido por –CH=NH(NH<sub>2</sub>), –NH<sub>2</sub> y –OH.

Dentro de las diferentes realizaciones de la presente invención, el grupo R<sub>4</sub> es preferiblemente un grupo alquilo C<sub>7</sub>–C<sub>20</sub> de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado. Los grupos R<sub>4</sub> preferidos se seleccionan del grupo que está constituido por heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo.

Los ejemplos preferidos del grupo Z son ureido (–NHCONHR<sub>4</sub>), y carbamato (–NHCOOR<sub>4</sub>, –OCONHR<sub>4</sub>).

Se prefieren particularmente los compuestos de la fórmula (I) en la que X<sup>+</sup>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, tienen los significados anteriormente descritos, Z es ureido (–NHCONHR<sub>4</sub>) o carbamato (–NHCOOR<sub>4</sub>, –OCONHR<sub>4</sub>), R<sub>4</sub> es un grupo alquilo C<sub>7</sub>–C<sub>20</sub>, preferiblemente C<sub>9</sub>–C<sub>18</sub>, de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado.

Los compuestos de la fórmula (I) tienen un centro asimétrico en el átomo de carbono unido a un grupo Z. A efectos de la presente invención, cada compuesto de la fórmula (I) pueden existir como mezcla racémica R,S y como forma isomérica separada R/S.

Los compuestos de la fórmula (I) son derivados de amonio cuaternario o fosfonio (X<sup>+</sup>) que siempre contienen un grupo aniónico Y–. Dependiendo del pH, cada compuesto de la fórmula (I) puede existir de forma indiferente en forma de anfoión (sal interna) o en forma de un compuesto, en el que Y– está presente en la forma de YH. En tal caso, X<sup>+</sup> se salifica con un ácido farmacológicamente aceptable. La fórmula (I) cubre todas estas posibilidades diferentes.

Un grupo de compuestos particularmente preferidos comprende:

1) R,S–4–trimetilamonio–3–(nonilcarbamoil)–aminobutirato;

- 2) R,S-4-quinuclidinio-3-(tetradeciloxicarbonil)-oxibutirato;
- 3) R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-oxibutirato;
- 4) Cloruro del ácido R,S-4-trimetilamonio-3-(noniloxicarbonil)-oxibutírico;
- 5) R,S-4-trimetilfosfonio-3-(nonilcarbamoil)-oxibutirato;
- 5 6) R,S-4-trimetilamonio-3-(octiloxicarbonil)-aminobutirato;
- 7) R,S-4-trimetilamonio-3-(noniloxicarbonil)-amino butirato;
- 8) R,S-4-trimetilamonio-3-octiloxibutirato;
- 9) R,S-4-trimetilamonio-3-tetradeciloxibutirato;
- 10) R,S-1-guanidinio-2-tetradeciloxi-3-(tetrazolato-5-il)-propano;
- 10 11) R,S-1-trimetilamonio-2-tetradeciloxi-3-(tetrazolato-5-il)-propano;
- 12) R,S-3-quinuclidinio-2-(tetradeciloxicarbonil)-oxi-1-propanofosfonato monobásico;
- 13) R,S-3-trimetilamonio-2-(nonilaminocarbonil)-oxi-1-propanofosfonato monobásico;
- 15 14) Cloruro del ácido R,S-3-piridinio-2-(nonilaminocarbonil)-oxi-1-propanofosfónico;
- 15) R-4-trimetilamonio-3-(tetradecilcarbamoil)-aminobutirato;
- 16) R-4-trimetilamonio-3-(undecilcarbamoil)-aminobutirato;
- 17) R-4-trimetilamonio-3-(heptilcarbamoil)-aminobutirato;
- 20 18) R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilthiocarbamoil)-aminobutirato ;
- 19) R-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-aminobutirato;
- 20) S-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-aminobutirato;
- 21) S-4-trimetilamonio-3-(tetradecilcarbamoil)-aminobutirato;
- 22) R,S-4-trimetilamonio-3-tetradecilaminobutirato;
- 25 23) R,S-4-trimetilamonio-3-octilaminobutirato;
- 24) R,S-4-trimetilamonio-3-(decansulfonil)aminobutirato;
- 25) R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilsulfamoil)aminobutirato;
- 26) S-4-trimetilamonio-3-(dodecansulfonil)aminobutirato;
- 27) R-4-trimetilamonio-3-(dodecansulfonil)aminobutirato;
- 30 28) S-4-trimetilamonio-3-(undecilsulfamoil)aminobutirato;
- 29) R-4-trimetilamonio-3-(undecilsulfamoil)aminobutirato;
- 30) R-4-trimetilamonio-3-(dodecilcarbamoil)aminobutirato;
- 31) R-4-trimetilamonio-3-(10-fenoxidecilcarbamoil)aminobutirato;
- 32) R-4-trimetilamonio-3-(trans-b-estirenosulfonil)aminobutirato.

La preparación de los compuestos de la fórmula (I) se describe en la solicitud de patente internacional publicada con el nº WO 99/59957, a nombre de los mismos solicitantes. En la presente memoria descriptiva se describe el uso de los compuestos (I) para el tratamiento de estados hiperglucémicos tales como diabetes y las patologías asociadas con éstos. La actividad terapéutica de los compuestos (I) se atribuye a un efecto de inhibición de carnitina palmitoil transferasa (CPT).

En estudios in vitro sobre diferentes líneas celulares tumorales, sorprendentemente se ha descubierto que los compuestos (I) ejercen un efecto antiproliferativo y tumoral notable que es independiente de la inhibición de CPT, como se confirma por la observación de que un inhibidor de CPT-1 conocido, etomoxir, cuando se analiza en las mismas condiciones experimentales usadas para los compuestos (I), no muestran ninguna actividad antiproliferativa o tumoral. Posteriormente, los resultados in vitro se confirmaron in vivo usando modelos animales de tumor. También en estas condiciones, bajas dosificaciones de compuestos (I) mostraron ser eficaces en la reducción de la masa tumoral sin efectos secundarios relevantes.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es el uso de compuestos (I) para la preparación de un medicamento antitumoral.

Los siguientes tumores se tratan preferiblemente de acuerdo con la invención: leucemia, carcinoma, linfoma, sarcoma, pecho, pulmón, cabeza and cuello, cánceres de vejiga y recto, en particular leucemia y hepatocarcinoma. El tratamiento terapéutico se puede aplicar en varias etapas de crecimiento, proliferación y difusión del tumor.

Para usar en terapia, los compuestos (I) se pueden formular con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de acuerdo con la presente invención son adecuadas para administración oral, parenteral, rectal, transdérmica e intralesional. Los ejemplos de formas orales y parenterales incluyen cápsulas, comprimidos, gránulos, polvos, jarabes y, respectivamente, soluciones y emulsiones.

La dosificación de los compuestos (I) puede variar dependiendo del producto específico usado, de la vía de administración y de la progresión de la enfermedad. Una dosificación que proporciona una concentración de plasma de sustancia activa desde 0,1  $\mu\text{M}$  hasta 0,50  $\mu\text{M}$ , preferiblemente 0,5  $\mu\text{M}$  – 30  $\mu\text{M}$ , es por lo general aceptable.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que contienen un compuesto (I) en combinación con agentes antitumorales diferentes, para administración simultánea, separada o secuencial a un paciente con tumor. Los ejemplos de agentes antitumorales que se pueden usar en combinación con los compuestos (I) incluyen compuestos citotóxicos o citoestáticos, antimetabolitos, antagonistas hormonales, alcaloides,

antibióticos, en particular antraciclinas, agentes alquilantes, péptidos, agentes que modifican la respuesta biológica, citoquinas.

La elección de la combinación específica de sustancias activas, de su dosificación o vía de administración, depende del tipo de tumor, de la resistencia del tumor al tratamiento farmacológico, de la tolerancia del paciente al tratamiento en sí y de diferentes variables que se evaluarán caso por caso.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en más detalle.

### **EJEMPLO 1**

**Efecto inhibitorio in vitro sobre la actividad proapoptótica y proliferación del compuesto R-4-trimetilamonium-3-(tetradecilcarbamoil)-aminobutirato (ST1326) en células de hepatocarcinoma humano (HepG2)**

La línea celular del tumor HepG2 la proporcionó ATCC (American Type Cell Culture – Mannas, Virginia, nº de acceso HB-8065) y posteriormente se desarrolló en nuestro laboratorio. Las células se cultivaron en medio completo, es decir, MEM añadido con FCS al 10 %, Na-piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM, antibióticos y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (penicilina/estreptomicina). El medio, los productos de cultivo y los reactivos se compraron en Hyclone-Celbio (Milán, Italia). Las células se sembraron en placas Petri de 60 mm de diámetro. Después de sembrar en placas las células se cultivaron durante 24 horas antes de su tratamiento.

En este experimento, se añadieron cantidades crecientes de la molécula del ensayo a células HepG2 hemiconfluentes (Kogure y col., Cancer Chemother. Pharmacol., 2003; DOI. 10.1007/s); los efectos antiproliferativos y proapoptóticos se determinaron en momentos diferentes del sembrado de células.

El diseño del experimento en algunos casos dispuso la adición del compuesto del experimento una vez que se había preparado el cultivo celular, en otros casos los cultivos se expusieron al compuesto cada 24 horas después de eliminar de forma adecuada el medio condicionado y lavando las células con medio nuevo (completo). Las células se contaron en una cámara Bürker después de dilución adecuada con un tinte vital para visualizar las células vivas. En particular, el procedimiento de exclusión de azul triptano se usó para contar las células a 0, 24 y 48 horas del tratamiento. Al menos se realizaron 10 recuentos de células para cada experimento y cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Un análisis adicional implicaba citofluorometría utilizando yoduro de propidio en forma de marcador para células viables. El compuesto experimental se ensayó frente al inhibidor de

CTP, etomoxir, para verificar si el efecto tumoral se podría atribuir a la inhibición de CPT-1 o implicaba nuevos mecanismos. Los datos significativos se muestran en la FIGURA.

De manera sorprendente, los resultados muestran que solamente el compuesto ST1326 era capaz de ejercer un efecto antiproliferativo in vitro asociado con una actividad tumoral significativa.

Además, los ensayos sobre viabilidad celular se llevaron a cabo usando técnicas de citofluorometría de flujo. Los datos reseñados en la Tabla 1 se refieren a células tratadas sólo una vez (momento 0); la mortalidad celular (24, 48 y 72 horas) se calculó como el porcentaje (media  $\pm$  desviación estándar) sobre 10.000 episodios adquiridos.

TABLA 1

| Tratamiento         | 24 horas         | 48 horas         | 72 horas        |
|---------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Control             | 9,5 $\pm$ 1,1    | 10,2 $\pm$ 0,47  | 11,78 $\pm$ 1,9 |
| Etomoxir 5 $\mu$ M  | 10,8 $\pm$ 1,65  | 11,8 $\pm$ 0,4   | 10,1 $\pm$ 2,1  |
| Etomoxir 20 $\mu$ M | 13,04 $\pm$ 1,07 | 11,2 $\pm$ 1,3   | 11,7 $\pm$ 1,3  |
| ST1326 0,1 $\mu$ M  | 15,3 $\pm$ 2,1   | 27,3 $\pm$ 2,2   | 49,9 $\pm$ 1,2  |
| ST1326 5 $\mu$ M    | 25,78 $\pm$ 1,70 | 56,29 $\pm$ 1,51 | 93,48 $\pm$ 1,5 |
| ST1326 10 $\mu$ M   | 53,21 $\pm$ 1,5  | 85,10 $\pm$ 0,9  | 96,3 $\pm$ 1,1  |
| ST1326 20 $\mu$ M   | 88,22 $\pm$ 1,9  | 89,10 $\pm$ 0,17 | 98,51 $\pm$ 1,3 |

En experimentos adicionales la molécula experimental se añadió cada 24 horas, tal como se ha descrito anteriormente, después de eliminar de forma adecuada los sobrenadantes y lavar los cultivos con medio completo. En este caso, las adiciones subsiguientes de la molécula experimental mostraron un efecto aditivo sobre la viabilidad celular (Tabla 2). En el control, el sobrenadante se eliminó y se añadió a los cultivos medio completo solo. La mortalidad celular (48 y 72 horas) se calculó como el porcentaje (media  $\pm$  desviación estándar) sobre 10.000 episodios adquiridos.

TABLA 2

| TRATAMIENTO         | 48 horas*       | 72 horas**      |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| Control             | 9,3 $\pm$ 1,3   | 13,06 $\pm$ 1,5 |
| Etomoxir 5 $\mu$ M  | 10,17 $\pm$ 1,7 | 12,6 $\pm$ 1,1  |
| Etomoxir 20 $\mu$ M | 13,9 $\pm$ 1,2  | 14,1 $\pm$ 0,9  |
| ST1326 0,1 $\mu$ M  | 45 $\pm$ 2,0    | 56,5 $\pm$ 1,2  |

|                                                                                     |                 |                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|
| ST1326 5 $\mu$ M                                                                    | $64,7 \pm 1,7$  | $89,7 \pm 1,4$ |
| ST1326 10 $\mu$ M                                                                   | $87,5 \pm 2,03$ | $91,3 \pm 1,9$ |
| ST1326 20 $\mu$ M                                                                   | $93,9 \pm 1,03$ | $98,1 \pm 0,9$ |
|                                                                                     |                 |                |
| * segunda adición de la molécula experimental después de eliminar el sobrenadante;  |                 |                |
| ** tercera adición de la molécula experimental después de eliminar el sobrenadante. |                 |                |

## EJEMPLO 2

### Actividad proapoptótica in vitro del compuesto ST1326 sobre células T de leucemia aguda (Jurkat)

La línea celular del tumor Jurkat la proporcionó ATCC (American Type Cell Culture—Mannas, Virginia, número de acceso TIB–152) y posteriormente se desarrolló en nuestro laboratorio. Las células se cultivaron en medio completo que contiene RPMI 1640 añadido con FCS (suero fetal bovino) al 10 %, Na–piruvato 1 mM, L–glutamina 2 mM, glucosa 4,5 g/l, HEPES 10 mM y antibióticos (penicilina/estreptomicina). El medio, los productos de cultivo y los reactivos se compraron en Hyclone–Celbio (Milán, Italia). Las células se sembraron en matraces de 25 mm<sup>2</sup>. Después de sembrar en placas las células se cultivaron durante 24 horas antes de su tratamiento.

El experimento se llevó a cabo añadiendo cantidades crecientes de la molécula del ensayo a células Jurkat hemiconfluentes; el efecto proapoptótico se determinó en momentos diferentes de la preparación del cultivo.

El diseño del experimento dispuso la adición del compuesto del experimento solamente al comienzo del cultivo celular, y la determinación de los efectos en los tiempos establecidos. Los datos sobre mortalidad celular se obtuvieron usando solamente técnicas de citofluorometría de flujo con yoduro de propidio. El hecho de que esas células vivan suspendidas en el cultivo hizo que estos ensayos fueran extremadamente fáciles de realizar.

La tabla 3 muestra que las células Jurkat son extremadamente más sensibles que las células HepG2 a la acción tumoral del compuesto. Por este motivo se determinó la mortalidad celular justo después de dos horas de tratamiento y a 24, 48 y 72 horas.

La mortalidad se calculó como el porcentaje sobre 10.000 episodios estándar adquiridos. Como los resultados están exactamente casi solapados, con desviación muy baja en todas las lecturas de cada experimento individual, los valores medios de 5 lecturas citofluorométricas se reseñan en la siguiente Tabla sin desviación estándar.

TABLA 3

| TRATAMIENTO         | 2 horas | 24 horas | 48 horas | 72 horas |
|---------------------|---------|----------|----------|----------|
| Control             | 3 %     | 4 %      | 5 %      | 13 %     |
| ST1326 0,1 $\mu$ M  | 3 %     | 4 %      | 5 %      | 13 %     |
| ST1326 0,25 $\mu$ M | 3 %     | 5 %      | 8 %      | 14 %     |
| ST1326 0,50 $\mu$ M | 7 %     | 15 %     | 35 %     | 56 %     |
| ST1326 1,0 $\mu$ M  | 6 %     | 79 %     | 83 %     | 90 %     |
| ST1326 2,5 $\mu$ M  | 6 %     | 91 %     | 97 %     | 99 %     |
| ST1326 5,0 $\mu$ M  | 8 %     | 99 %     | 99 %     | 99 %     |
| ST1326 10 $\mu$ M   | 20 %    | 99 %     | 99 %     | 99 %     |

Además, con el fin de excluir la inducción de toxicidad en PBMC normales por medio de la molécula del experimento, también se llevaron a cabo ensayos de viabilidad con linfocitos tomados de individuos sanos y que han estado en contacto con el compuesto del experimento.

Los resultados reseñados en la Tabla 4 muestran que el compuesto del experimento después de 72 horas no era tóxico a PBMC en las mismas dosis que demostraron ser capaces de matar células Jurkat.

TABLA 4

| TRATAMIENTO        | 72 horas |
|--------------------|----------|
| Control            | 9 %      |
| ST1326 1,0 $\mu$ M | 9 %      |
| ST1326 5,0 $\mu$ M | 10 %     |
| ST1326 10 $\mu$ M  | 10 %     |
| ST1326 20 $\mu$ M  | 12 %     |

### EJEMPLO 3

**Actividad antagonista in vitro de dosis sub-óptimas de compuesto ST1326 sobre los efectos antineoplásicos de doxorubicina en células de hepatocarcinoma humanos (HepG2)**

La línea celular del tumor HepG2 la proporcionó ATCC (American Type Cell Culture—Mannas, Virginia, N°. HB-8065) y posteriormente se desarrolló en nuestro laboratorio. Las células se cultivaron en medio completo que contiene MEM añadido con FCS (suero fetal bovino) al 10 %, Na-piruvato 1 mM, L-glutamina 2 mM, antibióticos y aminoácidos no

esenciales 0,1 mM (penicilina/estreptomicina). El medio, los productos de cultivo y los reactivos se compraron en Hyclone–Celbio (Milán, Italia). El diseño del experimento dispuso el uso de ST1326 y de fármacos antineoplásticos conocidos, tales como doxorubicina, contra la que las células HepG2 muestran una gran resistencia, para determinar la acción agonista del compuesto. El compuesto ST se usó en una concentración que en experimentos anteriores mostró solamente ser capaz parcialmente de inducir un efecto tumoral (0,1  $\mu$ M; mortalidad celular al ~50 %). En este experimento, los siguientes compuestos se añadieron a células HepG2 hemiconfluentes en placas de 96 pocillos:

- doxorubicina 0,25  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml, 5,0  $\mu$ g/ml;
- ST 0,1  $\mu$ M en combinación con doxorubicina 0,25  $\mu$ g/ml.

Después de 24 horas de incubación, el medio que contenía concentraciones diferentes de doxorubicina y la combinación de ST/doxorubicina se eliminó y las células se lavaron con medio completo. Después de tratamiento de 3 días, el efecto antineoplástico de compuesto del experimento se determinó en comparación con las células de control incubadas en medio completo durante el mismo periodo de tiempo.

La Tabla 5 muestra que solamente la dosis más alta de doxorubicina (5,0  $\mu$ g/ml) es capaz de inducir una mortalidad celular significativa. La adición de ST y doxorubicina en concentraciones de 0,1  $\mu$ M y 0,25  $\mu$ g/ml, respectivamente, permitió demostrar el efecto tumoral agonista de su combinación. La mortalidad celular se calculó como el porcentaje (media  $\pm$  desviación estándar) sobre 10.000 episodios adquiridos.

TABLA 5

| TRATAMIENTO                                          | 3 días         |
|------------------------------------------------------|----------------|
| Control                                              | 10,8 $\pm$ 1   |
| Doxorubicina 0,25 $\mu$ g/ml                         | 11,2 $\pm$ 1,5 |
| Doxorubicina 0,5 $\mu$ g/ml                          | 22,7 $\pm$ 3,5 |
| Doxorubicina 5,0 $\mu$ g/ml                          | 48,6 $\pm$ 4,1 |
| ST1326 0,1 $\mu$ M +<br>Doxorubicina 0,25 $\mu$ g/ml | 93,2 $\pm$ 2,7 |

#### EJEMPLO 4

##### Actividad antineoplástica in vivo del compuesto ST1326 en ratas que llevan el tumor Yoshida

Se mantuvieron ratas macho Wistar (Morini s.r.l.) de 190 g – 200 g de peso a 22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C, con un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas, y se les dio acceso libre a agua y comida (dieta

estándar). Se inocularon algunas ratas por vía intraperitoneal con células  $10 \times 10^7$  del hepatoma ascítico AH-130 Yoshida (Llovera y col., Int. J. Cancer 61:138 – 41 (1995); kind gift from Prof. J M Argilès). 5 – 7 días después del inóculo, las ratas desarrollaron una ascitis que se podría detectar por medio de análisis macroscópico del abdomen. La paracentesis reveló la presencia de aproximadamente 80 ml – 100 de fluido ascítico, que a veces aparece hemorrágico, que contiene como media  $15\text{--}20 \times 10^6/\text{ml}$  de células tumorales.

El protocolo experimental dispuso que 7 días después de la inducción de ascitis 15 animales (grupo tratado) recibieran 2 ml de una solución salina tamponada que contiene ST (25 mg/Kg i.p.), mientras que otros 15 animales (grupo de control) recibieran la solución tamponada sola. El mismo tratamiento se llevó a cabo en días alternos durante una semana hasta un total de 4 tratamientos para cada animal. La dosificación se seleccionó en base a estudios preliminares en los que se consiguió una concentración de plasma de  $6,1 \mu\text{M}$  de ST 5 horas después de la administración intraperitoneal. Los animales se mantuvieron posteriormente bajo observación durante 3 semanas (control), examinando la efusión de ascitis, la presencia de masa neoplásica subcutánea en el sitio de inoculación, y la mortalidad.

La observación más interesante fue que los animales tratados sobrevivieron durante el periodo de control de 3 semanas, mientras que las ratas de control murieron entre la primera y segunda semana.

El examen post-mortem de los animales de control mostró la presencia de fluido ascítico que contiene células tumorales en la cavidad abdominal, hiperplasia de las placas intestinales de Peyer, ausencia de lesiones tumorales que implican los órganos abdominales y finalmente el desarrollo de una lesión tumoral cerca del fascia muscular en el sitio de inoculación de las células neoplásicas. Las ratas tratadas se sacrificaron al final de la tercera semana y su examen post mortem no reveló ninguna alteración en la cavidad abdominal, o la presencia de células tumorales en el fluido ascítico o en el sitio de inoculación.

En las siguientes Tablas 6 y 7 se muestra una sinopsis de los datos / resultados experimentales.

TABLA 6

|                                                               | Supervivencia en 1 semana de control | Supervivencia en 2 semanas de control | Supervivencia en 3 semanas de control |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Nº de animales sobrevividos tratados con solución salina (No) | 11                                   | 1                                     | 0                                     |
| Nº de animales sobrevividos tratados con ST1326               | 15                                   | 15                                    | 15                                    |

TABLA 7

|                                             | Presencia de células tumorales en la cavidad abdominal (examen post-mortem) | Presencia de masa tumoral en el sitio de inoculación | Presencia de caquexia |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|
| Nº de animales tratados con solución salina | 15                                                                          | 10                                                   | 15                    |
| Nº de animales tratados con ST1326          | 0                                                                           | 0                                                    | 1                     |

5 Los resultados experimentales obtenidos con la administración oral e i.v. mostraron la efectividad del tratamiento en diferentes dosificaciones del compuesto experimental (vía oral: 100 mg/Kg; i.v.: 2 mg/Kg).

#### Breve descripción de la figura

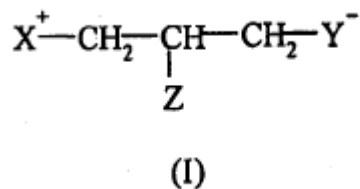
10 Los datos que se refieren a la viabilidad celular se expresan como el porcentaje del número de células viables de los cultivos de control (=100 %). (E = etomoxir; ST1326 = compuesto analizado). Se observó una reducción notable en el número de células cultivadas en presencia de menos de ST 10  $\mu$ M justo después de 24 horas. En las mismas concentraciones, etomoxir era ineficaz.

15

## REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de la fórmula general (I)

5



10

en la que  $\text{X}^+$  se selecciona del grupo que está constituido por  $\text{N}^+(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3)$  y  $\text{P}^+(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3)$ , en el que  $\text{R}_1, \text{R}_2$  y  $\text{R}_3$ , que son el mismo o diferente, se seleccionan del grupo que está constituido por hidrógeno y grupos alquilo  $\text{C}_1 - \text{C}_9$  de cadena lineal o ramificada,

$-\text{CH}=\text{NH}(\text{NH}_2)$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ; o dos o más  $\text{R}_1, \text{R}_2$  y  $\text{R}_3$ , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un sistema heterocíclico monocíclico o bicíclico, saturado o insaturado; con la condición de que al menos uno de  $\text{R}_1, \text{R}_2$  y  $\text{R}_3$  sea distinto a hidrógeno.

15

Z se selecciona de:

20

$-\text{OR}_4$ ,  
 $-\text{OCOOR}_4$ ,  
 $-\text{OCONHR}_4$ ,  
 $-\text{OCSNHR}_4$ ,  
 $-\text{OCSOR}_4$ ,  
 $-\text{NHR}_4$ ,  
 $-\text{NHCOR}_4$ ,  
 $-\text{NHCSR}_4$ ,  
 $-\text{NHCOOR}_4$ ,  
 $-\text{NHCSOR}_4$ ,  
 $-\text{NHCONHR}_4$ ,  
 $-\text{NHCSNHR}_4$ ,  
 $-\text{NHSOR}_4$ ,  
 $-\text{NHSONHR}_4$ ,  
 $-\text{NHSO}_2\text{R}_4$ ,  
 $-\text{NHSO}_2\text{NHR}_4$ ,

25

30



en el que  $\text{R}_4$  es un grupo alquilo  $\text{C}_2\text{--C}_{20}$  de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado;

Y— se selecciona del grupo que está constituido por  $-\text{COO}-$ ,  $\text{PO}_3\text{H}-$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}-$ ,  
5 tetrazolato-5-ilo;

sales, enantiómeros y mezclas racémicas de los mismos, para la preparación de un medicamento antitumoral.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 de un compuesto de la fórmula (I), en  
10 el que, independientemente de otro,

- X es trimetilamonio o un grupo  $\text{N}^+(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3)$ , en el que dos o más  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  y  $\text{R}_3$ , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un sistema heterocíclico, que se selecciona de morfolinio, piridinio, pirrolidinio, quinolinio y quinuclidinio;

15 -  $\text{R}_4$  se selecciona de heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo;

- Z es un grupo ureido ( $-\text{NHCONHR}_4$ ) o carbamato ( $-\text{NHCOOR}_4$ ,  $-\text{OCONHR}_4$ ).

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 de un compuesto que se selecciona  
20 del grupo que está constituido por:

- R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-aminobutirato;

- R,S-4-quinuclidinio-3-(tetradeciloxicarbonil)-oxibutirato;

- R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-oxibutirato;

25 - Cloruro del ácido R,S-4-trimetilamonio-3-(noniloxicarbonil)-oxibutírico;

- R,S-4-trimetilfosfonio-3-(nonilcarbamoil)-oxibutirato;

- R,S-4-trimetilamonio-3-(octiloxicarbonil)-aminobutirato;

- R,S-4-trimetilamonio-3-(noniloxicarbonil)-amino butirato;

- R,S-4-trimetilamonio-3-octiloxibutirato;

30 - R,S-4-trimetilamonio-3-tetradeciloxibutirato;

- R,S-1-guanidinio-2-tetradeciloxi-3-(tetrazolato-5-il)-propano;

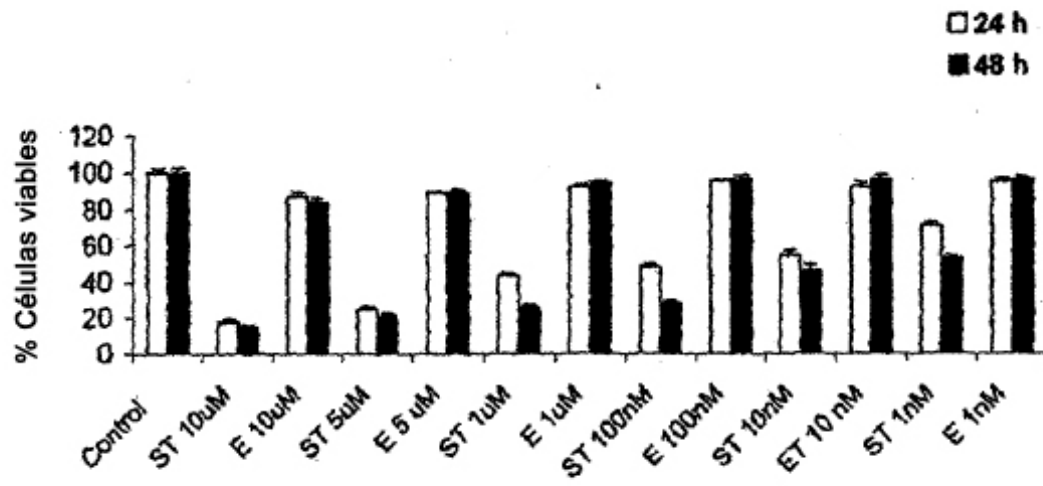
- R,S-1-trimetilamonio-2-tetradeciloxi-3-(tetrazolato-5-il)-propano;

- R,S-3-quinuclidinio-2-(tetradeciloxicarbonil)-oxi-1-propanofosfonato monobásico;

- R,S-3-trimetilamonio-2-(nonilaminocarbonil)-oxi-1-propanofosfonato monobásico;
- Cloruro del ácido R,S-3-piridinio-2-(nonilaminocarbonil)-oxi-1-propanofosfónico;
- 5       - R-4-trimetilamonio-3-(tetradecilcarbamoil)-aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(undecilcarbamoil)-aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(heptilcarbamoil)-aminobutirato;
- R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilthiocarbamoil)-aminobutirato ;
- R-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-aminobutirato;
- 10       - S-4-trimetilamonio-3-(nonilcarbamoil)-aminobutirato;
- S-4-trimetilamonio-3-(tetradecilcarbamoil)-aminobutirato;
- R,S-4-trimetilamonio-3-tetradecilaminobutirato;
- R,S-4-trimetilamonio-3-octilaminobutirato;
- R,S-4-trimetilamonio-3-(decansulfonil)aminobutirato;
- 15       - R,S-4-trimetilamonio-3-(nonilsulfamoil)aminobutirato;
- S-4-trimetilamonio-3-(dodecansulfonil)aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(dodecansulfonil)aminobutirato;
- S-4-trimetilamonio-3-(undecilsulfamoil)aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(undecilsulfamoil)aminobutirato;
- 20       - R-4-trimetilamonio-3-(dodecilcarbamoil)aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(10-fenoxidecilcarbamoil)aminobutirato;
- R-4-trimetilamonio-3-(trans-b-estirenosulfonil)aminobutirato.
- 4.       El uso de acuerdo con la reivindicación 3, del compuesto R-4-trimetilamonio-3-
- 25       (tetradecilcarbamoil)-aminobutirato.
- 5.       El uso de un compuesto (I) de acuerdo con las reivindicaciones 1 – 4 para la
- preparación de un medicamento antitumoral para el tratamiento de leucemias y
- hepatocarcinomas.
- 30       6.       Una preparación terapéutica que contiene un compuesto de acuerdo con
- cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 en combinación con un agente antitumoral
- seleccionado de compuestos citotóxicos o citostáticos, antimetabolitos,
- antagonistas hormonales, alcaloides, antibióticos, en particular antraciclinas,
- 35       agentes alquilantes, péptidos, agentes que modifican la respuesta biológica,

citoquinas, para la administración simultánea, separada o secuencial a un paciente con tumor.

- 5
7. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 6, que contiene una combinación de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 y una antraciclina.
- 10
8. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la antraciclina es doxorubicina.



Figura