

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: MAGNACHEM INTERNATINAL LABORATORIES, INC.		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Dirección: Suite 49, 4226 N.E. 1st Avenue, Boca Raton, FL. 33431 Estados Unidos		
	Nacionalidad o domicilio: Boca Raton, Florida, Estados Unidos		
	Lugar de constitución: Florida, Estados Unidos		
	Teléfono:	Fax:	
	E. Mail:		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
	Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C.		
	Teléfono: 6350835 Fax: 6350824		
	E. Mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co		
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: TERRERO, David		
	Dirección: Calle Bohechlo #29, Ensanche Quisqueño, República Dominicana		
	Nacionalidad o Domicilio: Dominicano		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/us02/18602 Fecha: Junio 12, 2002 Publicación Internacional No. WO 02/100854 A1 Fecha: DIC. 19, 2002			
6) Título (54) FORMULACIONES DE LACTONA Y METODOS DE USO			
7) Clasificación Internacional: C07D 407/00, 3405/12 A61K31/365			
8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	Estados Unidos	Junio 13, 2001	60/297,875
9) C mprobante de pago N°.03-93,855 y 04-195 Fecha: Dic. 23/03 y Ene.5/04			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina ✓			

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-7

Radicacion : 04001331 00000000

Folios: 107

Fecha (MM): 2004-01-09 16:26:13

Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NAC 411 PRESENTAC

Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 93,895

FECHA : DICIEMBRE 23 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CD. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4992063	23/12/2003	2,200,000.

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITE DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2003

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicaclon : 04001331 00000000 Folios: 107
Fecha (AND): 2004-01-09 16:26:13
Tramite : 011 PCT-POTENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 04 - 193
FECHA : ENERO 5 DE 2004

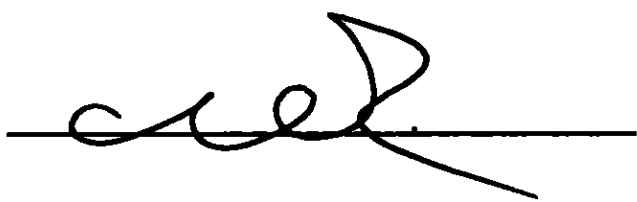
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8895901	05/01/2004	2,446,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	22,000.00
		TOTAL :	\$ 22,000.00

BON: VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades Indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros
1. Copia reporte internacional de búsqueda

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/100854 A1

(51) International Patent Classification¹: C07D 407/00, 305/12

(21) International Application Number: PCT/US02/18602

(22) International Filing Date: 12 June 2002 (12.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/297,875 13 June 2001 (13.06.2001) US

(71) Applicant: MAGNACHEM INTERNATIONAL LABORATORIES, INC. [US/US]; Suite 49, 4226 N.E. 1st Avenue, Boca Raton, FL 33431 (US).

(81) Designated States (*national*): AH, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventor: TERRERO, David; Calle Bohechío 629, Es-sanche Quinquela (DO).

Published:
— with international search report

(74) Agents: PABST, Patron, L. et al.; Holland & Knight LLP, One Atlantic Center, Suite 2000, 1201 West Peachtree Street, N.E., Atlanta, GA 30309-3400 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/100854 A1

(54) Title: LACTONE FORMULATIONS AND METHOD OF USE

(57) Abstract: Compounds of Formulae (Ia) and (Ic) having a lactone structure and a methylene group at the alpha-position of the lactone structure and methods for using and making the compounds have been disclosed. The lactone compounds can be reacted with a nucleophilic agent to open the lactone ring to a compound of Formula (Ib). The lactone of Formula (Ia) and its functional derivatives have been isolated from *Securidaca virgata*. The purified compounds have demonstrated activity in assays for anti-bacterial and anti-fungal activities, and for treating proliferation disorders such as cancer.

4
6

LACTONE FORMULATIONS AND METHOD OF USE

Field of the Invention

The present inventions are generally in the fields of pharmaceutically
5 active lactones, their pharmaceutical formulations, and method of use
thereof, and methods for the synthetic preparation of chemically
functionalized lactones useful therefor as anticancer and antiinfective agents.

Background of the Invention

Despite the development of many different compounds which are
10 useful in the treatment of infection, cancer, and other disorders, there
remains a need for the development of new compounds which may be
effective at lower dosages, more selective, having fewer side effects or
capable of treating diseases or disorders where resistance to the known
compounds has developed.

15 Chemotherapeutic agents are used for the treatment of infections,
cancer, abnormal proliferation disorders (endometriosis, restenosis,
psoriasis), and other disorders. Most chemotherapeutic agents have side
effects due to lack of specificity. For example, cancer is one of the leading
causes of death. One of the primary modes of treating cancer, chemotherapy,
20 is used specifically to limit cell growth and replication. Most chemotherapy
agents also affect neoplastic and rapid proliferating cells of normal tissues
(e.g., bone marrow, hair follicles, etc.), which results in several negative side
effects including hair loss, nausea, vomiting, and suppression of bone
marrow function. Moreover, effectiveness of these agents frequently
25 diminishes over time due to the development of resistance.

It is therefore an object of this invention to provide a novel class of
compounds effective as anti-infective and/or anti-proliferative agents.

It is another object of this invention to provide an effective
antineoplastic agent with specific cytotoxicity in order to minimize side
30 effects.

It is a further object of the present invention to provide antiinfective
agents which are specific and different from many other drugs currently in

76

use, to provide an alternative method of treatment for drug resistant organisms.

Summary of the Invention

Compounds of Formulae Ia and Ic having a lactone structure and a methylene group at the alpha-position of the lactone structure have been discovered. The lactone compounds can be reacted with a nucleophilic agent to open the lactone ring to a compound of Formula Ib. The lactone of Formula Ia and its functional derivatives have been isolated from *Securidaca virgata*. These compounds are referred to as LMSV-6 or Securoside™. The purified compounds have demonstrated activity in assays for anti-bacterial and anti-fungal activities, and for treating proliferation disorders such as cancer. Based on the *in vitro* assays, the lactones are useful for treating proliferation disorders including, for example, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, stomach cancer, pancreatic cancer, lung cancer, liver cancer, ovarian cancer, esophageal cancer, and leukemia. They are also effective for treatment of bacterial and fungal infections, including treatment of peptic ulcer disease, gingivitis and periodontitis.

The method for making a compound of Formulae Ia and Ic generally involves: a) providing a precursor having a lactone structure, and b) reacting the precursor with one or more chemical reagents to provide a product having a methylene group at the α -position of the lactone structure. The product can be treated with a nucleophilic agent such as an alcohol, alkoxide, amine, or any other neutral or anionic nucleophiles to generate a compound of Formula Ib.

Detailed Description of the Invention

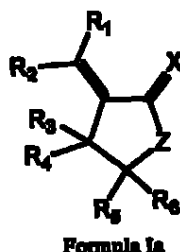
I. Lactone Compositions

A. Lactones Isolated from *Securidaca virgata*.

Lactones with an exocyclic methylene group and their respective derivatives with a hydroxyl in gamma position are disclosed. The lactones and the derivatives thereof can be synthesized or isolated from natural resources. In one embodiment, the lactones and the derivatives can be isolated by means of chromatographic methods, from a plant whose

taxonomic scientific name is *Securidaca virgata*, which belongs to Polygalaceae as its botanical family. As used herein, the term "lactones" encompasses any organic chemicals having a five-member ring lactone structure in which the oxygen atom of the C=O group can be replaced by a sulfur atom or a nitrogen grouping. The term "derivatives" as used herein refers to any compounds that are made from the lactones by reacting the lactones with one or more chemical reagents. The term also refers to any products obtainable by ring opening of the lactones with an organic or inorganic nucleophilic agents to form, for example, an acid, ester, amide, or any other products thereof.

In one embodiment, the lactone has the following chemical structure:



wherein

R₁-R₆ taken independently or R₃-R₆ taken together are a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or any other organic groupings containing any number of carbon atoms, preferably 1 – 8 carbon atoms, and optionally include a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats, representative R₁-R₆ groupings being alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl,

9 2

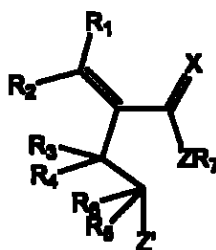
substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, or polypeptide group;

Z is a heteratom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in

5 linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteratom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats.

In another embodiment, the compound has the following chemical structure:



Formula Ib

10

wherein

R₁-R₇ taken independently or R₃-R₆ taken together may be a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or any other organic groupings containing any number of carbon atoms, preferably 1 – 8 carbon atoms, and optionally include a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats, representative R₁-R₈ groupings being alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-

20

25

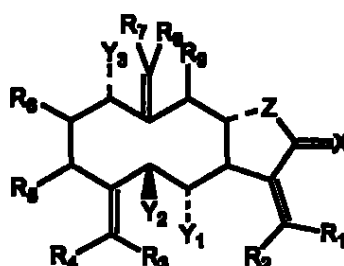
C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, or polypeptide group;

X is a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats;

5 Z is a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats; and

10 Z' may a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or any other organic composition containing from 1 ~ 8 carbon atoms and optionally include a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats.

In still another embodiment, the lactones having an alpha-methylene group can have the structure as show below:



Formula Ia

wherein

15 R₁-R₉ taken independently or R₅ and R₆ taken together may be a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or any other organic groupings containing any number of carbon atoms, preferably 1 ~ 8 carbon atoms, and optionally include a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats,

20 representative R₁-R₆ groupings being alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio,

25 arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino,

11

substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, or polypeptide group;

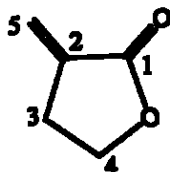
Y₁, Y₂, and Y₃ taken independently or Y₁ and Y₂ taken together may be a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or any other organic groupings containing any number of carbon atoms, preferably 1 – 8 carbon atoms, and optionally include a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats, representative R₁-R₆ groupings being alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, or polypeptide group;

Z is a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats; and

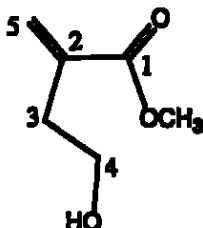
X is a heteroatom such as oxygen, sulfur, or nitrogen grouping in linear, branched, or cyclic structural formats.

In one embodiment, the lactone is a securolide, which is a alpha-methylene-lactone (1) having the structure:

12

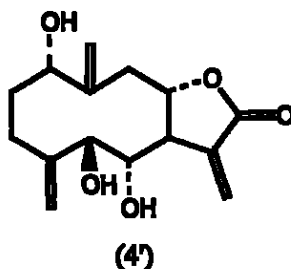


In another embodiment, the ester is methyl α -methylene- γ -hydroxybutanoate (2) as shown in the following structure:



5

In still another embodiment, the lactone is a bicyclic compound having the following structure:



10 B. Excipients

The lactone and functional derivatives can be formulated using standard techniques for enteral, parenteral, or topical administration.

Effective dosages can be determined based on the *in vitro* assays known to those skilled in the art, such as the assays described in the examples.

15 Suitable pharmaceutically acceptable vehicles for parenteral delivery include sterile saline, phosphate buffered saline, and standard microparticulate formulations for injection, including polymeric microspheres, microcapsules, liposomes, and emulsions. These can include

degradable polymers such as polylactic acid and polyglycolic acid, and copolymers thereof, polyanhydrides, polyorthoesters, polyhydroxyalkanoates. For injection, the lactones will typically be formulated as solutions or suspensions in a liquid carrier.

- 5 For topical delivery, the lactone may be formulated in an ointment, lotion, gel, spray, or controlled or sustained release formulation (such as a transdermal patch).

- For enteral delivery, the lactone may be formulated in a tablet, capsule, suspension or solution, dissolved or encapsulated in an excipient
10 such as a sugar like lactose, inert compound such as magnesium stearate, paraffin derivatives, glycols or gum arabic. The formulations may further include dyes, flavorings, preservatives, dispersing or emulsifying agents, or materials modifying release or stability properties of the formulations.

- The active compound may be used in combination with a second
15 pharmaceutically acceptable antimicrobial agent, such as nitroimidazole antibiotics, e. g. tinidazole and metronidazole; tetracyclines, e. g. tetracycline, doxycycline and minocycline; penicillins, e. g. amoxicillin and mezlocillin, cephalosporins, e. g. cefaclor, cefadroxil, cephadrine, cefuroxime, cefuroxime axetil, cephalixin, cefpodoxime proxetil,
20 ceftazidime and ceftazidione; carbapenems, e. g. imipenem and meropenem; aminoglycosides, e. g. paromomycin, macrolide antibiotics, e. g. erythromycin, clarithromycin and azithromycin; lincosamide antibiotics, e. g. clindamycin; rifamycins g. rifampicin, and nitrofurantoin.

- Combinations of the compounds with a pharmaceutical acid-lowering
25 agent may be used in the treatment of acid-related disorders, such as acid pump inhibitors, e. g., omeprazole and lansoprazole, or H₂ antagonists, e. g., ranitidine, cimetidine, and famotidine.

30 II. Synthesis of Lactones

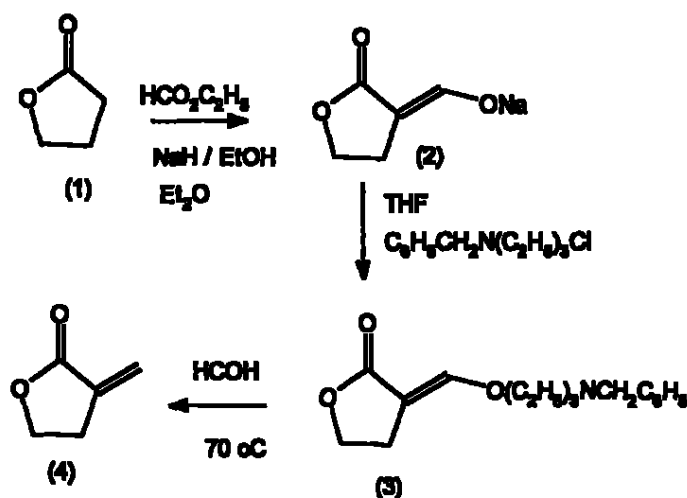
 The synthesis of the lactones and their respective derivatives involves the step of forming an alpha-methylene group. Generally, the method for

making a compound of Formulae Ia and Ic involves: a) providing a precursor having a lactone structure, and b) reacting the precursor with one or more chemical reagents to provide a product having a methylene group at the α -position of the lactone structure. The product can be treated with a nucleophilic agent such as an alcohol, alkoxide, amine, or any other neutral or anionic nucleophiles to generate a compound of Formula Ib.

Methods of forming the methylene group are standard techniques well documented in synthetic organic chemistry (see, for example, March, "Advanced Organic Chemistry," 4th Edition, 1992, Wiley-Interscience Publication, New York). The lactones can be synthesized, for example, by starting from a five-member lactone and then derivatizing the alpha position to add a methylene group onto the molecule.

For example, as shown by Scheme 1, reacting a compound having the structure (1) with a base, an alcohol and an ester produces an enolate, which is a precursor to lactone of structure (4) (See Scheme 1).

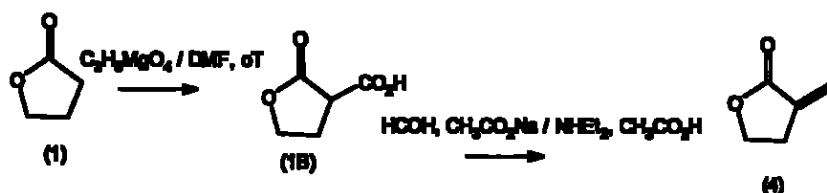
Scheme 1



The lactone (4) can be further derivatized using standard synthetic techniques available in the art of organic synthesis (see, for example, March, *Supra*). For example, carboxyl group functionalized lactones (4) can be prepared by, for example, reacting a compound having the structure (1) with an agent for alpha carboxylation of lactones (MMC, methyl-Mg-carbonate), and an aldehyde in the presence of a base such as triethylamine to yield the

15-

lactone of structure (4), which is the isolated naturally occurring lactone (Scheme 2).

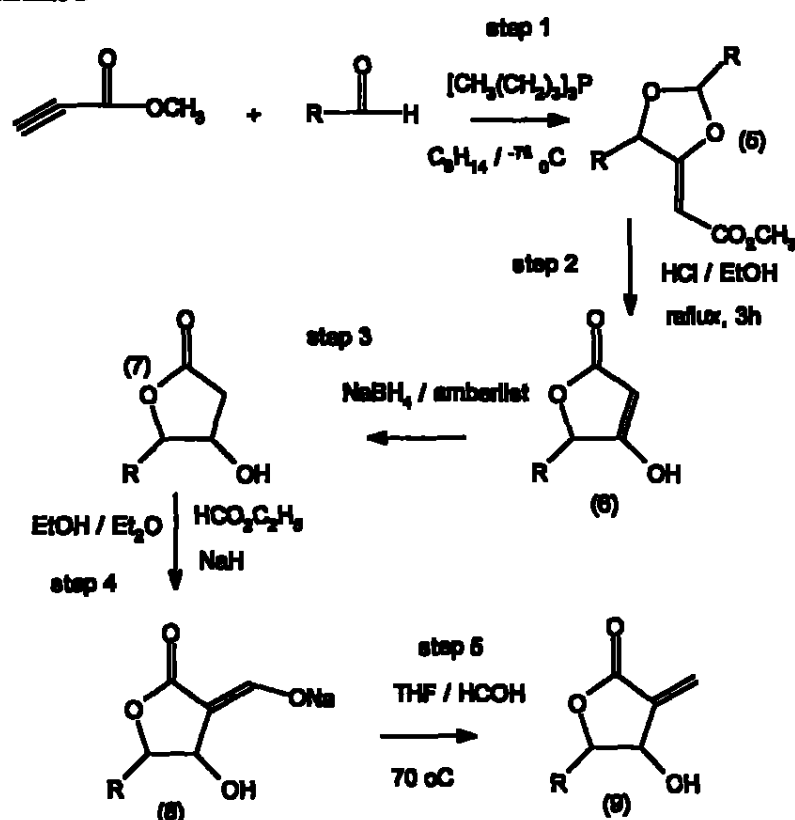


In Scheme 2, a functionalized methylene group lactone (4), is prepared by reacting a compound having the structure (1) with methyl-Mg-carbonate(MMC), an aldehyde in a buffer with a base NN-Dimethylformamide [DMF-HCON(CH₃)₂], to produce a carboxylic acid functionalized lactone (1B), and lactone (1B) is then treated with an aldehyde and Diethylamine, Sodium Acetate, Acetic Acid to produce lactone (4).

Other functionalized lactone derivatives can be readily prepared. For example, a functionalized derivative lactone (9) can be prepared by reacting a compound having the structure (5) with an inorganic acid and an alcohol by heating to reflux to produce an enol-lactone, which is then reduced with a base to produce a product of structure (7). Reaction of (7) with a base, an alcohol and an ester produces an enolate, which is a precursor to functionalized lactones of compound (9) (Scheme 3).

16

Scheme 3

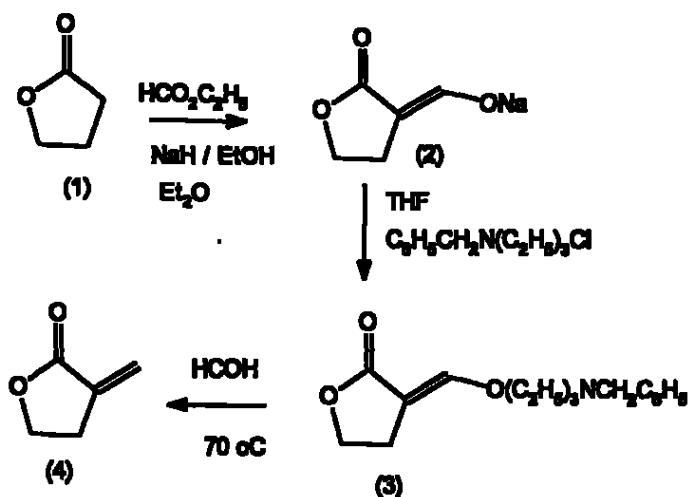


More functionalized lactones can be prepared by readily available synthetic method in the art (see, for example, March, "Advanced Organic Chemistry," 4th Edition, 1992, Wiley-Interscience Publication, New York).

- 5 For example, functionalized lactones (4) can be prepared by reacting a compound having the structure (1) with a base, an alcohol and a ester to produce an enolate, which is a precursor to lactone of structure (4) (Scheme 4).

16
17

Scheme 4



The pharmaceutically acceptable salts of the lactone compounds of the Formulae Ia-c, if in the form of an acid or a base such as an amine, can be prepared in a conventional manner by treating a solution or suspension of the compound of Formulae Ia-c with about one chemical equivalent of a pharmaceutically acceptable base or acid. Conventional concentration and recrystallization techniques are employed in isolating the salt.

III. Methods of Treatment

10 A. Disorders to be Treated

Based on the activities determined as described in the examples, the lactones are useful as anti-infectives and anti-proliferatives. In particular, the lactones can be administered in an effective amount to inhibit bacterial or fungal growth, viral disease or to treat a bacterial or fungal disease.

15 Examples of preferred bacterial disorders to be treated include peptic ulcer disease, gastritis, dyspepsia, periodontal disease and gingivitis. Fungicidal compositions are comprised of a fungicidally effective amount of a compound of formula 1 or a salt thereof and an inert pharmaceutical carrier. Examples of the pharmaceutical composition may be plain or sugar-coated
20 tablets, gelatin capsules, granules, suppositories, injectable preparations, ointments, creams or gels.

The fungicidal compositions are useful particularly on

18

Saccharomyces cerevisiae, *Candida albicans* and other *Candida* such as *Candida glabrata*, *krusei*, *tropicalis*, *pseudotropicalis* and *parapsilosis*, on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and to combat particularly digestive, urinary, vaginal or cutaneous candidosis, cryptococcosis, for example, neuromeningeal, pulmonary or cutaneous cryptococcosis, bronchopulmonary and pulmonary aspergillosis and invasive aspergillosis of the immunodepressive system. The compositions can also be used in the prevention of mycotic affections in congenital or acquired immunological suppressions.

The lactones can also be administered to treat proliferative disorders, including cancers. Representative types of cancers which have shown inhibition in cell growth or proliferation include breast cancer, lung cancer, ovarian cancer, esophageal cancer, and leukemia. Other types of abnormal proliferative disorders that the lactones may be useful in the treatment of include endometriosis and restenosis, caused by abnormal overproliferation of endothelial tissue following angioplasty.

The functionalized lactone (9) above is particularly useful as an aspartic protease inhibitor, and has been demonstrated to inhibit the aspartic protease of HIV-1, and thereby limit viral processing, and in particular post-translational processing of the viral gene products (gag / gag-pol).

These lactones are also useful in modulating pain response through its activity as a neurotransmitter.

B. Dosages

The effective amount will be determined based on the disease or disorder to be treated, the mode of administration and the formulation. Effective dosages can be routinely determined based on the effective dosages determined using *in vitro* assays such as those described in the examples.

The high activity of Securolide(LMSV-6) against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and its low molecular weight are advantageous. Advantages of Securolide include its facility and speediness to promote pharmacologic response; its

19

possibility to cross over cellular membrane barriers, where high molecular weight is the main hindrance, and its potent activity against *Pseudomonas*, which is one of the more drug resistant microorganisms.

5 The method for combating fungal infections comprises administering a fungicidally effective amount of a compound of formula I or an acid addition salt thereof by buccal, rectal, parental route, or by local route as a topical application on the skin and mucous membranes, but the preferred route is the buccal route. The usual daily dose is 1 to 5 mg/kg depending on the method of administration, the condition treated and the specific
10 compound.

The compounds may be administered alone, but will generally be administered in admixture with a pharmaceutical carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. For example, they can be administered orally or in the form of tablets
15 containing such excipients as starch or lactose, or in capsules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs or suspensions containing flavoring or coloring agents. In the case of animals, they are advantageously contained in an animal feed or drinking liquid in a concentration of about 5 to 5000 ppm, preferably about 25 to about 500 ppm
20 They can be injected parenterally, for example, intramuscularly, intravenously or subcutaneously. For parenteral administration, they are best used in the form of a sterile aqueous solution which can contain other solutes, for example, enough salt or glucose to make the solution isotonic. In the case of animals, compounds can be administered intramuscularly or
25 subcutaneously at dosage levels of about 0.1 to about 50 mg/kg/day, preferably about 0.2 to about 10 mg/kg/day given in a single daily dose or up to 4 divided doses.

The compounds can be administered to humans for the treatment of *H. pylori* infections by either the oral or parenteral routes and may be
30 administered orally at dosage levels of about 0.1 to about 50 mg/kg, advantageously about 0.5 to 50 mg/kg/day given in a single dose or up to 4 divided doses. For intramuscularly or intravenous administration, dose levels

20

are about 0.1 to about 100 mg/kg/day, preferably about 0.5 to about 50 mg/kg/day. While intramuscularly administration may be a single dose or up to 4 divided doses, intravenous administration can include a continuous drip. Variations will necessarily occur depending on the weight and condition of the subject being treated and the particular route of administration chosen as will be known to those skilled in the art.

The second antimicrobial agent and the acid-lowering agent may be administered with the compounds in the same manner as discussed above for the compounds of the invention. Thus, depending on the particular agent, administration may be orally at about 0.1 to about 500 mg/kg, for instance at about 1 to 3 grams per day of second antimicrobial agent, and about 40 to 80 mg per day of the acid-lowering agent, or by injection at about 0.1 to about 200 mg/kg/day.

The present invention will be further understood by reference to following non-limiting examples.

Example 1: Isolation of Lactone from *Securidaca virgata*.

Securidaca virgata roots were collected at San Cristobal Dominican Republic. A sample voucher of aerial part was sent to National Botanic Garden in order to be identified. Air dried, chopped and milled roots (253 g) were extracted in a Soxhlet apparatus. The cold extract was filtered and then concentrated *in vacuo* (55°C) to afford a syrupy liquid (29.76 g) that means 11.76% of yield. This syrup (28 g, tested microbiologically) was treated with 300 ml of Sulfuric acid 0.5M and stirred for 4 hours and then extracted in a liquid-liquid extraction with chloroform successively until the syrup was separated from the acid chloroform soluble matter. Then the hydrosoluble phase was basified with Ammonium hydroxide 20% (pH =8 -9) and the hydrosoluble phase extracted again with chloroform. The chloroform extract was concentrated *in vacuo* (50°C), to yield an extract of 5.92 g (yield =21.14% with regard to crude extract and 2.33% with regard to roots extracted). The 5.92 g had a purity of 95.34 % LMSV-6 (Securoside™). The final chloroform extract (5.92 g) were chromatographed in basic alumina (63 -150 µm) and eluted with petroleum ether-ethylacetate mixture (30:70).

21

- Fractions collected were concentrated to have a pure clear liquid substance (SecurolideTM) (1). Chromatographic fractions 72-97 (674 mg) from the liquid chromatographic column where (1) was isolated was again chromatographed to obtain an amber colored liquid (2). Compound (1) and
- 5 (2) were then tested in bioassays.

Spectroscopic analysis yielded the following data for compound (1):

PHYSICAL DATA

RELATIVE DENSITY: 1.070 g/mL pH ≈ 5.853

REFRACTIVE INDEX = 1.471

10 **SPECTRAL DATA**

Mass spectrometry: MS m/z (rel. Int.): molecular ion 98.0 [M⁺], (54), 68 (100), molecular formula C₇H₆O₂.

Infrared Spectroscopy (IR): 1761.6 cm⁻¹ (lactone), 1667 cm⁻¹ (C=C) 810 cm⁻¹ (C=CH₂).

- 15 *Proton Nuclear Magnetic Resonance* (NMR¹H, 200 MHz, CDCl₃): δ 2.98 ppm (2 H multiplet), 4.37 ppm (1H triplet, J=7.4 Hz), 5.65 (1H triplet, J=2.6 Hz), 6.22 (1H triplet, J=2.6.)

Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance (NMR¹³ C 200 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (C-1), 133.3 (C-2), 27.4 (C-3), 65.5 (C-4), 122.2 (C-5)

- 20 *Double Nuclear Magnetic Resonance Protonic Experiments (Irradiations)*
double Nuclear Magnetic Resonance Proton Experiments showed coupling between each one of existing protons. Methylenic exocyclic protons δ (5.65 and 6.22), irradiation of C-3 showed coupling with C-4 and in this way were determined all protons connectivity of (1).

- 25 Spectroscopic analysis yielded the following data for compound (2):

Mass Spectrometry: 130.0 (M⁺, 3), 113 (M + OH, 12), C₆H₁₀O₃.

Infrared Resonance (IR): 3614.6 cm⁻¹ (OH), 1629 cm⁻¹ (C=C) 1150.9 (-CO-OCH₃), 810 cm⁻¹ (C=CH₂).

- Proton Magnetic Nuclear Resonance Spectrometry* (200 MHz, CDCl₃): δ
- 30 2.54 ppm (2 H td J=6.26 Hz), 3.73 (s), 3.72 (2H, t J=6.26 Hz), 5.65 (1H t, J=1.2 Hz), 6.21 (1H t, J=1.2 Hz).

Carbon ¹³ Magnetic Nuclear Resonance Spectrometry (200 MHz, CDCl₃): δ

22

167.8 (C-1), 137.2 (C-2), 35.4 (C-3), 61.3 (C-4), 127.3 (C-5), 51.93 (C-6).

Ampoules consisting of a pharmaceutical composition containing the compound of the formula 1 (Securolide) had the following ingredients:

Original Quantity:		750 Amp	
5	Raw material	Weight	UM
	LMSV-6 (Securolide)	51.7900 mL	6.27%
	Sesame oil	760.8200 mL	92.20%
	Bencilic Alcohol	12.3750 mL	1.50%
	U. S. P.		
10	Total Volume	824.9850 mL	99.97%

Example 2: Assays for Anti-bacterial Activity.

The material obtained in Example 1 was screened for antibiotic activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumonias*.

15 Materials and Methods:

Solvent: Buffer Phosphate 0.1 N, pH=8.0

Antibiotic: LMSV-6 (Pure, Securolide)

Medium conc: 2 mL/100 mL

Inoculum: 4mL/Petri Dish

20 Preparation of Culture Medium:

Culture Medium for *Staphylococcus aureus* (USP 23 <81>)

	Peptone	1.0g
	Digestive pancreatic Caseine	4.0g
	Yeast Extract	3.0g
25	Beef Extract	1.5g
	Dextrose	1.0g
	Agar	15.0g
	pH after sterilization	66 ± .01

Culture Medium for *Pseudomonas aeruginosa* (USP 23 <81>)

30	Pancreatic digestive Casein	17.0g
	soy Papain digestive	3.0g
	Sodium Chloride	5.0g

23

- 5

Dibasic Potassium Phosphate

2.5g

Dextrose

2.5g

Agar

20.0g

Water to make about

1.0 Lit

pH after sterilized

7.2 ± 0.1

Culture Medium for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (USP 23 <81>)
- 10

Peptone

5.0g

Yeast Extract

1.5g

Beef Extract

1.5g

Sodium Chloride

3.5g

Dextrose

1.0g

Dibasic Potassium Phosphate

3.68g

Monobasic Potassium Phosphate

1.32g

Water To make about

1.0 Lit

pH after sterilized

7.0 ± 0.05

		Concentration (µL/10mL)							
Bacteria	LM5V-6 (pure)	0	20	30	40	Ciprof	fosf	is(-)	Dis(+)
<i>E. coli</i>	30(mm)	-	-	-	-	28	10	-	-
<i>Kleb</i>	40	-	-	-	-	26	22	-	-
<i>Ps. A</i>	30	-	-	-	-	12	6	-	-
<i>St. a</i>	30	-	-	-	-	20	18	-	-
<i>Str. P</i>	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

- Unit to measure zone of inhibition is millimeters (mm)
- 20

Ciprof =Disc of sensitivity Ciprofloxacin 5 micrograms

Fosf =Disc of sensitivity Fosfomicin 50 micrograms

Dis(-)=Disc of sensitivity with no substance applied

Dis(+)=Disc of sensitivity with 20 microliters of Tween 60 at 2%

N/A =not done Test
- 25

Microorganisms used were standardized by American Type Culture

27
24

Collection (ATCC), used in first generation:

E. coli ATCC 352 18, Lot 202602, Exp. 05/2000 (19-258)

*Kleb. *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 13882, Lot 202 174, Exp 02/2000 (19-152)

5 *Ps. A *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Lot 202992, Exp 08/2000 (19-060)

*St. A *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, Lot 202564, Exp 05/2000 (19-137)

10 **Str. P *Streptococcus pyogenes*, ATCC 2 1547, Lot 202691, Exp 06/2000 (19-190)

*=Atmospheric oxygen, Temp =35 ± 2°C

**=Atmospheric CO₂, Temp =35 ± 2°C

Results:

15 5 microliters of LMSV-6 (Securolide) inhibits growth of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Dilutions :

10 microliters/10 mL, (0.001 microliters/mL)

20 microliters/10 mL, (0.002 microliters/mL)

20 30 microliters/10 mL (0.003 microliters/mL)

and 40 microliters mL(0.004 microliters/mL)

of LMSV-6 in 10 mL Tween 60 -2% did not exhibit inhibition of bacterial growth, indicating that these concentrations are below the Minimum Inhibitory concentration (MIC).

25 **Example 3: Determination of Minimum Bacterial (*Sarcina lutea* and Inhibitory Concentration, MIC, LMSV-6 (Securolide).**

Materials and Methods:

Methodology: Poured in plate, medium Mueller Hinton pH=8

Buffer pH=8 for ceftriaxone pattern dilution

30 Tween 20 at 2% for LMSV-6 (Securolide) dilution

Microorganism: *Sarcina lutea*

24
25

Sample(s): LMSV-6 (16.0 microliters/100 mL and 10 microliter applied to sensitivity disc).

Methodology: Poured in plate, medium Mueller Hinton p&t8

Buffer pH=8 for ceftriaxone pattern dilution

5 Tween 20 at 2% for LMSV-6 (Securolide) dilution

Used Microorganism : *Sarcina lutea*

Sample(S): LMSV-6 (10 microliters/mL and 20 microliter applied to sensitivity disc)

Control Pattern (P): Ceftriaxone (disc with 10 mcg)

10 Results:

APPLIED VOLUME TO DISC ZONE OF INHIBITION

5 microliters 42.0 mm

1.6 microliters 20.0 mm

There was no significant zone of inhibition, therefore the Minimum

15 Inhibitory Concentration is close to 0.2 microliters of LMSV-6.

The approximate MIC is 0.2 microliters of LMSV-6 3.3 mm inhibition

Example 4: *In vivo* Treatment of Bacterial Infection.

Rats were infected in surgery and then successfully treated with Securolide using doses calculated based on comparison with ceftriaxone.

20 Example 5: Assays for Anti-neoplastic Activity

Materials and Methods:

There are a large number of biological assays that require the measurement of surviving or proliferating mammalian cells. This can be achieved by different methods, e. g. counting cells that exclude or include a dye; measuring released ⁵¹Cr labeled protein after cell lysis; and measuring incorporation of radioactive nucleotides radioactive [³H]thymidine) or [¹²⁵I]iododeoxyuridine) during cells proliferation. Viable cells can be measured by using any of several staining methods, but a more accurate method is the multiwell scanning spectrophotometers (ELISA readers) which can measure large number of samples with a high degree of precision.

30

A colorimetric assay to detect living cells, utilizing a colorless substrate that is modified to a colored product by any living cell, but not by

25
26

dead cells or tissue culture medium, was used. The assay uses Tetrazolium salts MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide] to measure the activity of various dehydrogenase enzymes (Slater et al. 1963). The Tetrazolium ring is cleaved by active mitochondria, so this reaction only occurs in living cells. The cleavage of MTT into Formazan by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase produces a dark blue colored compound (Formazan) whose amount is proportional to the number of cells present. The Formazan concentration in a gradient of Securoside concentrations was measured by multiwells scanning spectrophotometer (ELISA reader). Data analysis was then used to establish the Inhibitory concentration fifty (IC₅₀) which is a quantitative parameter of antineoplastic activity. Different cancer cells lines were tested in order to measure indirectly the cytotoxic or antineoplastic activity (surviving cells) of LMSV-6 (Securoside). Cancer cell lines that were tested included HEP 2 (Larige carcinoma) and HELA (Cervix Carcinoma).

MATERIALS:

Culture Medium (DMEN +all)
EDTA
Trypsin-EDTA
20 DMEM + ALL and 10% TERNERO RECENTAL SERUM.
Dimethyl sulfoxide
MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
Multiwell scanning spectrophotometers (ELISA readers)

METHODS:

25 Cells were cultured using standard techniques. See, for example, R. Ian Freshney "Culture of Animal Cells" A Manual of Basic Technique (Alan R Lisa, Inc., New York, Second Edition) p. 245-256.

Assessment of cell growth inhibition was determined according to the methods of Skehan et al., J. Nat. Cancer Inst. 82, 1107 (1990). Cells were
30 plated between 400 and 1200 cells/well in 96 well plates and incubated at 37°C for 15-18 h prior to drug addition to allow attachment of cells.
Compounds tested were solubilized in 100% DMSO and further diluted in

26
27

RPML-1640 containing 10 mM HEPES. Each cell line was treated with 10 concentrations of compounds (5 log range). After a 72 H incubation, 100 ml of ice-cold 50%TCA was added to each well and incubated for 1 h at 4°C. Plates were then washed 5 times with tap water to remove TCA, low-molecular-weight metabolites and serum proteins. Sulforhodamine B (SRB) (0.4%, 50 mL) was added to each well. Following a 5 min incubation at room temperature, plates were rinsed 5 times with 0.1% acetic acid and air dried. Bound dye was solubilized with 10 mM Tris Base (pH 10.5) for 5 min on a gyratory shaker. Optical density was measured at 570 nm.

- 10 See also Gerlier, et al. *J. Immunol. Meth.* 94, 57-63 (1986); Slater, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 383-393 (1963); Kasugai, et al., *Japan J. Pharmacol.* 52,95-100 (1990); Mosmann *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63 (1983); Denizot, et al., *J. Immunol. Methods*, 89, 271-277 (1986).

- 15 Data were fit with the Sigmoid-Emax concentration-Effect model (see Holford, N. H. G.: Scheiner, L. B., "Understanding the dose-effect relationship: Clinical applications of pharmaco-knetic-pharmacodynamic models.", *Clin. Pharmacokin.* 1981, 6,429-453) with non-linear regression, weighted by the reciprocal of the square of the predicted response. The fitting software was developed by the Roswell Park Institute with Microsoft
20 FORTRAN, and uses the Marquardt algorithm (see Marquardt, D. W., "An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters", *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 1963, 11, 431-441) as adopted by Nash (see Nash J. C., "Compact numerical method for computers: Linear algebra and function minimization". John Wiley & Sons, New York, 1979) for the non-linear
25 regression. The concentration of drug which resulted in 50% growth inhibition (IC_{50}) was calculated.

Results:

LMSV-6 CYTOTOXIC ASSAY IN HEP-2 CELLS POPULATION OF 10^5 Cells/mL (LARINGE CARCINOMA)

- 30 $r=0.9878$

$IC_{50}=10.38 \mu/mL$

28

**LMSV-6 CYTOTOXIC ASSAY IN HEP-2 CELLS POPULATION OF
10⁶ Cells/mL (LARINGE CARCINOMA)**

r=0.9941

IC₅₀=37.37 µg/mL

**5 LMSV-6 CYTOTOXIC ASSAY IN HELA CELLS POPULATION OF
10⁶ Cells/mL (CERVIX CARCINOMA)**

r=0.9950

IC₅₀=7.37 µg/mL

**10 LMSV-6 CYTOTOXIC ASSAY IN HELA CELLS POPULATION OF
10⁶ Cells/mL (CERVIX CARCINOMA)**

r=0.9941

IC₅₀=27.30 µg/mL

Example 6: Testing for Inhibition of *H. pylori*

Materials and Methods:

- 15 **Agar Dilution of Antimicrobial compound:** 6 mg. of the compound
to be evaluated is solubilized in 0.6 ml 100% dimethylsulfoxide (DMSO)
and then brought up to 6 ml with sterile brucella broth. The final
concentration of DMSO is 10% of the total volume. Serial 2-fold dilutions (3
ml Securolide +3 ml brucella broth) are then made in sterile brucella broth. A
20 2 ml aliquot of each broth dilution within the series is placed in separate
sterile petri dishes, to which 18 ml of melted and cooled (approx. 50°C)
brucella agar supplemented with 7% horse blood is added. This yields a final
1:10 dilution of Securolide in agar, and a final concentration of DMSO of
1%. For example, if the highest concentration of drug in agar is 100 µg/ml.
25 Agar plates can be prepared one day prior to inoculating, and refrigerated
overnight.

- Inocula Preparation:** *Helicobacter pylori* cultures were maintained on
trypticase soy-5% sheep blood agar plates, and transferred every 48 hours.
Helicobacter mustelae cultures were maintained on the same agar and
30 transferred every 48-60 hours, depending upon the extent of the growth of
the previous transfer. Plates are incubated at 37°C in GasPak jars with water-

29

activated (10 ml) CampyPak Plus (BBL Microbio. Systems) envelopes with palladium catalyst.

Helicobacter cultures can be grown in *brucella* broth supplemented with 10% fetal calf serum in 10 ml volumes in deep petri dishes. The plates
5 are incubated for 18-20 hours at 37°C in GasPak jars with water-activated (10 ml) CampyPak Plus envelopes with palladium catalyst on a shaker at 50 rpm.

Overnight cultures (approximately 10^8 CFU/ml) are diluted 10-fold in *brucella* broth (no FCS) in screwcapped tubes for use as the standard
10 inoculum. The wells of a Steer replicator are filled with 0.8 ml of the diluted organism, and approximately 2×10^4 cells in 0.002 ml are placed on the agar surface. Inoculated plates are placed in a GasPak jar to which water-activated (10 ml) Campy Pak Plus envelopes with palladium catalyst have been added, and incubated at 37°C. for 48 hours.

15 Results:

Following incubation, all test plates are compared to a Securolide-free growth control plate. The MIC is the concentration which inhibits growth compared to the control plate. A thin film of growth might be visible at higher concentrations but this is discounted, and not considered the true
20 MIC. Control organisms are also inoculated on each plate, and these are diluted 1000-fold for use as inocula. The control organisms include *Campylobacter jejuni*, and the screening cultures of *E. coli* [ATCC 35218, Lot 202602, Exp 05/2000 (19-258)], *Pseudomona aeruginosa* [ATCC 27853, Lot 202992, Exp 08/2000 (19-060)], *E. cloacae*, *Providencia stuartii*
25 and *P. rettgeri*. Plates and/or inocula transfers should not be out of the microaerophilic environment longer than 2 hours. All manipulations involving *Helicobacter* cultures was performed in a laminar flow hood to decrease the chance of contaminating the cultures with mold.

The mouse model of Lee et al., Gastroenterology, 99, 1315-23 (1990)
30 is used to predict the *in vivo* activity of a compound against *H. pylori* in humans.

Helicobacter felis is grown in *brucella* broth with 10% fetal bovine



serum. A frozen culture is quickly thawed; the culture is checked for motility and 0.5 mL of the thawed frozen culture is inoculated into a deep tissue culture dish containing 9.5 mL of the brucella/serum mix. The dishes are put into a Cappy Pak jar [BBL] to insure a microaerophilic atmosphere.

- 5 The jar is put on a rotary shaker at 60 RPM in a 37°C incubator. After 18 hours there should be visible turbidity. The culture is checked for purity and motility under a (phase) microscope and then pooled into a flask. Swiss-Webster female mice (18-20 g) are fasted for 18 hours before infection. The mice are infected three times on alternate days during a single week. Dosing
- 10 begins two weeks after the last dose of organism. Treatments are given once per day for fourteen consecutive days. Sacrifice is about three weeks after completion of therapy. For each mouse, the stomach is excised and opened along the greater curvature. A plug (a 3 mm Tissue section) is taken from the antrum region of the stomach. The plug surfaced is washed, minced, and
- 15 dropped into a tube with 100 microliters of urease reagent. The urease reagent (pH 6.3-6.5) contains urea and phenol red. If *Helicobacter* is present, urease will break down urea producing a change of pH. Purple (alkaline) is positive for *Helicobacter*; red/yellow (no change) is negative. Any color change is recorded after 18 hours. There are usually twenty mice per
- 20 treatment group; the percent positive for each group is recorded.

There are several methods used clinically to determine whether *Helicobacter pylori* is present in a human subject. These are employed for initial diagnosis of infection prior to treatment, as well as for determining the success of treatment in eradicating the organism from the patient.

- 25 The urea breath test involves ingestion of radiolabelled urea. *H. pylori* produces an urease enzyme which degrades urea; mammalian gastric cells do not contain this enzyme. Exhalation of labeled carbon dioxide (analyzed by mass spectrometry or radioactivity, depending on the isotope employed) therefore indicates that *H. pylori* is present.

- 30 Serology can also be used to assess infection with *H. pylori*. Detection of serum antibodies to *H. pylori*, such as IgG and IgA, is carried out using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Numerous different

31

H. pylori proteins can be employed as antigens.

Endoscopy of the patient provides samples of tissue which can be cultured in a microaerophilic environment to diagnose *H. pylori* infection. Alternatively, the sample can be examined histologically by employing one of a number of stains such as Giemsa or hematoxylin-eosin. An urea test which takes advantage of the production of urease by *H. pylori*, can also be applied. This test relies on the formation of ammonia from the urea hydrolysis, which results in an observable change in pH, that is an indication of the eradication of *H. pylori*.

Results:

Comparison of patient condition by endoscopy before and after treatment with the compound of example 1 has shown a decrease or absence of *H. pylori*.

Example 7: Determination of Fungal Activity

Materials and Methods:

METHODS

Anti-fungal Activity of the Product may be determined as follow.

Female mice weighing 18 to 22 g were used and a quantity of *Candida Albicans* 44858 was administered into a vein in the tail at the rate of 10^6

CFU per mouse (CFU: colony forming unit). The mice were separated into 5 batches of 5 mice and they were treated in the following manner:

One Hour After Infection

group 1: the mice were treated with product at 25 mg/kg orally

group 2: the mice were treated with product intraperitoneally at the

dose of 25 mg/kg

group 3: the mice were treated orally with Ketoconazole at 25 mg/kg

group 4: the mice were treated intraperitoneally with Ketoconazole at a dose of 25 mg/kg

group 5: the mice did not receive any anti-fungal treatment.

The dead mice were counted over a period of 22 days.

Results:

The activity of product was excellent at the dose used in the two

32

administration methods. The same treatments were also effective in the "topical model" with dermal fungi, for example trichophyton, and in the sublethal model.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

- 5 *Candida albicans* cells were prepared as indicated in the J. Antimicrobial Chemotherapy 38, 579-587, and were washed 3 times with a 0.1 M phosphate solution and used immediately to determine the minimal inhibitory concentration (MIC). The MICs were determined by modification of a microtitre plate according to the standard method of the laboratory
- 10 clinical standards of the Comite National.

- RPMI-1640, and L-glutamine buffered at pH 7 with a 0.15 M solution of MOPS (3-[N-morpholino]propane sulfonic acid). *Candida albicans* cells (1.5×10^3 cells/ml) were added to the wells of a 96-well plate containing RPMI-1640 and dilutions of antifungal agents. The results were read 48
- 15 hours after incubation at 35°C and the MIC or the minimal inhibitory concentration which inhibited the growth of the *Candida albicans* cells was determined.

Minimal Fungicidal Concentration

- After reading the MIC at 48 hours, the plates were shaken and 10 µl
- 20 of well aliquot was removed from the wells which was placed on rectangular disks containing dextrose sugar. The plates were incubated for 48 hours at 35°C and the minimal fungicidal concentration and the concentration of the antifungal agent at which there were no number of colony forming units.

- Concomitant assays were made where LMSV-6 showed high activity
- 25 against *Candida albicans*.

Example 8: Treatment of Periodontal Disease

- It has been found that the Securoside is selectively effective against the specific anaerobic gram negative organisms associated with gingivitis, when topically applied to the affected gingiva.
- 30 The minimum inhibitory concentration (MIC) needed to kill *Bacteroides asaccharolyticus* (Forsyth strain), determined according to the procedure of Walker et al (Antimicrobial and Chemotherapy, Vol. 16, p.

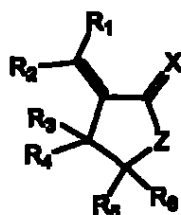
22
33

452-457, (1979), is between 6 to 60 micrograms per ml. The MIC value for *B. gingivitis* is 6 micrograms per ml. The MIC value for *B. gracilis* and *Fusobacterium*, other gram negative organisms is about 25 for each; and the MIC value for the gram positive organism *Actinomyces viscosus* is 60 for
5 the aerobic strain and 60 for the anaerobic strain.

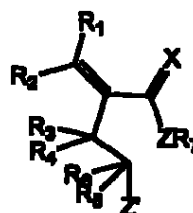
97
34

I claim:

1. An isolated compound defined by one of the following structures:



Formula Ia



Formula Ib

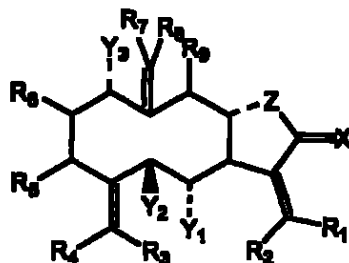
wherein R₁-R₇ taken independently or R₃-R₈ taken together are a hydrogen atom or a group or grouping selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats;

Z' is a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or an organic group having 1-8 carbon atoms which includes a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats, or an isolated lactone defined by the following structure:

35



Formula Ic

wherein

R₁-R₉ taken independently or R₅ and R₆ taken together may be a hydrogen atom or any other groups or groupings selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Y₁, Y₂, and Y₃ taken independently or Y₁ and Y₂ taken together may be a hydrogen or any other groups or groupings selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20

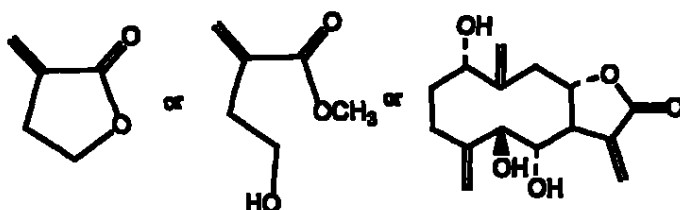
36

cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

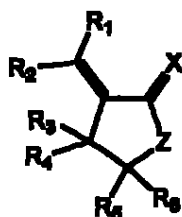
Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats.

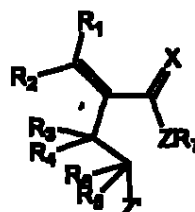
2. The compound of claim 1 defined by Formula Ia.
3. The compound of claim 2 wherein the X is an oxygen.
4. The compound of claim 2 wherein R₅ is an exocyclic methylene.
5. The compound of claim 1 defined by Formula Ib.
6. The compound of claim 1 which has one of the following structure.



7. The compound of claim 1 of Formula Ia wherein the lactone is isolated from a *Securidaca virgata*.
8. The compound of claim 1 of Formula Ia further comprising a pharmaceutically acceptable carrier for parenteral, enteral, or topical administration.
9. A method of treating a patient in need thereof, comprising administering an effective amount of the compound defined by one of the following structures:



Formula Ia



Formula Ib

wherein R₁-R₇ taken independently or R₃-R₆ taken together are a hydrogen atom

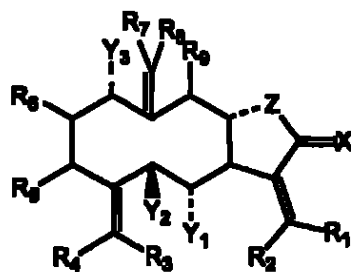
37

or a group or grouping selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats;

Z' is a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or an organic group having 1-8 carbon atoms which includes a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats, or an isolated lactone defined by the following structure:



Formula Ic

wherein

R₁-R₉ taken independently or R₃ and R₆ taken together may be a hydrogen atom or any other groups or groupings selected from the group consisting of

38

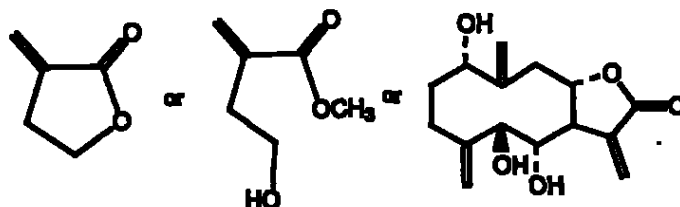
alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aryloxy, substituted aryloxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Y_1 , Y_2 , and Y_3 taken independently or Y_1 and Y_2 taken together may be a hydrogen or any other groups or groupings selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aryloxy, substituted aryloxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

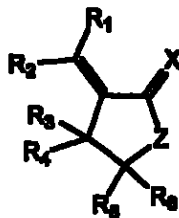
Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats.

10. The method of claim 9 wherein X is oxygen.
11. The method of claim 9 wherein R_4 is an exocyclic methylene.
12. The method of claim 9 wherein the compound has one of following structures:



13. The method of claim 8 wherein the compound of Formula Ia is administered orally, parenterally, topically, or transdermally.
14. The method of claim 9 wherein the patient has a proliferation disorder.
15. The method of claim 14 wherein the proliferation disorder is cancer.
16. The method of claim 9 wherein the patient has an infection.
17. The method of claim 16 wherein the infection is bacterial.
18. The method of claim 16 wherein the infection is fungal.
19. The method of claim 9 wherein the patient has peptic ulcer disease.
20. The method of claim 19 wherein the peptic ulcer disease is linked to the presence of *Helicobacter pylori*.
21. The method of claim 9 wherein the patient is in pain.
22. The method of claim 9 further comprising administering the compound of Formula Ia in a pharmaceutically acceptable carrier.
23. The method of claim 22 wherein the carrier for oral administration is a mouthwash, lozenge, tablet, capsule, solution, suspension, granule, or any combination thereof.
24. The method of claim 22 wherein the carrier for topical administration is a suppository, ointment, cream, gel, paste, collodion, glycerogelatin, liniment, lotion, paste, plaster, powder, tape, patch, aerosol, solution, tincture, or any combination thereof.
25. A process of isolating a lactone from a plant, the lactone being defined by the following structure:



wherein R₁-R₇ taken independently or R₃-R₆ taken together are a hydrogen atom or a group or grouping selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

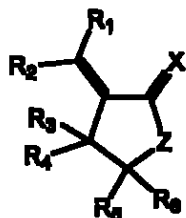
X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats, comprising extracting the lactone from plant material.

26. The process of claim 25 wherein the plant is *Securidaca virgata*.

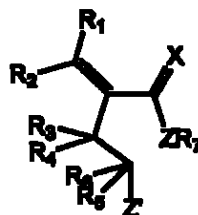
27. The process of claim 25 wherein the method of isolation is extraction followed by chromatography.

28. A synthetic compound defined by one of the following structures:

41



Formula Ia



Formula Ib

wherein R₁-R₇ taken independently or R₃-R₆ taken together are a hydrogen atom or a group or grouping selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C₁-C₂₀ cyclic, substituted C₁-C₂₀ cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

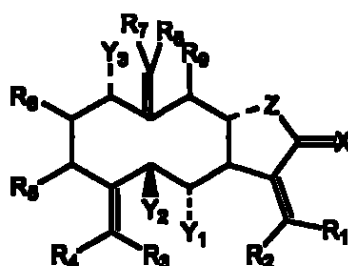
Z is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats;

Z' is a hydrogen atom, a halogen atom, a hydroxyl group, or an organic group having 1-8 carbon atoms which includes a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteroatom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats, or

42

an isolated lactone defined by the following structure:



Formula Ic

wherein

R₁-R₉ taken independently or R₅ and R₆ taken together may be a hydrogen atom or any other groups or groupings selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl, sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Y₁, Y₂, and Y₃ taken independently or Y₁ and Y₂ taken together may be a hydrogen or any other groups or groupings selected from the group consisting of alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, phenyl, substituted phenyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, halo, hydroxyl, alkoxy, substituted alkoxy, phenoxy, substituted phenoxy, aroxy, substituted aroxy, alkylthio, substituted alkylthio, phenylthio, substituted phenylthio, arylthio, substituted arylthio, cyano, isocyano, substituted isocyano, carbonyl, substituted carbonyl, carboxyl, substituted carboxyl, amino, substituted amino, amido, substituted amido, sulfonyl, substituted sulfonyl,

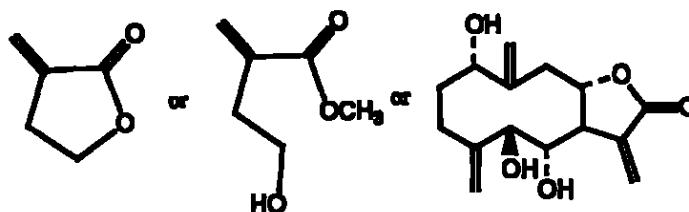
43

sulfonic acid, phosphoryl, substituted phosphoryl, phosphonyl, substituted phosphonyl, polyaryl, substituted polyaryl, C1-C20 cyclic, substituted C1-C20 cyclic, heterocyclic, substituted heterocyclic, aminoacid, peptide, and polypeptide groups;

Z is a heteratom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats; and

X is a heteratom selected from the group consisting of oxygen, sulfur, and nitrogen groupings in linear, branched, or cyclic structural formats.

29. The compound of claim 28 defined by any of the following structure:



30. A method of making a compound of Formulae Ia and Ic comprising:

- providing a precursor having a lactone structure, and
- reacting the precursor with one or more chemical reagents to provide a product having a methylene group at the α -position of the lactone structure.

31. A method of making a compound of Formula Ib comprising:

- providing a precursor having a lactone structure,
- reacting the precursor with one or more chemical reagents to provide a product having a methylene group at the α -position of the lactone structure, and
- reacting the product with a nucleophile.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/18902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07D 407/00, 305/12

US CL : 549/305, 313, 322; 514/470,473

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 549/305, 313, 322; 514/470,473

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-57797 A2 (KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) 05 February 2002 (05.02.02), see abstract.	1-31

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents	
* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention
* "B" another application or patent published on or after the international filing date	* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	* "A" document member of the same patent family
* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

03 September 2002 (05.09.2002)

Date of mailing of the international search report

23 SEP 2002

Name and mailing address of the ISA/US

Comptroller of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Arthur A. Owens

Telephone No. 703-308-1235

45

CAMPO DE LA INVENCION

Las invenciones de la presente son generalmente del
5 campo de las lactonas activas farmacéuticamente, sus
formulaciones farmacéuticas, y método de uso de las mismas,
y métodos para la preparación sintética de lactonas
funcionales químicamente de las mismas útiles como agentes
anti-infecciosos y anti-cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A pesar del desarrollo de muchos compuestos diferentes
que son útiles en el tratamiento de las infecciones,
cáncer, y de otros trastornos, persiste una necesidad por
15 el desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser efectivos
en dosificaciones inferiores, más selectivas, que tengan
menos efectos colaterales o capaces de tratar enfermedades
o trastornos en donde se ha desarrollado resistencia a los
compuestos conocidos.

20 Los agentes quimioterapéuticos son usados para el
tratamiento de infecciones, cáncer, trastornos de
proliferación anormal (endometriosis, restenosis,
psoriasis), y otros trastornos. La mayoría de los agentes
quimioterapéuticos tienen efectos colaterales debido a la
25 falta de especificidad. Por ejemplo, el cáncer es una de

las causas que conducen a la muerte. Una de las modalidades primarias de tratar cáncer, la quimioterapia, es usada específicamente para limitar el crecimiento y la replicación celular. La mayor parte de los agentes de quimioterapia también afectan a las células de proliferación rápida y neoplásticas de los tejidos normales, por ejemplo médula ósea, folículos pilosos, etc.), los cuales dan como resultado varios efectos colaterales negativos que incluyen la pérdida del cabello, náuseas, vómitos, y supresión de la función de la médula ósea. Además, la efectividad de estos agentes disminuye frecuentemente con el tiempo debido al desarrollo de resistencia.

Por consiguiente, es un objeto de esta invención proporcionar una nueva clase de compuestos efectivos como agentes anti-infecciosos y/o antiproliferativos.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un agente anti-neoplástico efectivo, con citotoxicidad específica, a fin de minimizar los efectos colaterales.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar agentes anti-infecciosos que sean específicos y diferentes de muchos otros fármacos actualmente en uso, para proporcionar un método alternativo de tratamiento para organismos resistentes a fármacos.

47-14

SUMARI DE LA INVENCION

Se han descubierto los compuestos de las fórmulas Ia y Ic que tienen una estructura lactona y un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona. Los compuestos de lactona pueden hacerse reaccionar con un agente nucleofílico para abrir el anillo lactona para un compuesto de fórmula Ib. La lactona de fórmula Ia y sus derivados funcionales han sido aislados desde *Securidaca virgata*. Estos compuestos son mencionados como LMSV-6 o Securolide™. Los compuestos purificados han demostrado actividad en ensayos para actividades antibacterianas y antifúngicas, y para tratar trastornos en la proliferación tales como cáncer. Con base en ensayos in vitro, las lactonas son útiles para tratar trastornos en la proliferación que incluyen, por ejemplo, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer estomacal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer ovárico, cáncer de esófago, y leucemia. Son también efectivos para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, que incluyen el tratamiento de la enfermedad de úlcera péptica, gingivitis y periodontitis.

El método para elaborar un compuesto de las Fórmulas Ia y Ic generalmente involucra: a) proporcionar un precursor que tenga una estructura lactona, y b) hacer reaccionar al precursor con uno o más reactivos químicos

48-47

para proporcionar un producto que tenga un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona. El producto puede ser tratado con un agente nucleofílico tal como un alcohol, alcóxido, amina, o cualquier otro neutral o nucleófilo aniónico para generar un compuesto de fórmula Ib.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

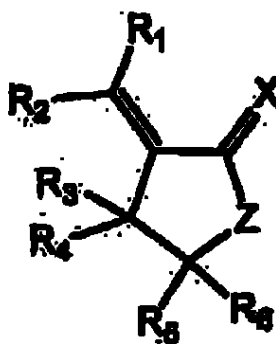
I. Composiciones de lactona

10 A. Lactonas aisladas desde *Securidaca virgata*.

Se describen lactonas con un grupo metileno exocíclico y sus respectivos derivados con un hidroxilo en posición gama. Las lactonas y los derivados de las mismas pueden sintetizarse o aislarse desde recursos naturales. En una
15 modalidad, las lactonas y los derivados pueden ser aislados por medio de métodos cromatográficos, desde un vegetal cuyo nombre científico taxonómico es *Securidaca virgata*, el cual pertenece a *Polygalaceae* como su familia botánica. Como se usa en la presente, el término "lactonas" abarca cualquier
20 producto químico orgánico que tenga una estructura lactona anular de cinco elementos en la cual el átomo de oxígeno del grupo C=O puede ser reemplazado por un átomo de azufre o por un agrupamiento de nitrógeno. El término "derivados" como se usa en la presente se refiere a cualquier compuesto
25 que sea elaborado desde las lactonas al hacer reaccionar

las lactonas con uno o más reactivos químicos. El término también se refiere a cualquier producto obtenible por medio de la abertura del anillo de las lactonas con un agente nucleófilico orgánico o inorgánico para formar, por ejemplo, un ácido, éster, amida, o cualquier otro producto de los mismos.

En una modalidad, la lactona tiene la siguiente estructura química:



Fórmula Ia

en donde

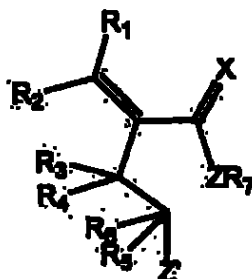
R₁-R₆ tomados independientemente o R₃-R₆ tomados juntos son un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, o cualquier otro agrupamiento orgánico que contenga cualquier número de átomos de carbono, preferiblemente 1 - 8 átomos de carbono, y opcionalmente que incluya un heteroátomo tal como un agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos, agrupamientos de R₁-R₆ representativos que son alquilo, alquilo substituido,

alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo
sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo, arilo
sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halo
hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, fenoxi, fenoxi
5 sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio
sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio,
ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido,
carbonilo, carbonilo sustituido, carboxilo, carboxilo
sustituido, amino, amino sustituido, amido, amido
10 sustituido, sulfonilo, sulfonilo sustituido, ácido
sulfónico, fosforilo, fosforilo sustituido, fosfonilo,
fosfonilo sustituido, poliarilo, poliarilo sustituido,
grupos C1-C20 cíclicos, C1-C20 cíclicos sustituidos,
heterocíclicos, heterocíclicos sustituidos, aminoácidos,
15 péptidos o polipéptidos;

Z es un heteroátomo tal como un agrupamiento de
oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales
lineales, ramificados o cíclicos; y

X es un heteroátomo tal como un agrupamiento de
20 oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales
lineales, ramificados, o cíclicos.

En otra modalidad, el compuesto tiene la siguiente
estructura química:



5

Fórmula Ib

en donde

R₁-R₇ tomados independientemente o R₃-R₆ tomados juntos pueden ser un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, o cualquier otro agrupamiento orgánico que contenga cualquier número de átomos de carbono, preferiblemente 1 - 8 átomos de carbono, e incluye opcionalmente un heteroátomo tal como un agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos, agrupamientos R₁-R₆ representativos que son alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, fenoxi, fenoxi sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido, carbonilo, carbonilo sustituido, carboxilo, carboxilo sustituido, amino, amino sustituido, amido, amido

52

substituido, sulfonilo, sulfonilo substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo, poliarilo substituido, un grupo C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico substituido, 5 heterocíclico, heterocíclico substituido, aminoácido, péptido, o polipéptido;

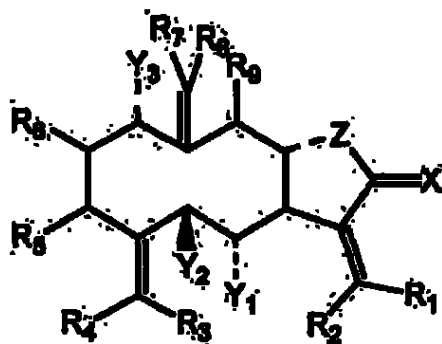
X es un heteroátomo tal como un agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos;

10 Z es un heteroátomo tal como agrupamientos de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos; y

Z' puede ser un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, o cualquier otra composición 15 orgánica que contenga desde 1 - 8 átomos de carbono e incluir opcionalmente un agrupamiento de heteroátomo tal como oxígeno, azufre, o nitrógeno, en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos.

En aún otra modalidad, las lactonas que tienen un 20 grupo alfa-metileno puede tener la estructura que se muestra a continuación:

53



Fórmula Ic

en donde

R₁-R₉ tomados independientemente o R₅ y R₆ tomados
 10 juntos pueden ser un átomo de hidrógeno, un átomo de
 halógeno, un grupo hidroxilo, o cualquier otro agrupamiento
 orgánico que contenga cualquier número de átomos de
 carbono, preferiblemente 1 - 8 átomos de carbono, e incluye
 opcionalmente un heteroátomo tal como agrupamientos de
 15 oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales
 lineales, ramificados, o cíclicos, siendo los agrupamientos
 de R₁-R₆ representativos, alquilo, alquilo sustituido,
 alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo
 sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo, arilo
 20 sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halo,
 hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, fenoxi, fenoxi
 sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio
 sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio,
 ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido,
 25 carbonilo, carbonilo sustituido, carboxilo, carboxilo

57
54

substituido, amino, amino substituido, amido, amido
substituido, sulfonilo, sulfonilo substituido, ácido
sulfónico, fosforilo, fosforilo substituido, fosfonilo,
fosfonilo substituido, poliarilo, poliarilo substituido,
5 grupos C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico substituido,
heterocíclico substituido, aminoácido, péptido, o
polipéptido;

Y₁, Y₂, e Y₃ tomados independientemente o Y₁ e Y₂
tomados juntos pueden ser un átomo de hidrógeno, un átomo
10 de halógeno, un grupo hidroxilo, o cualquier otro
agrupamiento orgánico que contenga cualquier número de
átomos de carbono, preferiblemente 1 - 8 átomos de carbono,
e incluye opcionalmente un heteroátomo tal como un
agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos
15 estructurales lineales, ramificados, o cíclicos, siendo
agrupamientos representativos de R₁-R₆, alquilo, alquilo
substituido, alquenilo, alquenilo substituido, alquinilo,
alquinilo substituido, fenilo, fenilo substituido, arilo,
arilo substituido, heteroarilo, heteroarilo substituido,
20 halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi substituido, fenoxi, fenoxi
substituido, aroxi, aroxi substituido, alquiltio, alquiltio
substituido, feniltio, feniltio substituido, ariltio,
ariltio substituido, ciano, isociano, isociano substituido,
carbonilo, carbonilo substituido, carboxilo, carboxilo
25 substituido, amino, amino substituido, amido, amido

55

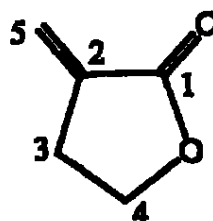
substituido, sulfonilo, sulfonilo substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo, poliarilo substituido, un grupo C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico substituido, 5 heterocíclico, heterocíclico substituido, aminoácido, péptido, o polipéptido;

Z es un heteroátomo tal como un agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados, o cíclicos; y

10 X es un heteroátomo tal como un agrupamiento de oxígeno, azufre, o nitrógeno en formatos lineales, ramificados, o cíclicos.

En una modalidad, la lactona es un Securolide, el cual es una lactona alfa-metilénica (1) que tiene la estructura:

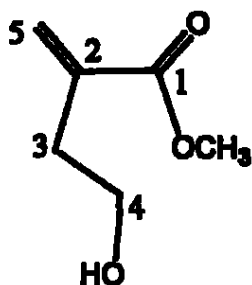
15



20 En otra modalidad, el éster es α -metilen- γ -hidroxi-butanoato de metilo (2) que se muestra en la estructura siguiente:

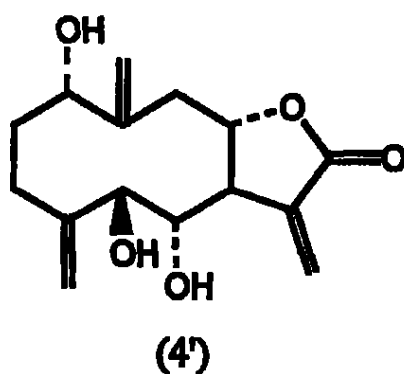
25

5



En aún otra modalidad, la lactona es un compuesto
bicíclico que tiene la estructura siguiente:

10



15

B. Excipientes

La lactona y los derivados funcionales pueden ser
formulados usando técnicas estándares para administración
entérica, parenteral, o tópica. Las dosificaciones
20 efectivas pueden determinarse con base en los ensayos in
vitro conocidos por los expertos en la materia, tales como
los ensayos descritos en los ejemplos.

Vehículos aceptables farmacéuticamente adecuados para
liberación parenteral incluyen solución salina estéril,
25 solución salina regulada de fosfato, y formulaciones de

58
57

micropartículas estándares para inyección, que incluyen microesferas poliméricas, microcápsulas, liposomas, y emulsiones. Estas pueden incluir polímeros degradables, tales como ácido poliláctico y ácido poliglicólico, y 5 copolímeros de los mismos, polianhídridos, poliortoésteres, polihidroxialcanoatos. Para inyección, las lactonas serán típicamente formuladas como soluciones o suspensiones en un portador líquido.

Para liberación tópica, la lactona puede ser formulada 10 en un ungüento, loción, gel, nebulización, o formulaciones de liberación sostenida o controlada (tal como un parche transdérmico).

Para liberación entérica, la lactona puede ser formulada en una tableta, cápsula, suspensión o solución, 15 disuelta o encapsulada en un excipiente tal como una azúcar como lactosa, un compuesto inerte tal como estearato de magnesio, derivados de parafina, glicoles o goma arábiga. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes colorantes, saborizantes, conservadores, dispersantes o 20 emulsificantes, o materiales modificadores de las propiedades de estabilidad o de liberación de las formulaciones.

El compuesto activo puede ser usado en combinación con un segundo agente antimicrobiano aceptable 25 farmacéuticamente, tal como nitroimidazol, antibióticos,

5A
58

por ejemplo, tinidazol y metronidazol; tetraciclinas, por ejemplo, tetraciclina, doxiciclina y minociclina; penicilinas, por ejemplo amoxicilina y meziociclina, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefadroxil, 5 cefadrina, cefuroxima, axetil cefuroxima axetil, cefalexina, proxetil cefpodoxima, ceftazidima y ceftriaxona; carbapenemos, por ejemplo, imipenemo y meropenemo; aminoglicósidos, por ejemplo paromomicina, antibióticos macrólidos, por ejemplo, eritromicina, 10 claritromicina y azitromicina; antibióticos lincosamidas, por ejemplo, clindamicina; rifanicina g, rifampicina, y nitrofurantoina.

Combinaciones de los compuestos con un agente farmacéutico abatidor de la acidez, pueden ser usados en el 15 tratamiento de trastornos relacionados con la acidez, tales como inhibidores del bombeo ácido, por ejemplo omeprazol y lansoprazol, o antagonistas de H_2 , por ejemplo, ranitidina, cimetidina, y famotidina.

II. Síntesis de Lactonas

20 La síntesis de las lactonas y sus derivados respectivos involucran la etapa de formar un grupo alfa-metileno. Generalmente, el método para elaborar un compuesto de Fórmulas Ia y Ic involucra: a) proporcionar un precursor que tenga una estructura lactona, y b) hacer 25 reaccionar al precursor con uno o más reactivos químicos

59

para proporcionar un producto que tenga un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona. El producto puede ser tratado con un agente nucleofílico tal como un alcohol, alcoxada, amina, o cualquier otro nucleófilo neutro o aniónico para generar un compuesto de Fórmula Ib.

Los métodos de formar el grupo metileno son técnicas estándares bien documentadas en química orgánica sintética (ver, por ejemplo, March, "Advanced Organic Chemistry", 4ª. Edición, 1992, Wiley- Interscience Publication, New York).

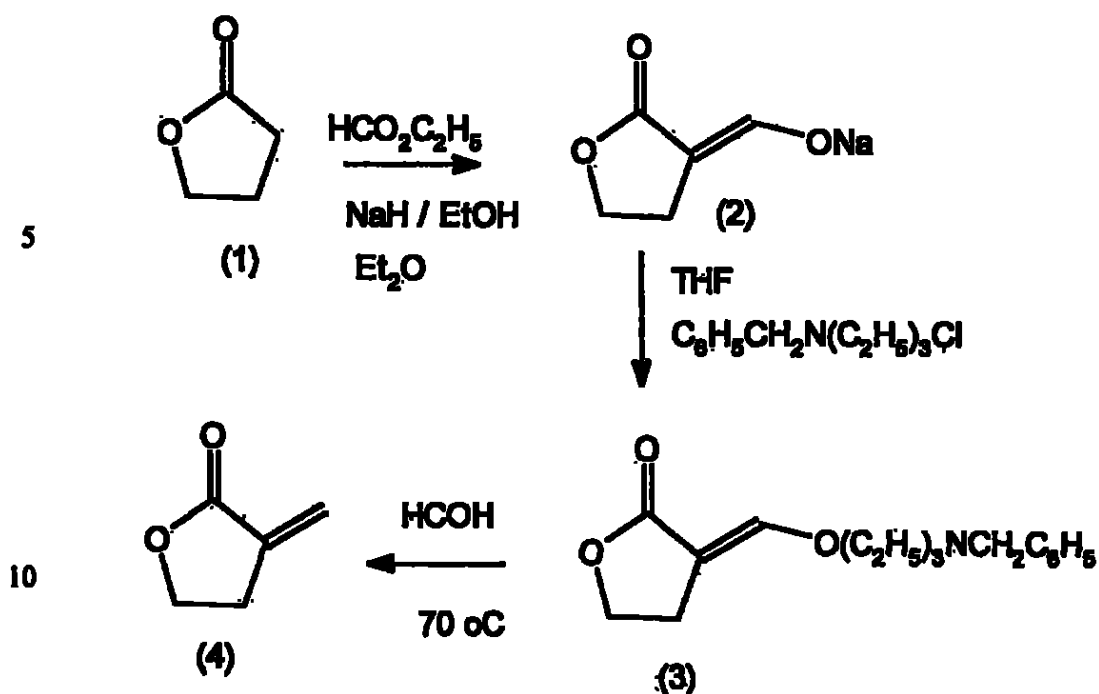
Las lactonas pueden ser sintetizadas, por ejemplo, al iniciar desde una lactona de cinco elementos y luego derivatizar la posición alfa para añadir un grupo metileno sobre la molécula.

Por ejemplo, como se muestra en el Esquema de Reacción 1, hacer reaccionar un compuesto que tenga la estructura (1) con una base, un alcohol y un éster, produce un enolato, el cual es un precursor para lactonas de estructura (4) (Ver el Esquema de Reacción 1).

20

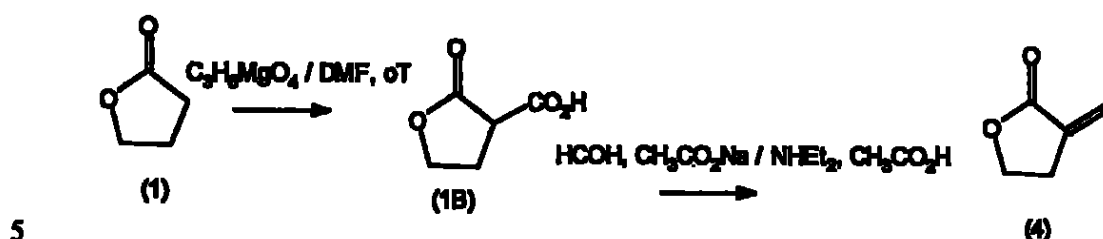
25

Esquema de Reacción 1



La lactona (4) puede ser derivatizada adicionalmente usando técnicas sintéticas estándares disponibles en el arte de síntesis orgánica (ver, por ejemplo, March, *Supra*). Por ejemplo, lactonas funcionalizadas con un grupo carboxilo (4) pueden prepararse por ejemplo, al hacer reaccionar la estructura (1) con un agente para la carboxilación en alfa de lactonas (MMC, carbonato de Mg-
 20 metilo), y un aldehído en la presencia de una base tal como trietilamina para producir la lactona de estructura (4), la cual es la lactona como se encuentra naturalmente aislada (Esquema de Reacción 2).

60
61



En el Esquema de Reacción 2 una lactona (4) funcionalizada con un grupo metileno, se prepara al hacer reaccionar un compuesto que tenga la estructura (1) con

10 carbonato de Mg-metilo (MMC), un aldehído en un regulador con una base NN-Dimetilformamida [DMF-HCON(CH₃)₂], para producir una lactona funcionalizada con ácido carboxílico, y la lactona (1B) es entonces tratada con un aldehído y Dietilamina, Acetato de Sodio, Acido acético para producir

15 la lactona (4).

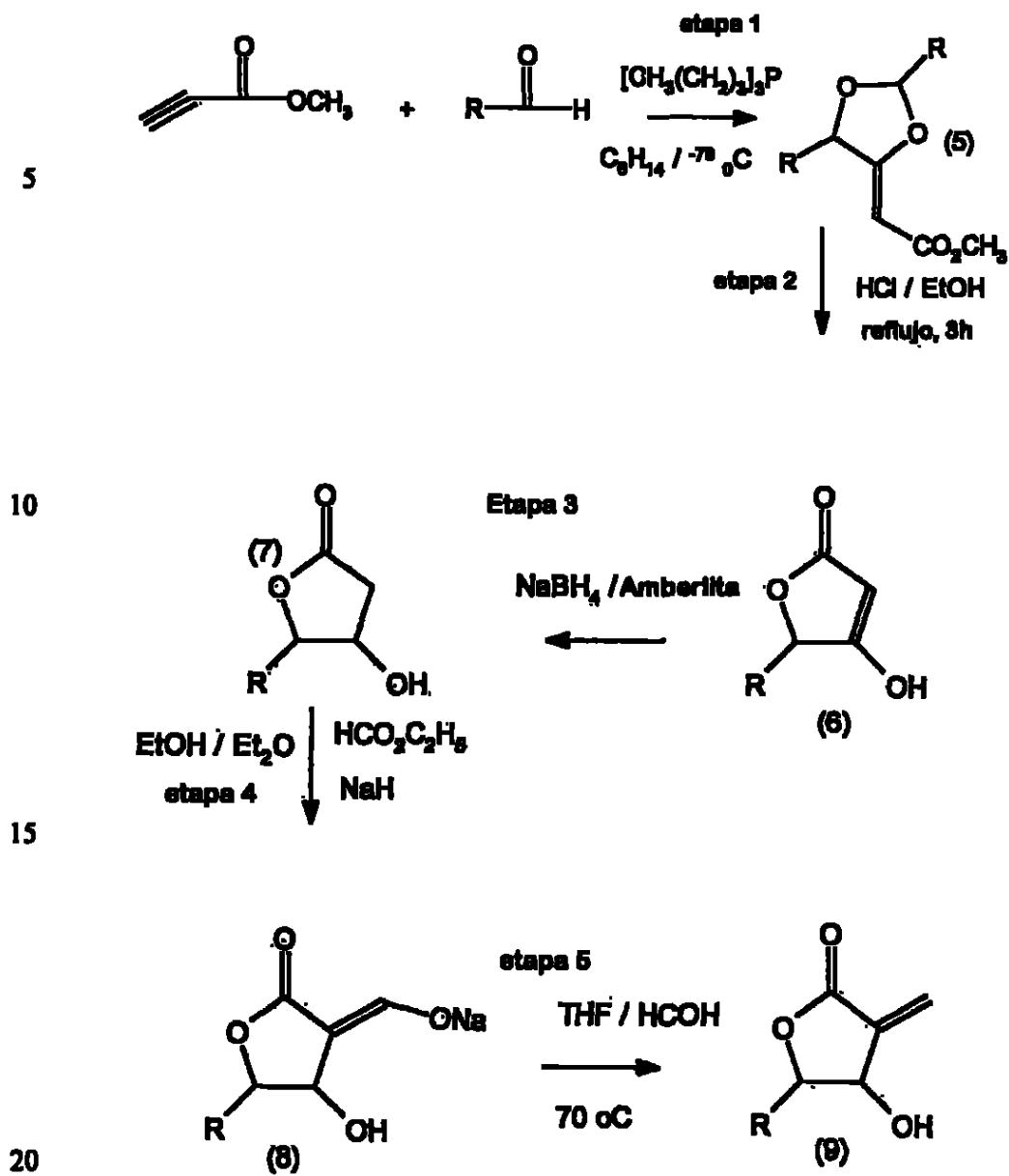
Otros derivados de lactona funcionalizados pueden ser preparados fácilmente. Por ejemplo, una lactona derivada funcionalizada (9) puede prepararse al hacer reaccionar un compuesto que tenga la estructura (5) con un ácido

20 inorgánico y un alcohol por calentamiento a reflujo para producir una enol-lactona, la cual es entonces reducida con una base para producir un producto de estructura (7). La reacción de (7) con una base, un alcohol y un éster produce un enolato, el cual es un precursor para lactonas

25 funcionalizadas de compuesto (9) (Esquema de Reacción 3).

61
62

Esquema de Reacción 3

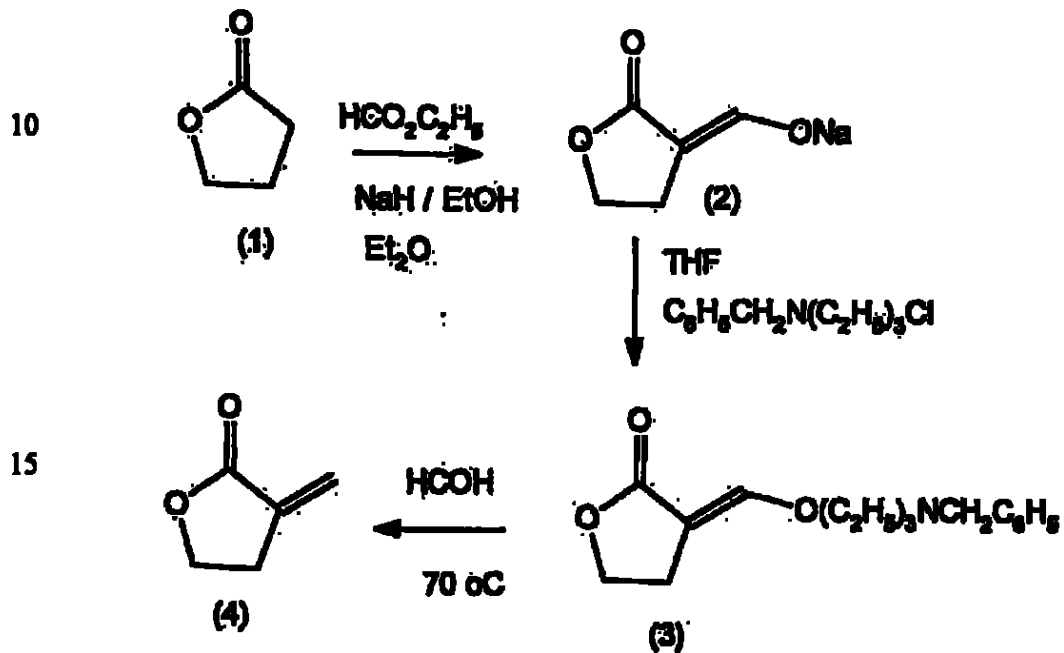


Pueden prepararse más lactonas funcionalizadas por medio de métodos sintéticos fácilmente disponibles en el arte (ver, por ejemplo, March, "Advanced Organic Chemistry", 4ª. Edición, 1992, Wiley-Interscience

63

Publication, New York). Por ejemplo, pueden prepararse lactonas funcionalizadas (4) al hacer reaccionar un compuesto que tenga la estructura (1) con una base, un alcohol y un éster para producir un enolato, el cual es un precursor para la lactona de estructura (4) (Esquema de Reacción 4)

Esquema de Reacción 4



Las sales aceptables farmacéuticamente de compuestos de lactona de Fórmulas Ia-c, ya sea en la forma de un ácido o de una base tal como amina, pueden prepararse de una manera convencional al tratar una solución o suspensión del compuesto de Fórmulas Ia-c con aproximadamente un equivalente químico de una base o ácido aceptables farmacéuticamente. Se emplearon técnicas de

20

25

recristalización y de concentración convencionales al aislar la sal.

III. Métodos de Tratamiento

A. Trastornos a ser Tratados

5 Con base en las actividades determinadas como se describe en los ejemplos, las lactonas son útiles como anti-infecciosos y anti-proliferativos. En particular, las lactonas pueden ser administradas en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano o fúngico, 10 enfermedades virales o para tratar una enfermedad bacteriana o fúngica. Ejemplos de trastornos bacterianos preferidos a ser tratados incluyen la enfermedad de úlcera péptica, gastritis, dispepsia, enfermedad periodóntica y gingivitis. Las composiciones fungicidas comprenden una 15 cantidad efectiva fungicidamente de un compuesto de fórmula 1 o una sal del mismo y un portador farmacéuticamente inerte. Ejemplos de composiciones farmacéuticas pueden ser tabletas como tales, o recubiertas de azúcar, cápsulas de gelatina, gránulos, supositorios, preparaciones 20 inyectables, ungüentos, cremas o geles.

Las composiciones fungicidas son también útiles particularmente sobre *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y otras *Candidas* tales como *Candida glabrata*, *krusei*, *tropicallis*, *pseudotropicalis* y *parapsilosis*, 25 sobre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*,

~~64~~
65

Aspergillus niger, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophyte* y para combatir particularmente candidosis digestiva, urinaria, vaginal, cutánea, criptococcosis, por ejemplo, 5 criptococcosis neuromeningica, pulmonar o cutánea, aspergilosis broncopulmonar, y pulmonar y aspergilosis invasiva del sistema inmunodepresivo. Las composiciones pueden ser usadas también en la prevención de afecciones micóticas en las supresiones inmunológicas congénitas o 10 adquiridas.

Las lactonas pueden también ser administradas para tratar trastornos proliferativos, incluyendo cánceres. Tipos representativos de cánceres que han mostrado inhibición en el crecimiento o proliferación celular 15 incluyen cáncer de seno, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de esófago, y leucemia. Otros tipos de trastornos proliferativos anormales en cuyo tratamiento pueden ser útiles las lactonas, incluyen endometriosis y restenosis, causadas por sobreproliferación de tejido endotelial 20 después de angioplastia.

La lactona funcionalizada (9) anterior es particularmente útil como un inhibidor de proteasa aspártica, y se ha demostrado para inhibir la proteasa aspártica de HIV-1, y con lo cual se limita el proceso 25 viral, y en particular el procesamiento post-translacional

65
66

particular de los productos genéticos virales (gag / gag-pol).

Estas lactonas son también útiles al modular la respuesta al dolor a través de su actividad como un
5 neurotransmisor.

B. Dosificaciones

La cantidad efectiva será determinada con base en la enfermedad o trastorno a ser tratados, el modo de administración y la formulación. Las dosificaciones
10 efectivas pueden determinarse rutinariamente con base en las dosificaciones efectivas determinadas usando ensayos in vitro tal como los descritos en los ejemplos.

La alta actividad de Securolide (LMSV-6) contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona*
15 *aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y su bajo peso molecular son ventajosos. Las ventajas de Securolide incluyen su facilidad y velocidad para promover la respuesta farmacológica; su posibilidad para atravesar los protectores de la membrana celular, donde el peso molecular
20 alto es el principal impedimento, y su potente actividad contra *Pseudomonas*, la cual es uno de los microorganismos más resistentes al fármaco.

El método para combatir infecciones fúngicas comprende administrar una cantidad efectiva fúngicamente de un
25 compuesto de fórmula I o una sal de adición de ácido del

~~66~~
67

mismo por la ruta bucal, rectal, parenteral, o por la ruta local como una aplicación tópica sobre la piel y membranas mucosas, pero la ruta preferida es la ruta bucal. La dosis diaria usual es 1 a 5 mg/kg dependiendo del método de administración, de la condición tratada y del compuesto específico.

Los compuestos pueden ser administrados solos, pero generalmente serán administrados en mezcla con un portador farmacéutico seleccionado con respecto a la ruta de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar. Por ejemplo, pueden ser administrados oralmente o en la forma de tabletas que contengan excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas ya sea solos o en mezcla con excipientes, o en la forma de elixires o suspensiones que contengan agentes saborizantes y colorantes. En el caso de animales, los compuestos están contenidos ventajosamente en un alimento o líquido para bebida animal en una concentración de aproximadamente 5 a 5000 ppm, preferiblemente aproximadamente 25 hasta aproximadamente 500 ppm. Pueden ser inyectados parenteralmente, por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutáneamente. Para administración parenteral, son mejor usados en la forma de una solución estéril que puede contener otros solutos, por ejemplo, suficiente sal o glucosa para hacer una solución isotónica. En el caso de

6X
66

animales, los compuestos pueden ser administrados intramuscular o subcutáneamente a niveles de dosificación de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 mg/kg/día, preferiblemente aproximadamente 0.2 a aproximadamente 10 5 mg/kg/día dados en una sola dosis diaria o hasta dividida en 4 dosis.

Los compuestos pueden ser administrados a humanos para el tratamiento de infecciones por *H. pylori* ya sea por las rutas parenteral u oral y pueden ser administrados 10 oralmente a niveles de dosificación de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 mg/kg, ventajosamente aproximadamente 0.5 a 50 mg/kg/día dados en una sola dosis o dividida hasta en 4 dosis. Para administración intramuscular o intravenosa, los niveles de dosis son de aproximadamente 15 0.1 hasta 100 mg/kg/día, preferiblemente aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 mg/kg/día. Aunque la administración intramuscularmente puede ser en una sola dosis o hasta dividida en 4 dosis, la administración intravenosa puede incluir un goteo continuo. 20 Necesariamente, pueden tener lugar variaciones, dependiendo del peso y de la condición del sujeto que es tratado y de la ruta particular de administración seleccionada como lo sabrán los expertos en la materia.

El segundo agente antimicrobiano y agente abatidor de 25 acidez pueden ser administrados con los compuestos en la

68
69

misma manera que se discutió anteriormente para los compuestos de la invención. Así, dependiendo del agente particular, la administración puede ser oralmente en aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 mg/kg, por ejemplo, a aproximadamente 1 a 3 gramos por día del segundo agente antimicrobiano, y aproximadamente 40 a 80 mg por día del agente abatidor de acidez, o por inyección a aproximadamente 0.1 a aproximadamente 200 mg/kg/día.

La presente invención se comprenderá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Aislamiento de lactona desde *Securidaca virgata*.

Se colectaron raíces de *Securidaca virgata* en San Cristóbal de la República Dominicana. Una muestra testigo de las partes aéreas se envió al National Botanic Garden a fin de ser identificada. Secada al aire, las raíces trituradas y molidas (253 gramos) fueron extraídas en un aparato Soxhlet. El extracto frío se filtró y luego se concentró al vacío (55 °C) para dar como resultado un líquido con consistencia de jarabe (29.76 g) que significaron 11.76 % de rendimiento. Este jarabe (28 g, probado microbiológicamente) se trató con 300 ml de ácido sulfúrico 0.5 M y se agitó por 4 horas y luego se extrajo en una extracción líquido-líquido con cloroformo sucesivamente hasta que el jarabe se separó de la materia

soluble del cloroformo ácido. Luego se basificó la fase hidrosoluble con hidróxido de amonio al 20 % (pH = 8-9) y la fase hidrosoluble se extrajo otra vez con cloroformo. El extracto de cloroformo se concentró al vacío (50 °C, para
5 producir un extracto de 5.92 g (rendimiento = 21.14 % con respecto al extracto crudo y 2.33 % con respecto a las raíces extraídas). Los 5.92 g tuvieron una pureza de 95.34 % de LMSV-6 (Securolide™). El extracto de cloroformo final (5.92 g) fue cromatografiado en alúmina básica (63 - 150
10 µm) y se eluyó con una mezcla de éter de petróleo-acetato de etilo (30:70).

Se concentraron las fracciones colectadas para tener una sustancia líquida clara pura (Securolide™) (1). Las fracciones cromatográficas 72-97 (674 mg) de la columna
15 cromatográfica líquida en donde (1) que se aislaron fueron otra vez cromatografiada para obtener un líquido coloreado en ámbar (2). Los compuestos (1) y (2) fueron entonces probados en bioensayos.

El análisis espectroscópico produjo los siguientes
20 datos para el compuesto (1):

DATOS FISICOS

DENSIDAD RELATIVA: 1.070 g/ml pH = 5.853

INDICE DE REFRACCION = 1.471

DATOS ESPECTRALES

25 *Espectrometría de masa*: MS m/z (rel. Int.): ión

21

molecular 98.0 [M⁺], (54), 68 (100), fórmula molecular C₅H₆O₂.

Espectroscopía Infraroja (IR): 1761.6 cm⁻¹ (lactona), 1667 cm⁻¹ (C=C) 810 cm⁻¹ (C=CH₂).

5 *Resonancia Magnética Nuclear Protónica (NMR ¹H, 200 MHz, CDCl₃):* δ 2.98 ppm (2H multiplete), 4.37 ppm (1H triplete, J = 7.4 Hz), 5.65 (1H triplete, J = 2.6 Hz), 6.22 (1H triplete, J= 2.6,)

Resonancia Magnética Nuclear con Carbono 13 (NMR ¹³C
10 *200 MHz, CDCl₃):* δ 170.7 (C-1), 133.3 (C-2), 27.4 (C-3), 65.5 (C-4), 122.2 (C-5).

Experimentos de Doble Resonancia Magnética Nuclear Protónica (Irradiaciones) Experimentos de doble Resonancia Magnética Nuclear Protónica mostraron acoplamiento entre
15 cada uno de los protones existentes. Protones exocíclicos metilénicos δ (5.65 y 6.22), la irradiación de C-3 mostró acoplamiento con C-4 y de esta manera se determinó la conectividad de todos los protones de (1).

El análisis espectroscópico produjo los siguientes
20 datos para el compuesto (2):

Espectrometría de Masa: 130.0 (M⁺, 3), 113(M⁺ -OH, 12), C₆H₁₀O₃.

Resonancia Infraroja (IR): 3614.6 cm⁻¹ (OH), 1629 cm⁻¹ (C=C) 1150.9 (-CO-OCH₃), 810 cm⁻¹ (C=CH₂).

25 *Espectrometría por Resonancia Magnética Nuclear*

72

Protónica (200 MHz, CDCl₃): δ 2.54 ppm (2H td J = 6.26 Hz), 3.73 (s), 3.72 (2H, t J= 6.26 Hz), 5.65 (1H t, J = 1.2 Hz), 6.21 (1H t, J = 1.2 Hz).

Espectrometría por Resonancia Magnética Nuclear con 5 Carbono¹³ (200 MHz, CDCl₃): δ 167.8 (C-1), 137.2 (C-2), 35.4 (C-3), 61.3 (C-4), 127.3 (C-5), 51.93 (C-6).

Las ampolletas que consisten de una composición farmacéutica que contiene el compuesto de la fórmula 1 (Securolide) tuvieron los siguientes ingredientes:

10	Cantidad Original:	750 Amp	
	<u>Material crudo</u>	<u>Peso</u>	<u>UM</u>
	LMSV-6 (Securolide)	51.7900 ml	6.27 %
	Aceite de sésamo	760.8200 ml	92.20 %
	Alcohol Bencílico		
15	U.S.P.	12.3750 ml	1.50 %
	Volumen total	824.9850 ml	99.97 %

Ejemplo 2: Ensayos para Actividad Antibacteriana

El material obtenido en el Ejemplo 1 se cribó para actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, 20 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella pneumoniae*.

Materiales y Métodos:

Solvente: Regulador de Fosfato 0.1 N, pH = 8.0

Antibiótico: LMSV-6 (Puro, Securolide)

25 Medio de recubrimiento: 2 ml/100 ml



Inóculo: 4 ml/ Caja de Petri

Preparación del Medio de Cultivo:

Medio de Cultivo para *Staphylococcus aureus* (USP 23 <

81 >)

5	Peptona	1.0 g
	Caseína pancreática digestiva	4.0 g
	Extracto de levadura	3.0 g
	Extracto de Carne de Res	1.5 g
	Dextrosa	1.0 g
10	Agar	15.0 g

PH después de esterilización 6.6 ± 0.01

Medio de Cultivo para *Pseudomona aeruginosa* (USP 23 <

81 >)

	Caseína digestiva pancreática	17.0 g
15	Papaína digestiva de soya	3.0 g
	Cloruro de sodio	5.0 g
	Fosfato de potasio dibásico	2.5 g
	Dextrosa	2.5 g
	Agar	20.0 g
20	Agua c.b.p.	1.0 Lt.

PH después de esterilizado de 7.2 ± 0.1

Medio de Cultivo para *Escherichia coli* y *Klebsiella*

pneumoniae (USP 23) <81>)

	Peptona	5.0 g
25	Extracto de Levadura	1.5 g

74

- 5 Extracto de Carne de Res 1.5 g
- Cloruro de Sodio 3.5 g
- Dextrosa 1.0 g
- Fosfato de Potasio Dibásico 3.68 g
- Fosfato de Potasio Monobásico 1.32 g
- Agua c.b.p. 1.0 Lt.
- PH después de esterilizado 7.0 ± 0.05

10

		Concentración (µl/10 ml)							
Bacteria	MMSV-6 (Puro)	0	20	30	40	Ciprof	osf	is (-)	Dis (+)
E.coli	30 (mm)	-	-	-	-	28	10	-	-
Kleb.	40	-	-	-	-	26	22	-	-
Ps.A	30	-	-	-	-	12	6	-	-
St.a	30	-	-	-	-	20	18	-	-
Str.P.	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

15

La unidad para medir la zona de inhibición es milímetros (mm)

Ciprof = Disco de sensibilidad a Ciprofloxacina de 5 microgramos

20 Fosf = Disco de sensibilidad a Fosfomicina de 50 microgramos

Dis (-) = Disco de sensibilidad con ninguna substancia aplicada

25 Dis (+) = Disco de sensibilidad con 20 microlitros de Tween 60 al 2 %.

24
75

N/A = No se hizo la prueba

Los microorganismos usados fueron estandarizados por American Type Culture Collection (ATCC), usados en primera generación:

5 *E. coli* ATCC 352 18, Lote 202602, Exp. 05/2000 (19-258)

 *Kleb, *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 13882, Lote 202 174, Exp 02/2000 (19-152)

 *Ps. A, *Pseudomona aereoginosa* ATCC 27853, Lote 10 202992, Exp 08/2000 (19-060)

 *St. A, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, Lote 202564, Exp 05/2000 (19-137)

 **Str. P, *Streptococcus pyogenes*, ATCC 21547, Lote 202691, Exp 06/2000 (19-190)

15 * = oxígeno atmosférico, Temp = 35 ± 2 °C

 ** = CO₂ atmosférico, Temp = 35 ± 2 °C

Resultados

5 microlitros de LMSV-6 (Securolide) inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, 20 *Pseudomonas aeroginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Diluciones:

10 microlitros/10 ml, (0.001 microlitros/ml)

20 microlitros/10 ml, (0.002 microlitros/ ml)

30 microlitros/10 ml (0.003 microlitros/ ml)

25 y 40 microlitros/ml (0.004 microlitros/ml)

de LMSV-6 en 10 ml de Tween 60 - 2 % no exhibió inhibición del crecimiento bacteriano, lo que indica que estas concentraciones son inferiores a la concentración Inhibidora Mínima (MCI).

- 5 **Ejemplo 3: Determinación de la Concentración Inhibidora Bacteriana Mínima, MIC, (*Sarcina lutea*) y LMSV-6 (Securolide).**

Materiales y Métodos.

- Metodología:** Se vertió en placa, medio Mueller Hinton
10 pH = 8

Regulador pH = 8 para dilución del patrón de Ceftriaxona

Tween 20 al 2 % para dilución de LMSV-6 (Securolide)

Microorganismo: *Sarcina lutea*

- 15 Muestra(s): LMSV-6 (16.0 microlitros/100 ml y 10 microlitros aplicados al disco de sensibilidad).

Metodología: Se vertió en placa, medio de Mueller Hinton pH = 8

- Regulador de pH = 8 para dilución del patrón de
20 ceftriaxona

Tween 20 al 2 % para dilución de LMSV-6 (Securolide)

Microorganismo usado: *Sarcina lutea*

Muestra(S): LMSV-6 (10 microlitros/ml y 20 microlitros aplicados al disco de sensibilidad)

- 25 Patrón de Control (P): Ceftriaxona (disco con 10 mcg)

Handwritten marks: a signature and the number 77.

Resultados:

<u>VOLUMEN APLICADO A DISCO</u>	<u>ZONA DE INHIBICION</u>
5 microlitros	42.0 mm
1.6 microlitros	20.0 mm

5 No hubo zona de inhibición significativa, por consiguiente la Concentración Inhibidora Mínima está cerca de 0.2 microlitros de LMSV-6. El MIC aproximado es 0.2 microlitros de LMSV-6, 3.3 mm de inhibición.

Ejemplo 4: Tratamiento in vivo de Infección Bacteriana

10 Se infectaron ratas en cirugía y luego se trataron exitosamente con Securolide usando dosis calculadas con base en la comparación con ceftriaxona.

Ejemplo 5: Ensayos para Actividad Anti-neoplástica

Materiales y Métodos:

15 Hay un gran número de ensayos biológicos que requieren la medida de la supervivencia o de la proliferación de las células de mamífero. Esto puede lograrse por diferentes métodos, por ejemplo, conteo celular que excluye o incluye un colorante; la medición de la proteína marcada con ⁵¹Cr liberada después de lisis celular; y medición de la
20 incorporación de la [³H] timidina radioactiva de nucleótidos radioactivos o [¹²⁵I] iododesoxiuridina durante la proliferación celular. Las células visibles pueden medirse al usar cualquiera de varios métodos de tinción, pero un
25 método más seguro es el espectrofotómetro de exploración

~~2~~
78

multipocillos (lectores de ELISA) el cual puede medir gran número de muestras con un alto grado de precisión.

Se usó un ensayo colorimétrico para detectar células vivientes, que utiliza un substrato incoloro que es modificado hasta un producto coloreado por cualquier célula viviente, pero no por células muertas o medios de cultivo de tejidos. El ensayo usa sales de Tetrazolium MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium] para medir la actividad de varias enzimas deshidrogenasas (Slater y colaboradores 1963). El anillo tetrazolium es fragmentado por medio de la mitocondria activa, de modo que la reacción solo tiene lugar en células vivientes. La fragmentación de MTT en Formazan por medio del succinato deshidrogenasa de la enzima mitocondríca produce un compuesto coloreada de azul oscuro (Formazán) cuya cantidad es proporcional al número de células presentes. La concentración de Formazán en un gradiente de concentraciones de Securolide puede medirse por medio del espectrofotómetro de exploración multipocillos (lector de ELISA). Se usó entonces el análisis de datos para establecer la cantidad inhibidora del 50 % (IC_{50}), el cual es un parámetro cuantitativo de actividad antineoplástica. Se probaron diferentes líneas celulares cancerosas a fin de medir indirectamente la citotoxicidad o la actividad antineoplástica (células sobrevivientes) de LMSV-6

(Securolide). Las líneas celulares cancerosas que se probaron también incluyen HEP 2 (carcinoma de Laringe) y HELA (carcinoma de Cérvix).

MATERIALES:

- 5 Medio de cultivo (DMEM + all)
EDTA
Tripsina-EDTA
DMEM + ALL y Suero reciente de ternera al 10 %.
Dimetil sulfoxida
- 10 MTT [bromuro de 3- (4, 5- dimetiltiazol- 2- il)- 2, 5- difenil tetrazolium]
Espectrofotómetros de exploración multipocillos
(lectores de ELISA)

METODOS:

- 15 Se cultivaron las células usando técnicas estándares.
Ver, por ejemplo, R. Ian Freshney "Culture of Animal Cells"
A Manual of Basic Technique (Alan R. Liss, Inc. New York,
Segunda Edición) pág. 245-256.
- 20 Se determinó la evaluación de la inhibición del
crecimiento celular de conformidad con los métodos de
Skehan y colaboradores, J. Nat. Cancer Inst. 82, 1107
(1990). Las células se plaquearon entre 400 y 1200 células/
pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C
por 15 - 18 horas antes de la adición del fármaco para
25 permitir la fijación de las células.

Los compuestos probados se solubilizaron en DMSO al 100 % y se diluyeron adicionalmente en RPMI-1640 que contenía 10 mM de HEPES. Cada línea celular se trató con 10 concentraciones de compuestos (intervalo de 5 log). Después de 72 horas de incubación, se añadieron a cada pocillo 100 ml de TCA al 50 % enfriado con hielo y se incubaron por 1 hora a 4 °C. Las placas se lavaron 5 veces con agua corriente para remover el TCA, abatir los metabolitos de bajo peso molecular y las proteínas de suero. Se añadió a cada pocillo sulforodamina B (SRB) (0.4 %, 50 ml). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se enjuagaron 5 veces con ácido acético al 0.1 % y se secaron al aire. El colorante enlazado se solubilizó con 10 mM de Tris Base (pH 10.5) por 5 minutos sobre un agitador giratorio. Se midió la densidad óptica a 570 nm.

Ver también Gerlier, y colaboradores, J. Immunol. Meth. 94, 57-63 (1986); Slater, y colaboradores, Biochim. Biophys. Acta, 77, 383- 393 (1963); Kasugai, y colaboradores, Japan J. Pharmacol. 52, 95- 100 (1990); Mosmann J. Immunol. Methods, 65, 55-63 (1983); Denizot, y colaboradores, J. Immunol. Methods, 89, 271-277 (1986).

Los datos se ajustaron con el modelo de Efecto de la concentración a Emax de Sigmoid (ver Holford, N. H. G.: Scheiner, L. B. "Understanding the dose- effect relationship: Clinical applications of pharmaco-kinetic-



pharmacodynamic models," Clin. Pharmacokin. 1981, 6, 429-453) con regresión no lineal, ponderado por medio del recíproco del cuadrado de la respuesta predicha. El programa de ajuste fue desarrollado por el Roswell Park Institute con Microsoft FORTRAN, y usos del algoritmo de Marquardt (ver Marquardt, D. W., "An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters", J. Soc. Ind. Appl. Math. 1963, 11, 431- 441) como adoptó Nash J. C., "Compact numerical method for computers: Linear algebra and function minimization". John Wiley & Sons, New York, 1979) para la regresión no lineal. Se calculó la concentración de fármaco que dio como resultado la inhibición del 50 % de crecimiento (IC_{50}).

Resultados:

15 **ENSAYO CITOTOXICO DE LMSV-6 EN LA POBLACION CELULAR DE HEP-2 DE 10^5 Células/ml (CARCINOMA DE LARINGE)**

$$r = 0.9878$$

$$IC_{50} = 10.38 \mu/ml.$$

20 **ENSAYO CITOTOXICO DE LMSV-6 EN LA POBLACION CELULAR DE HEP-2 DE 10^6 Células/ml (CARCINOMA DE LARINGE)**

$$r = 0.9941$$

$$IC_{50} = 37.37 \mu g/ml$$

25 **ENSAYO CITOTOXICO DE LMSV-6 EN LA POBLACION CELULAR DE HELA DE 10^5 Células/ml (CARCINOMA DE CERVIX)**

$$r = 0.9950$$

~~82~~
82

$$IC_{50} = 7.37 \mu g/ml$$

**ENSAYO CITOTOXICO DE LMEV-6 EN LA POBLACION CELULAR DE
HELA DE 10^6 Células/ml (CARCINOMA DE CERVIX)**

$$r = 0.9941$$

5 $IC_{50} = 27.30 \mu g/ml$

Ejemplo 6: Pruebas para la Inhibición de H. pylori

Materiales y Métodos

Dilución en Agar de Compuesto Antimicrobiano: se solubilizaron 6 mg del compuesto a ser evaluado en 0.6 ml de dimetilsulfoxida al 100 % (DMSO) y luego se llevó hasta 6 ml con caldo brucelar estéril. La concentración final de DMSO es 10 % del volumen total. Se hicieron series de diluciones de dos veces (3 ml de Securolide + 3 ml de caldo brucelar) en caldo brucelar estéril. Una alícuota de 2 ml de cada dilución del caldo en las series se colocó en placas de Petri estériles por separado, al cual se añadieron 18 ml de agar brucelar fundido y enfriado (aproximadamente 50 °C) suplementado con sangre de caballo al 7 %. Esto produjo una dilución final de 1: 10 de Securolide en agar, y una concentración final de DMSO de 1 %. Por ejemplo, si las concentraciones superiores de fármaco en agar son 100 $\mu g/ml$. Las placas de agar pueden prepararse un día antes al inocular, y refrigeradas toda la noche.

25 Preparación del inóculo: se mantuvieron cultivos de

gt
83

Helicobacter pylori sobre placas de agar sangre de oveja al 5 %- soya tripticasa, y se transfirieron cada 48 horas. Cultivos de *Helicobacter mustelae* se mantuvieron sobre el mismo agar y se transfirieron cada 48 - 60 horas, dependiendo de la extensión del crecimiento de la transferencia previa. Las placas se incubaron a 37 °C en jarras de GasPak con CampyPak Plus (10 ml) activado con agua (BBL Microbio. Systems) envuelto con catalizador de paladio.

10 Cultivos de *Helicobacter* se hicieron crecer en caldo brucelar suplementado con suero de ternera fetal al 10 % en volúmenes de 10 ml en placas de Petri profundas. Las placas se incubaron por 18 - 20 horas a 37 °C en jarras de GasPak con CampyPak Plus (10 ml) activado con agua envuelto en
15 catalizador de paladio en un agitador a 50 rpm.

Se cultivaron toda la noche (aproximadamente 10^8 CFU/ml), se diluyeron 10 veces en caldo brucelar (no FCS) en tubos con tapa de rosca para uso como el inóculo estándar. Los pocillos de un replicador Steer se llenaron
20 con 0.8 ml del organismo diluido, y aproximadamente 2×10^4 células en 0.002 ml se colocaron sobre la superficie del agar. Las placas inoculadas se colocaron en una jarra de GasPak a la cual se añadió Campy Pak Plus (10 ml) activado con agua envuelto con catalizador de paladio, y se
25 incubaron a 37 °C, por 48 horas.

Resultados:

Después de incubación, todas las placas de prueba se compararon a una placa control de crecimiento libre de Securolide. La MIC es la concentración que inhibe el crecimiento en comparación con la placa control. En esta película de crecimiento debe de ser visible en concentraciones más altas pero esto se descuenta, y no se considera el verdadero MIC. Los organismos control se inocularon también sobre cada placa, y éstos se diluyeron mil veces para uso como inóculo. El organismo control incluye *Campylobacter jejuni*, y los cultivos cribados de *E. Coli* [ATCC 35218, Lote 202602, Exp 05/2000 (19-258)], *Pseudomona aeruginosa* [ATCC 27853, Lote 202992, Exp 08/2000 (19-060)], *E. Cloacae*, *Providencia stuartii* y *P. Rettgeri*.

Las transferencias de placas y/o del inóculo no deberían estar afuera del ámbito microaerofílico más de 2 horas. Todas las manipulaciones que involucran cultivos de *Helicobacter* se efectuaron en una campana de flujo laminar para disminuir la oportunidad de contaminar los cultivos con moho.

El modelo de ratón de Lee y colaboradores, *Gastroenterology*, 99, 1315 - 23 (1990) se usó para predecir la actividad *in vivo* de un compuesto contra *H. pylori* en humanos.

Se desarrolló *Helicobacter felis* en caldo brucelar con

95

suero bovino fetal al 10 %. Un cultivo congelado se descongela rápidamente; el cultivo se verifica por movilidad y se inoculan 0.5 ml del cultivo congelado descongelado en una placa de cultivo de tejido profunda que
5 contenía 9.5 ml de la mezcla de suero/brucela. Las placas son puestas en una jarra de Capy Pak [BBL] para asegurar una atmósfera microaerofílica. La jarra es puesta sobre un agitador rotatorio a 60 RPM en una incubadora a 37 °C. Después de 18 horas hubo turbidez visible. El cultivo se
10 verificó para pureza y movilidad bajo un microscopio (fas) y luego se conjuntó en un matraz. Se ayunaron ratones hembras Swiss-Webster (18-20 g) por 18 horas antes de infección. Los ratones se infectaron tres veces en días alternados durante una sola semana. Las dosificaciones
15 comenzaron dos semanas después de la última dosis de organismo. Los tratamientos se dieron una vez por día por catorce días consecutivos. El sacrificio fue aproximadamente tres semanas después de completar la terapia. Por cada ratón, se extirpó el estómago y se abrió
20 a lo largo de la curvatura más grande. Se tomó un trozo (una sección de tejido de 3 mm) desde la región del antrum del estómago. El trozo alisado se lavó, se adelgazó, y se goteó en un tubo con 100 microlitros de reactivo de ureasa. El reactivo de ureasa (pH 6.3 - 6.5) contiene urea y rojo
25 de fenol. Si está presente *Helicobacter*, la ureasa

~~8/~~
96

obstaculizará que la urea produzca un cambio de pH. Púrpura (alcalina) es positiva para *Helicobacter*; rojo/ amarillo (ningún cambio) es negativo. Cualquier cambio de color se registra después de 18 horas. Usualmente hay veinte ratones por grupo de tratamiento; se registra el porcentaje positivo para cada grupo.

Hay varios métodos usados clínicamente para determinar si está presente *Helicobacter pylori* en un sujeto humano. Estos se emplearon para diagnóstico inicial de infección antes del tratamiento, así como también para determinar el éxito del tratamiento al erradicar el organismo del paciente.

La prueba de respiración de urea involucra la ingestión de urea radiomarcada. *H. pylori* produce una enzima ureasa que degrada la urea; las células gástricas de mamífero no contienen esta enzima. La exhalación de dióxido de carbono marcado (analizado por espectrometría de masa o radioactividad, dependiendo del isótopo empleado) por consiguiente indica que está presente *H. pylori*.

Puede también usarse la serología para evaluar la infección con *H. pylori*. La detección de anticuerpos de suero para *H. pylori*, tales como IgG e IgA, se lleva a cabo usando el ensayo inmunsorbente relacionado con la enzima (ELISA). Numerosas proteínas de *H. pylori* diferentes pueden emplearse como antígenos.

87-5

La endoscopia del paciente proporciona muestras de tejido que pueden ser cultivadas en un ámbito microaerofílico para diagnosticar infección por *H. pylori*. Alternativamente, la muestra puede ser examinada histológicamente empleando una de numerosas tinciones tales como Giemsa o hematoxilina-eosina. Puede también aplicarse una prueba de urea que toma ventaja de la producción de ureasa por *H. pylori*. Esta prueba depende de la formación de amoníaco desde la hidrólisis de urea, lo cual da como resultado un cambio observable en el pH, que es un indicador de la erradicación de *H. pylori*.

Resultados:

La comparación de la condición del paciente por endoscopia antes y después del tratamiento con el compuesto del ejemplo 1 ha mostrado una disminución o ausencia de *H. pylori*.

Ejemplo 7: Determinación de Actividad Fúngica

Materiales y Métodos:

METODOS

La actividad anti-fúngica del Producto puede determinarse como sigue.

Se usaron ratones machos que pesaron 18 a 22 gramos y se administró una cantidad de *Candida Albicans* 44858 en una vena en la cola en la proporción de 10^6 CFU por ratón (CFU: unidad formadora de colonia). Se separaron los ratones en 5

48

lotes de 5 ratones y se trataron de la siguiente manera:

Una hora después de inyección

grupo 1: se trataron los ratones con producto a 25 mg/kg oralmente

5 grupo 2: se trataron los ratones con producto intraperitonealmente a la dosis de 25 mg/kg

grupo 3: se trataron los ratones oralmente con Ketoconazol a 25 mg/kg

10 grupo 4: se trataron los ratones intraperitonealmente con Ketoconazol en una dosis de 25 mg/kg

grupo 5: los ratones no recibieron ningún tratamiento anti-fúngico.

Se contaron los ratones muertos durante un período de 22 días.

15 **Resultados:**

La actividad de producto fue excelente en la dosis usada en los dos métodos de administración. Los mismos tratamientos fueron también efectivos en el "modelo tópico" con hongos dérmicos, por ejemplo trichophyton, y en el
20 modelo subletal.

Concentración Inhibidora Mínima (MIC)

Se prepararon células de Candida albicans como se indica en J. Antimicrobial Chemotherapy 38, 579 - 587, y se lavaron 3 veces con una solución de fosfato 0.1 M y se
25 usaron inmediatamente para determinar la concentración

89

inhibidora mínima (MIC). Las MICs se determinaron por modificación de una placa de microtítulo de conformidad con el método estándar de los estándares clínicos de laboratorio del Comité Nacional.

5 RPMI-1640, y L-glutamina regulada a pH 7 con una solución 0.15 M de MOPS (ácido 3- [N- morfolino] propan sulfónico). Se añadieron células de *Candida albicans* (1.5×10^3 células/ml) a los pocillos de una placa de 96 pocillos que contenían RPMI-1640 y diluciones de agentes anti-
10 fúngicos. Los resultados fueron leídos 48 horas después de incubación a 35 °C y se determinó la MIC o concentración inhibidora mínima que inhibió el crecimiento de células de *Candida albicans*.

Concentración Fungicida Mínima

15 Después de la lectura de MIC a 48 horas, las placas fueron agitadas y 10 µl de alícuotas por pocillo se removieron de los pocillos, los cuales fueron colocados sobre discos rectangulares que contenían azúcar de dextrosa. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 35 °C
20 y la concentración fungicida mínima y la concentración del agente anti-fúngico a la cual no hubo número de unidades formadoras de colonias.

Se hicieron ensayos concomitantes donde LMSV-6 mostraron alta actividad contra *Candida albicans*.

25 **Ejemplo 8: Tratamiento de Enfermedades Periodónticas**

Se encontró que el Securolide fue efectivamente selectivo contra organismos gram negativos anaeróbicos específicos asociados con gingivitis, cuando se aplicó localmente en la encía afectada.

5 La concentración inhibidora mínima (MIC) necesaria para matar *Bacteroides assaccharolyticus* (cepa Forsyth), se determinó de acuerdo con el procedimiento de Walker y colaboradores (Antimicrobial and Chemotherapy, Vol. 16,p. 452 - 457, (1979), está entre 6 a 60 microgramos por ml. El
10 valor de la MIC para *B. Gingivalis* es de 6 microgramos por ml. El valor de MIC para *B. Gracilis* y *Fusobacterium*, otro organismo gram negativo es de aproximadamente 25 para cada uno; y el valor de MIC para el organismo gram positivo *Actinomyces viscosus* es 60 para la cepa aeróbica y de 60
15 para la cepa anaeróbica.

20

25

91-70

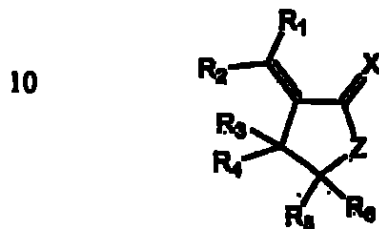
NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

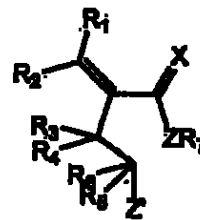
5

REIVINDICACIONES:

1. Un compuesto aislado definido por una de las estructuras siguientes:



Fórmula Ia



Fórmula Ib

caracterizado porque R_1 - R_7 tomados independientemente
 15 o R_3 - R_6 tomados juntos son un átomo de hidrógeno o un grupo o agrupamiento seleccionado del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
 20 sustituido, fenoxi, fenoxi sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido, carbonilo, carbonilo
 25 sustituido, carboxilo, carboxilo sustituido, amino, amino

9294

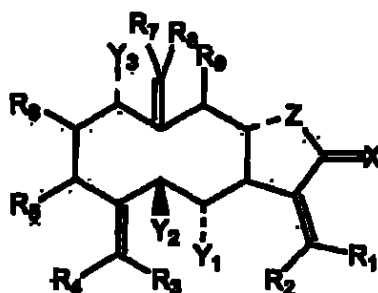
substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo
substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo,
poliarilo substituido, C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico
5 substituido, heterocíclico, heterocíclico substituido,
aminoácido, péptido, y polipéptido.

Z, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno
en formatos estructurales lineales, ramificados, o
10 cíclicos;

Z', es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un
grupo hidroxilo, o un grupo orgánico que tiene 1 - 8 átomos
de carbono, el cual incluye un heteroátomo seleccionado del
grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y
15 nitrógeno en formatos estructurales lineales, ramificados,
o cíclicos; y

X, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno
en formatos estructurales lineales, ramificados, o
20 cíclicos, o

una lactona aislada definida por la siguiente
estructura:



Fórmula Ic

en donde

5 R_1 - R_9 tomados independientemente o R_5 y R_6 tomados
 juntos pueden ser un átomo de hidrógeno o cualesquier otros
 10 grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste
 de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo
 sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, fenilo,
 fenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo,
 heteroarilo sustituido, , halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
 15 sustituido, fenoxi, fenoxi sustituido, aroxi, aroxi
 sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, feniltio,
 feniltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, ciano,
 isociano, isociano sustituido, carbonilo, carbonilo
 sustituido, carboxilo, carboxilo sustituido, amino, amino
 20 sustituido, amido, amido sustituido, sulfonilo, sulfonilo
 sustituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
 sustituido, fosfonilo, fosfonilo sustituido, poliarilo,
 poliarilo sustituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20
 cíclico sustituido, heterocíclico, heterocíclico
 25 sustituido, aminoácido, péptido, y polipéptido.

~~80~~
94

Y_1 , Y_2 , e Y_3 tomados independientemente o Y_1 e Y_2 tomados juntos pueden ser un átomo de hidrógeno o cualesquier otros grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, fenoxi, fenoxi sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio, ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido, carbonilo, carbonilo sustituido, carboxilo, carboxilo sustituido, amino, amino sustituido, amido, amido sustituido, sulfonilo, sulfonilo sustituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo sustituido, fosfonilo, fosfonilo sustituido, poliarilo, poliarilo sustituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

20 Z , es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico; y

X es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico.

95

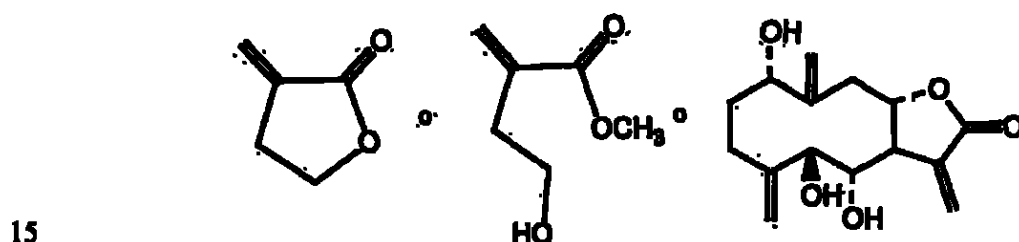
2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque está definido por la Fórmula Ia.

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque X es un oxígeno.

5 4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque R5 es un metileno exocíclico.

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque está definido por la Fórmula Ib.

6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 10 1, caracterizado porque tiene una de las estructuras siguientes:



7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 de Fórmula Ia, caracterizado porque la lactona es aislada desde una *Securidaca virgata*.

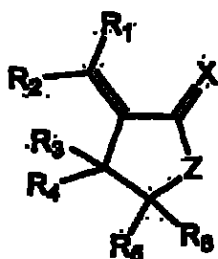
8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 20 de Fórmula Ia caracterizado porque comprende adicionalmente un portador aceptable farmacéuticamente para administración parenteral, enteral, o tópica.

9. Un método de tratamiento de un paciente en necesidad de éste, caracterizado porque comprende 25 administrar una cantidad efectiva del compuesto definido

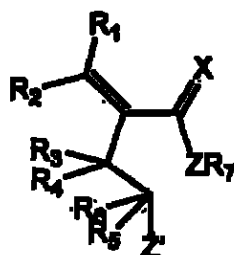
~~96~~
96

por una de las estructuras siguientes:

5



Fórmula Ia



Fórmula Ib

en donde R_1 - R_7 tomados independientemente o R_3 - R_6 tomados juntos son un átomo de hidrógeno o un agrupamiento seleccionado del grupo que consiste de alquilo, alquilo substituido, alquenilo, alquenilo substituido, alquinilo, alquinilo substituido, fenilo, fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo, heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio, feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano, isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo, poliarilo substituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico substituido, heterocíclico, heterocíclico substituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

25 Z , es un heteroátomo seleccionado del grupo que

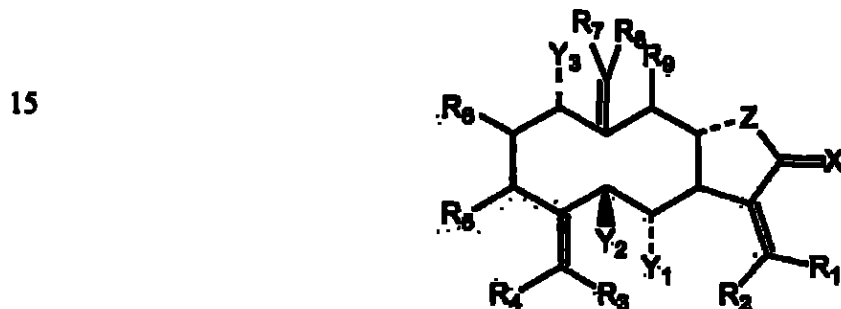
97

consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado o cíclico;

Z', es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo orgánico que tiene 1 - 8 átomos de carbono, el cual incluye un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico; y

X, es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico, o

una lactona aislada definida por la siguiente estructura:



Fórmula Ic

20 en donde

R₁-R₉ tomados independientemente o R₅ y R₆ tomados juntos pueden ser un átomo de hidrógeno o cualesquier otros grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, fenilo,

25

~~8~~
98

fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
5 feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino
substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo
substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
10 substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo,
poliarilo substituido, grupo C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico
substituido, heterocíclico, heterocíclico substituido,
aminoácido, péptido, y polipéptido;

Y₁, Y₂, e Y₃ tomados independientemente o Y₁ e Y₂
15 tomados juntos pueden ser un hidrógeno o cualesquier otros
grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste
de alquilo, alquilo substituido, alquenilo substituido,
alquinilo, alquinilo substituido, fenilo, fenilo
substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
20 heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi susbtituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido,, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
25 substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino

~~8/8~~
98

fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
5 feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino
substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo
substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
10 substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo,
poliarilo substituido, grupo C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico
substituido, heterocíclico, heterocíclico substituido,
aminoácido, péptido, y polipéptido;

Y₁, Y₂, e Y₃ tomados independientemente o Y₁ e Y₂
15 tomados juntos pueden ser un hidrógeno o cualesquier otros
grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste
de alquilo, alquilo substituido, alquenilo substituido,
alquinilo, alquinilo substituido, fenilo, fenilo
substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
20 heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido,, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
25 substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino

~~94~~
99

substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo
substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo,
poliarilo substituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20
5 cíclico substituido, heterocíclico, heterocíclico
substituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

Z, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno
en formatos lineal, ramificado, o cíclico; y

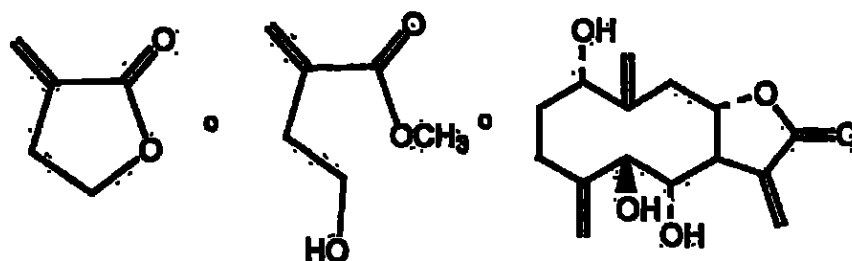
10 X, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno
en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico.

10. El método de conformidad con la reivindicación 9,
caracterizado porque X es oxígeno.

15 11. El método de conformidad con la reivindicación 9,
caracterizado porque R₃ es un metileno exocíclico.

12. El método de conformidad con la reivindicación 9,
caracterizado porque el compuesto tiene una de las
estructuras siguientes:

20



25

100

13. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el compuesto de Fórmula Ia es administrado oral, parenteral, tópica, o transdérmicamente.

14. El método de conformidad con la reivindicación 9,
5 caracterizado porque el paciente tiene un trastorno de proliferación.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el trastorno de proliferación es cáncer.

10 16. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el paciente tiene una infección.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la infección es bacteriana.

15 18. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la infección es fúngica.

19. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el paciente tiene la enfermedad de úlcera péptica.

20 20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la enfermedad de úlcera péptica está vinculada con la presencia de *Helicobacter pylori*.

21. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el paciente padece de dolor.

25 22. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque comprende adicionalmente administrar

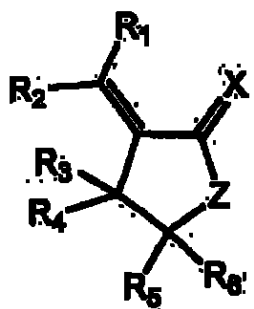
101/80

el compuesto de Fórmula Ia en un portador aceptable farmacéuticamente.

23. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el portador para administración oral
5 es un enjuague bucal, píldora, tabletas, cápsulas, soluciones, suspensiones, gránulos, o cualquier combinación de los mismos.

24. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el portador para administración tópica
10 es un supositorio, ungüento, crema, gel, pasta, colodión, glicerogelatina, linimento, loción, emplastos, polvos, cintas, parches, aerosoles soluciones, tintura, o cualquier combinación de los mismos.

25. Un proceso de aislar una lactona desde un vegetal,
15 la lactona está caracterizada porque está definida por la estructura siguiente:



20

en donde R_1 - R_7 tomados independientemente o R_3 - R_6 tomados juntos son un átomo de hidrógeno o un grupo o agrupamiento seleccionado del grupo que consiste de
25 alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo

102-~~8~~

substituido, alquinilo, alquinilo substituido, fenilo,
 fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
 heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
 substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
 5 substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
 feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano,
 isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
 substituido,, carboxilo, carboxilo substituido, amino,
 amino substituido, amido, amido substituido, sulfonilo,
 10 sulfonilo substituido, ácido sulfónico, fosforilo,
 fosforilo substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido,
 poliarilo, poliarilo substituido, grupos C1-C20 cíclico,
 C1-C20 cíclico substituido, heterocíclico, heterocíclico
 substituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

15 Z, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
 consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno
 en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico; y

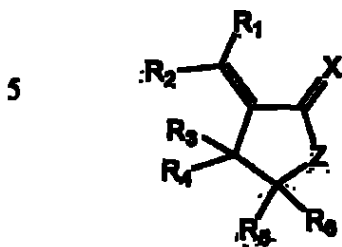
 X, es un heteroátomo seleccionado del grupo que
 consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno,
 20 en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico,
 que comprenden extraer la lactona del material vegetal.

26. El proceso de conformidad con la reivindicación
 25, caracterizado porque el vegetal es *Securidaca virgata*.

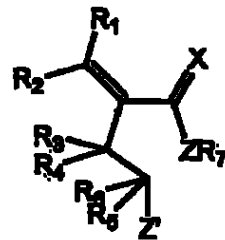
27. El proceso de conformidad con la reivindicación
 25 25, caracterizado porque el método de aislamiento es

extracción seguida por cromatografía.

28. Un compuesto sintético caracterizado porque está definido por una de las siguientes estructuras:



Fórmula Ia



Fórmula Ib

en donde R_1 - R_7 tomados independientemente o R_3 - R_6
 10 tomados juntos son un átomo de hidrógeno o un grupo o
 agrupamiento del grupo que consiste de alquilo, alquilo
 sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo,
 alquinilo sustituido, fenilo, fenilo sustituido, arilo,
 arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido,
 15 halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, fenoxi, fenoxi
 sustituido, aroxi, aroxi sustituido, alquiltio, alquiltio
 sustituido, feniltio, feniltio sustituido, ariltio,
 ariltio sustituido, ciano, isociano, isociano sustituido,
 carbonilo, carbonilo sustituido, carboxilo, carboxilo
 20 sustituido, amino, amino sustituido, amido, amido
 sustituido, sulfonilo, sulfonilo sustituido, ácido
 sulfónico, fosforilo, fosforilo sustituido, fosfonilo,
 fosfonilo sustituido, poliarilo, poliarilo sustituido,
 grupos C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico sustituido,
 25 heterocíclico, heterocíclico sustituido, aminoácido,

104 103

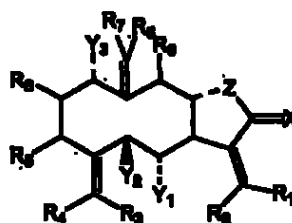
péptido, y polipéptido;

Z, es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico;

5 Z', es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo orgánico que tenga 1 - 8 átomos de carbono, el cual incluye un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o
10 cíclico; y

X, es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado o cíclico, o una lactona aislada definida por la siguiente estructura:

15



Fórmula Ic

20 en donde

R₁ - R₉ tomados independientemente o R₅ y R₆ tomados juntos pueden ser un átomo de hidrógeno o cualesquier otros grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste de alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo
25 sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, fenilo,

105 ~~104~~

fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
5 feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino
substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo
substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo
10 substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo,
poliarilo substituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20
cíclico substituido, heterocíclico, heterocíclico
substituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

Y₁, Y₂ e Y₃ tomados independientemente o Y₁ e Y₂
15 tomados juntos pueden ser un hidrógeno o cualesquier otros
grupos o agrupamientos seleccionados del grupo que consiste
de alquilo, alquilo substituido, alquenilo, alquenilo
substituido, alquinilo, alquinilo substituido, fenilo,
fenilo substituido, arilo, arilo substituido, heteroarilo,
20 heteroarilo substituido, halo, hidroxilo, alcoxi, alcoxi
substituido, fenoxi, fenoxi substituido, aroxi, aroxi
substituido, alquiltio, alquiltio substituido, feniltio,
feniltio substituido, ariltio, ariltio substituido, ciano,
isociano, isociano substituido, carbonilo, carbonilo
25 substituido, carboxilo, carboxilo substituido, amino, amino

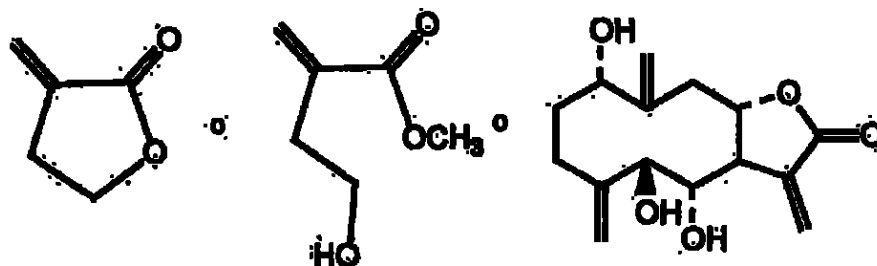
106 405

substituido, amido, amido substituido, sulfonilo, sulfonilo substituido, ácido sulfónico, fosforilo, fosforilo substituido, fosfonilo, fosfonilo substituido, poliarilo, poliarilo substituido, grupos C1-C20 cíclico, C1-C20 cíclico substituido, heterocíclico, heterocíclico substituido, aminoácido, péptido, y polipéptido;

Z es heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico; y

10 X es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de agrupamientos de oxígeno, azufre, y nitrógeno en formatos estructurales lineal, ramificado, o cíclico.

29. El compuesto de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque está definido por la estructura
15 siguiente:



20

30. Un método de elaborar un compuesto de Fórmulas Ia y Ic, caracterizado porque comprende:

a) proporcionar un precursor que tenga una estructura lactona, y

25 b) hacer reaccionar al precursor con uno o más

reactivos químicos para proporcionar un producto que tenga un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona.

31. Un método de elaborar un compuesto de Fórmulas Ib
5 caracterizado porque comprende:

a) proporcionar un precursor que tenga una estructura lactona,

b) hacer reaccionar el precursor con uno o más reactivos químicos para proporcionar un producto que tenga
10 un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona, y

c) hacer reaccionar el producto con un nucleófilo.

15

20

25

106 ~~107~~RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen compuestos de Fórmulas (Ia) y (Ic) que tienen una estructura lactona y un grupo metileno en la posición alfa de la estructura lactona y métodos para usar y elaborarlos. Los compuestos de lactona pueden hacerse reaccionar con un agente nucleofílico para abrir el anillo lactona a un compuesto de Fórmula (Ib). La lactona de Fórmula (Ia) y sus derivados funcionales se han aislado de *Securidaca virgata*. Los compuestos purificados han demostrado actividad en ensayos para actividades anti-bacteriana y anti-fúngica, y para tratar trastornos de proliferación tales como el cáncer.

15

20

25

108
109

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | () | () |
| - Descripción de la invención. | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes. | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:



Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04681332 00000000 Folios: 107
Fecha (MM): 2004-01-09 16:25:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

110 *[Handwritten signature]*

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
DILIA MARIA RODRIGUEZ DÁLEMAN
Apoderado
MAGNACHEM INTERNATIONAL LABORATORIES INC.

Oficio N° 01714

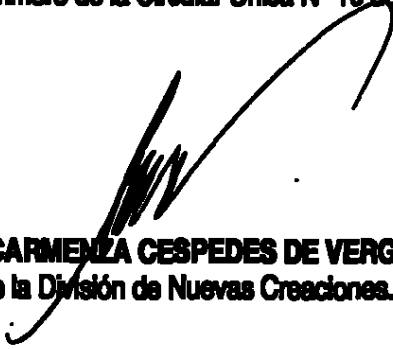
ASUNTO:	Radicación N°	04-1331
	Solicitud Internacional	PCT/US2002/18602
	Fecha inicio fase nacional	13/01/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 FEB. 2004.