

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 065 843**

21 Número de solicitud: 9300491

51 Int. Cl.⁶: C07D 311/92

A61K 31/35

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **10.03.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.95**

Fecha de concesión: **22.08.95**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.96

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real s/n
Granada, ES**

72 Inventor/es:
**García-Granados López de Hierro, Andrés;
Martínez Rodríguez, Antonio;
Arias Peñalver, José María y
Flavia, Mirta**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Aplicación de ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-óxido de manoilo como inhibidor de la adenilatociclasa.**

57 Resumen:

Aplicación de ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-óxido de manoilo como inhibidor de la adenilatociclasa.

Se patenta un producto inhibidor de la actividad de la adenilatociclasa. Se trata de un enantio-óxido de manoilo cuyo nombre es ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-óxido de manoilo (producto 3 de la Memoria, que también puede nombrarse como ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-13(S)-óxido de manoilo o ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-carboximetil-[8 α ,13(S)]-epoxilabd-14-eno).

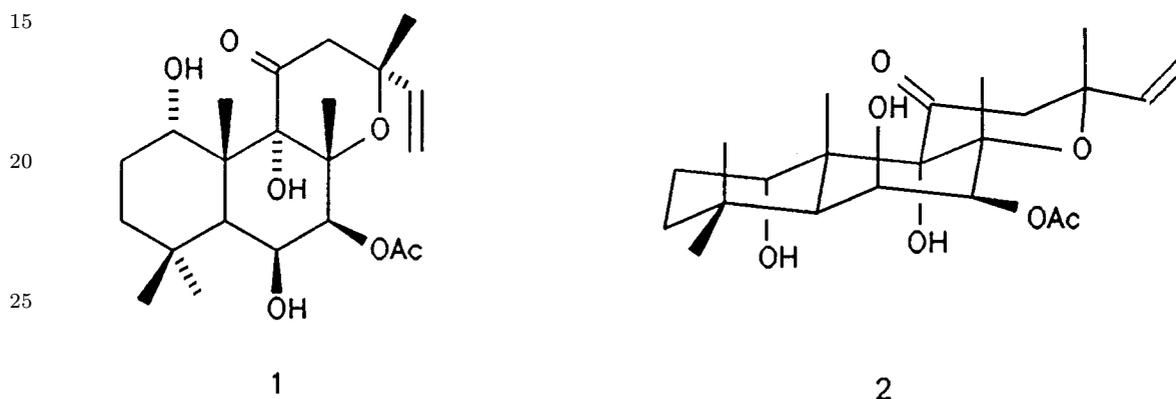
ES 2 065 843 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Estado de la Técnica

5 A partir de 1977 comenzaron a aparecer diversas publicaciones del Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants de la India y de investigadores de la Hoescht India Limited (Bombay)¹⁻⁹ referentes al aislamiento de una serie de 11-ceto óxidos de manoilo de los que un producto mayoritario, denominado *forskolina* (1), ha demostrado ser una nueva droga con aplicación en el tratamiento del glaucoma¹⁰, contra enfermedades de congestión cardíaca¹¹ y asma bronquial¹². Es además un producto, quizá el único
10 conocido hasta ahora, que actúa directa o intracelularmente sobre la adenilatociclasa, lo que constituye una importante herramienta para los procesos fisiológicos regulados por el AMP cíclico¹³. Los detalles de su estereoquímica se pueden apreciar mejor en la estructura 2.



La interacción entre la *forskolina* (1) y la adenilato ciclasa (AC) es tan fuerte y selectiva que la *forskolina* ha sido utilizada incluso como ligando de afinidad unida a resina de Sepharosa para el aislamiento del enzima¹⁴. Las propiedades han sido revisadas¹⁵.

35 Se han realizado también una serie de transformaciones microbiológicas, para dar lugar a 3-hidroxiderivados que perdieron su actividad biológica¹⁶. También se han incubado 1,9-dideoxi-*forskolinas*, dando principalmente lugar a derivados hidroxilados en C-2 y C-3 con muy poca actividad biológica¹⁷, aunque un 15,16-dihidroxiderivado obtenido, figura como patente¹⁸.

40 Actualmente se publican gran cantidad de trabajos, sobre todo de experiencias *in vitro* de la acción de la *forskolina*¹⁹, de análogos de la *forskolina*²⁰ y de algún otro labdano en este caso para el estudio del comportamiento locomotor en animales²¹.

45 Como puede comprobarse, la forskolina y sus análogos tienen gran interés por la actividad directa de la adenilatociclasa (AC) que trae como consecuencia un aumento en el nivel del AMP cíclico intracelular, influyendo además en una serie de procesos enzimáticos interrelacionados con este proceso. Son sin embargo muy escasos los productos que inhiban actividad en la AC. Cabe en este sentido destacar en la *insulina*, hormona que actúa extracelularmente a través de su receptor correspondiente y que provoca a través de las proteínas G una inhibición de la actividad de la AC, regulando sin embargo también el metabolismo de azúcares en forma opuesta a como lo hace el glucagón. Actuando a otro nivel, directamente sobre las proteínas G, los aniones fluoruro también inhiben la actividad de la AC. Son también muy estudiados los *esteres de phorbol*, diterpeno aislado de plantas del género *Euphorbia*, como promotores de tumores, sobre de piel, y por su acción sobre el nivel de AMP cíclico, aunque a nivel endocelular con acción sobre la proteínaquinasa-C, a través de la variación de los niveles de calcio²². Como puede
55 comprobarse los productos activos en este sentido son muy escasos, y de ahí el interés en la búsqueda de nuevas estructuras que actúen como inhibidores de la AC.

Descripción de la invención

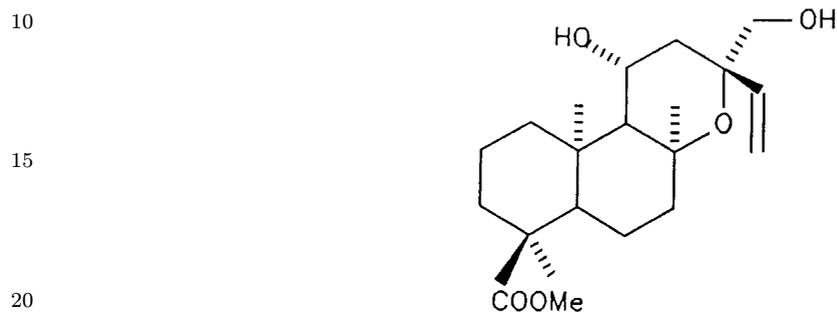
60 Se trata de patentar un producto semisintético inhibidor de la actividad de la AC. Este producto se trata de un óxido de manoilo de la serie *enantio*, obtenido semisintéticamente por vía químico-microbiológica a partir de un producto natural aislado de una *Sideritis*, aunque evidentemente también

puede obtenerse por síntesis total.

ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-óxido de manoilo (3)

5 ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-13(S)-óxido de manoilo (3)

ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil[8 α ,13(S)]-epoxilabd-14-eno (3)



3

25

Este producto 3 puede obtenerse, por ejemplo, de la siguiente manera: A partir del producto natural 4²³, por metilación con diazometano se obtiene el producto 5 cuya epoxidación con un perácido o sus precursores (por ejemplo ácido metacloroperbenzóico), produce la ciclación espontánea que conduce a los dos epímeros en C-13 (6 y 7), separación por métodos cromatográficos de los dos epímeros e incubación del epímero 6 con *Curvularia lunata* [cepa CECT 2130 de la Colección Española de Cultivos Tipo (ATCC 12017; NRRL 2380; CMI 61535; IFO 6299; QM 120H; Chas Pfizer Co. CBS 215.54)] para dar lugar al compuesto 3 (vease esquema). Un típico procedimiento de incubación con este hongo hidroxilante se encuentra descrito en la parte experimental de la publicación indicada en la referencia 24 así como también se encuentra descrito en otras publicaciones nuestras²⁵.

30

35

40

Este producto (3) inhibe fuertemente ($K=0.5$) la actividad de la AC a concentración 1 mM, inhibiendo la actividad basal, inhibiendo la actividad de la AC activada previamente por fluoruros o por forskolina. No inhibe la actividad de la AC previamente activada por glucagón.

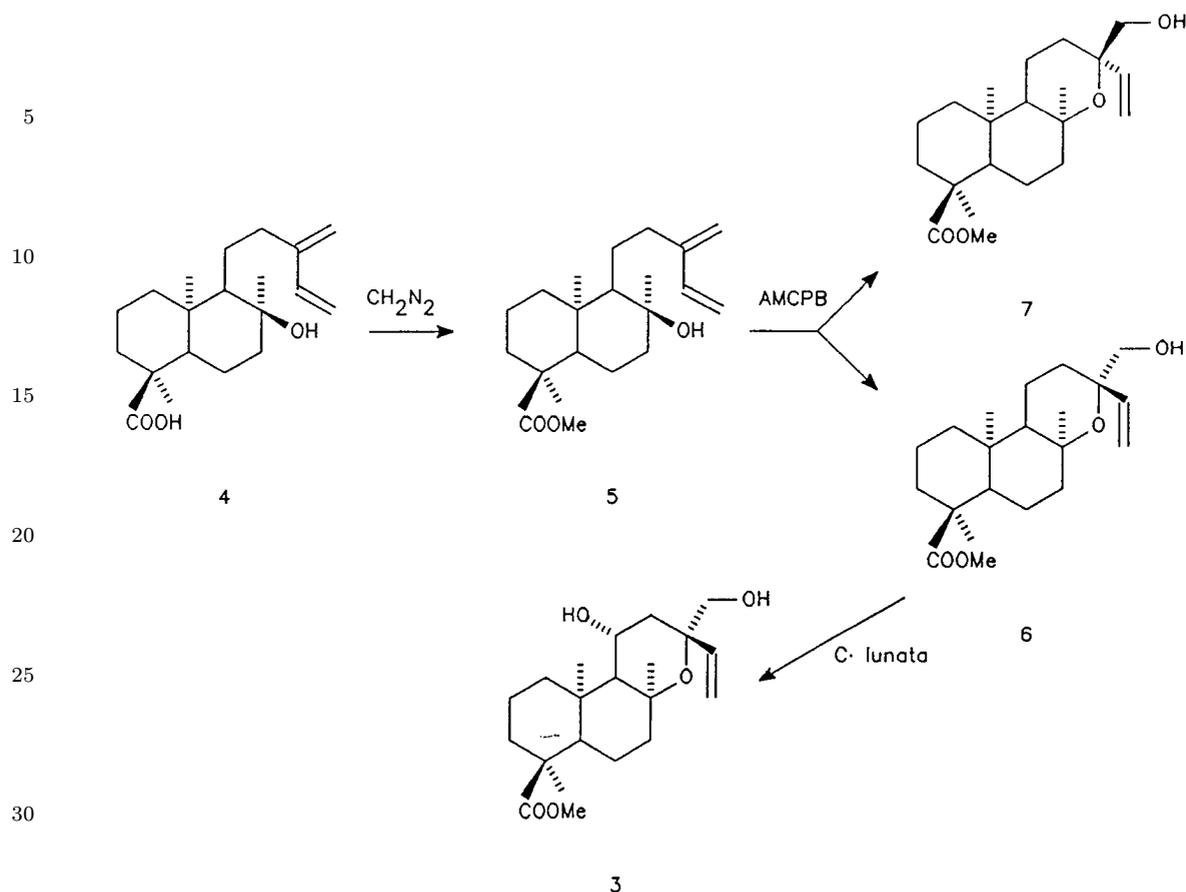
45

(Ver Fórmulas en la página siguiente.)

50

55

60



Ejemplo

Para la obtención del producto 3, se utiliza como producto de partida el ácido 6-desoxiandalusoico (ent-8 α -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-oico, 4), aislado de la *Sideritis varoi* subsp *cuatrecasasi*²³. El ácido 4 se disuelve en éter etílico y se le adiciona una disolución de diazometano en éter etílico²⁵. La reacción se controla por cromatografía de capa fina y una vez finalizada se concentra a vacío para eliminar el éter y se cromatografía en columna, obteniendo el ent-8 α -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-oato de metilo²⁵ (5). El tratamiento del éster 5 con ácido metacloroperbenzóico en cloroformo a 0°C durante 24 horas da lugar después de su separación por cromatografía en columna al ent-[8 α ,13(R)]-epoxi-16-hidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-labda-14-eno²⁵ (6) y ent-[8 α ,13(R)]-epoxi-16-hidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-labda-14-eno²⁵ (7). El producto 6 (300 mg) se disolvió en 10 ml de etanol y fue distribuido en 10 Erlenmeyer que contenían el cultivo de *Curvularia lunata* (preparado como se indica en la ref. 24). La incubación se mantiene durante 7 días originando una mezcla de metabolitos que una vez recuperados del medio²⁴ y separados por cromatografía en columna nos permite obtener como metabolito mayoritario el ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-[8 α ,13(S)]-epoxilabd-14-eno(3, 78 mg, 25 %):

$$[\alpha]_D = -35^\circ \text{ (c 0.7, CHCl}_3\text{)}$$

IR (μ_{max} , cm⁻¹) 3480, 3084, 1722, 1458, 1388, 1247, 1041, 926, 737.

¹H RMN (300 MHz, δ): 5.76 (1H, dd, J₁=17.4, J₂=10.8 Hz, H-14); 5.21 (dd, 1H, J₁=17.4, J₂=1.3, Hz) y 5.08 (1H, dd, J₁=10.8, J₂=1.3 Hz) (2H-15); 4.41 (1H, m, H-11); 3.62 (3H, s, grupo OMe); 3.52 y 3.35 (2H, sistema AB, J=11.1 Hz, 2H-16); 1.52 (3H, s, 3H-17); 1.17 y 1.12 (3H cada uno, s, 3H-19 y 3H-20).

¹³C RMN (75.47 MHz, δ (C)): 38.23^a (1), 17.44 (2), 36.77 (3), 47.47 (4), 51.356 (5), 22.93 (7), 75.78^b (8), 55.96 (9), 37.49 (10), 64.08 (11), 38.68^a (12), 75.48^b (13), 143.44 (14), 114.21 (15), 68.49 (16), 27.30 (17), 179.21 (18), 16.35 (19), 17.55 (20), 51.98 (COOMe) (valores con el mismo superíndice pueden ser

intercambiables).

EM (Ionización Química) (%): [M+1]⁺ 367 (100), 349 (48), 331 (34).

5 *Bibliografía*

1. Tandon, J.S., Dhar, M.M., Ramkumar, S. y Venkatesan, K., (1977), *Indian J. Chem.*, 15B, 880.
2. Bhat, S.V., Bajwa, B.S., Dornauer, H., De Souza, N.J. y Fehlhaber, H.W., (1977), *Tetrahedron Letters*,
10 1699.
3. Jauhari, P.K., Katti, S.B., Tandon, J.S. y Dhar, M.M., (1978), *Indian J. Chem.*, 16B, 1055.
4. Tandon, J.S., Jauhari, P.K., Singh, R.S. y Dhar, M.M., (1978), *Indian J. Chem.*, 16B, 341
15
5. Katti, S.B., Jauhari, P.K. y Tandon, J.S., (1979), *Indian J. Chem.*, 17B, 321.
6. Painuly, P., Katti, S.B. y Tandon, J.S., (1979), *Indian J. Chem.*, 18B, 214.
- 20 7. Bhat, S. V., Dohadwalla, A. N., Bajwa, B. S., Dadkar, N. K., Dornauer, H. y De Souza, N. J., (1983),
J. Med. Chem., 26, 486.
8. Saxena, A.K., Green, M.J., Shue, H.J., Wong, J.K. y McPhail, A.T., (1985), *Tetrahedron Letters*, 26,
551.
- 25 9. Prakash, O., Roy, R.. y Dhar, M.M., (1986), *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1779.
10. Caprioli, J., Sears, M., (1983), *Lancet*, 958.
- 30 11. Erhardt, P.W., (1987), *J. Med. Chem.*, 30, 231.
12. Lichey, J., Friedrich, t., Priesnitz, M., Biamino, G., Usinger, P., Huchauuf, H., (1984), *Lancet*, 167.
13. (a) Pfeuffer, E., Dreher, R.M., Metzger, H., Pfeuffer, T., (1985), *Proce. Natl. Acad. Sci. USA*, 82,
35 3086. (b) May, D.C., Ross, E. M., Gilman, A.G., Smigel, M.D., (1985), *J. Bio. Chem.*, 260, 15829. (c)
Smigel, M.D., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 1976.
14. Pfeuffer, E., Dreker, R.M., Metzger, H. y Pfeuffer, T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3086.
- 40 15. De Souza, N.J. Dohadwalla, A.N. y Reden, J., (1983), *Medicinal Research Reviews*, 3, 201.
16. KHandelwal, Y. de Souza, N.J., Chatterjee, S., Ganguli, B.N. y Rupp, R.H., (1987), *Tetrahedron
Letters*, 28(35), 4089.
- 45 17. Khandelwal, Y., Inamdar, P.K., de Souza, N. J., Rupp, R. H., Chatterjee, S. y Ganguli, B.N., (1988),
Tetrahedron, 44(6), 1661.
18. *Polyoxygenated labdane Terpenoid*, Indian Patent Application No. 346/BOM/84, fecha 14 Diciembre
de 1984.
- 50 19. (a) Valensi, P., Lelievre, B., Sandrebanon, D. y Attali, J.R., (1991), *Pathologie Biologie* 39 (3), 205.
(b) Nishikawa, T., kasajima, T. y Kanai, T., (1991), *Toxicology Letters*, 56, 145. (c) Moran, W.M. y
Valentich, J.D., (1991), *American Journal of Physiology*, 260, (4), C824.
- 55 20. Hubbard, J.W., Conway, P.G., Nordstrom, L.C., Hartman, H.B., Lebedinsky, Y., Omalley, G.J. y
Kosley, R.W., (1991), *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256 (2), 621.
21. (a) Georgieva, J., (1990), *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 12,
(9), 591. (b) Geogieva, J. y Danchev, N., (1990), *Methods and Findings in Experimental and Clinical
60 Pharmacology*, 12(10), 679.
22. Ashedel, C.L. (1987) *Biochim. Biphys. Acta.*, 822, 219.

23. García-Granados, A. Martínez, A., Molina, A., Onorato, M.E., Rico, M., Sáenz de Buruaga, A. y Sáenz de Buruaga, J.M., (1985), *Phytochem.*, 24, 1789.

5 24. García-Granados, A., Martínez, A., Jiménez, M.B., Onorato, M.E., Rivas, F. y Arias, J.M., (1990), *J. Chem. Res.(S)*, 94.

25. Arias, J.M., García-Granados, A., Jiménez, M.B., Martínez, A., Rivas, F. y Onorato M.E., (1988), *J. Chem. Res. (S)*, 277; *J. Chem. Res. (M)*, 2064.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Producto inhibidor de la actividad de la adenilatociclasa, **caracterizado** por consistir en un *enantio*-óxido de manilo cuyos nombre es ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-óxido de manilo que también puede nombrarse como ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-4 α -carboximetil-13(S)-óxido de manilo o ent-11 β ,16-dihidroxi-18-nor-carboximetil-[18 α ,13(S)]-epoxilab-14-eno.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C07D 311/92, A61K 31/35

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-A-447962 (HOECHST AG)	1
A	EP-A-294695 (HOECHST AG)	1
A	EP-A-222413 (NIPPON KAYAKU)	1
A	EP-A-126313 (HOECHST AG)	1
A	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Vol. 26, pág. 436-439, 1983; K.B. SEAMON et al.: "Structure-Activity Relationships for activation of Adenylate Cyclase by the diterpene Forskolin and its derivatives".	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

05.01.95

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/1