



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 065 842**

21 Número de solicitud: 9300489

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: **22.10.95**

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;
Rivas Sánchez, Francisco y
Flavia, Mirta**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Aplicación de ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13-epi-óxido de manoilo como activador de la adenilatociclasa.**

57 Resumen:

Aplicación de ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13-epi-óxido de manoilo como activador de la adenilatociclasa. Se patenta un producto potenciador de la actividad de la adenilatociclasa. Se trata de un enantio-13-epi-óxido de manoilo cuyo nombre es ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13-epi-óxido de manoilo (producto 3 de la memoria, que también puede nombrarse como ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13(S)-óxido de manoilo o ent-[8 α ,13(S)]-epoxi-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxiabd-14-eno).

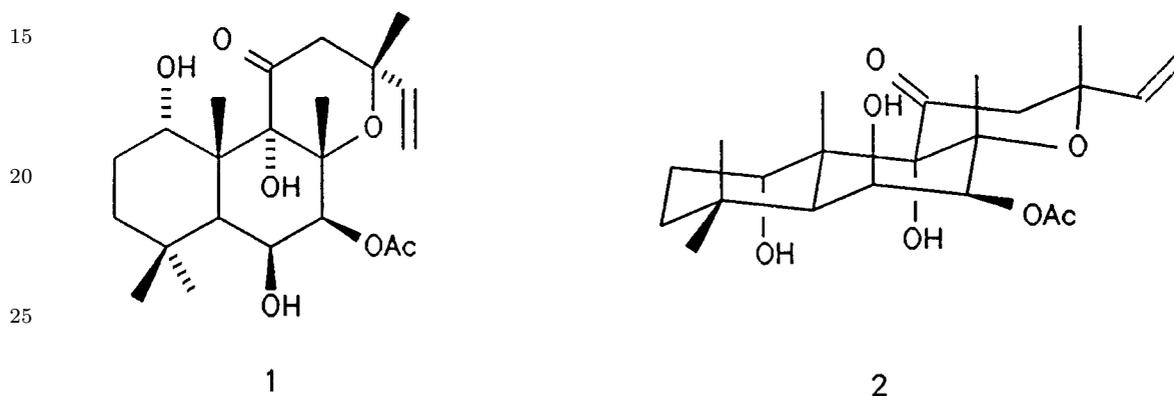
ES 2 065 842 B1

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

DESCRIPCION

Estado de la Técnica

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 conocido hasta ahora, que actúa directa e 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.

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-dideoxiforskolinas, 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.

Actualmente se publican gran cantidad de trabajos, sobre todo de experiencias *in vitro* de la acción de la *forskolina*¹⁹, de análogos de *forskolina*²⁰ y de algún otro labdano en este caso para el estudio del comportamiento locomotor en animales²¹. Como puede comprobarse, la forskolina y sus análogos tienen gran interés por la activación 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 a 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 o 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 estudiados los *esteres de phorbol*, diterpeno aislado de plantas del género *Euphorbia*, como promotores de tumores, sobre todo de piel, y por su acción sobre el nivel de AMP cíclico, aunque a nivel endocelular con acción sobre la proteinaquinasa-C, a través de la variación de los niveles de calcio²². Como puede 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

Se trata de patentar un producto semisintético activador 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 la *Sideritis*, aunque evidentemente también

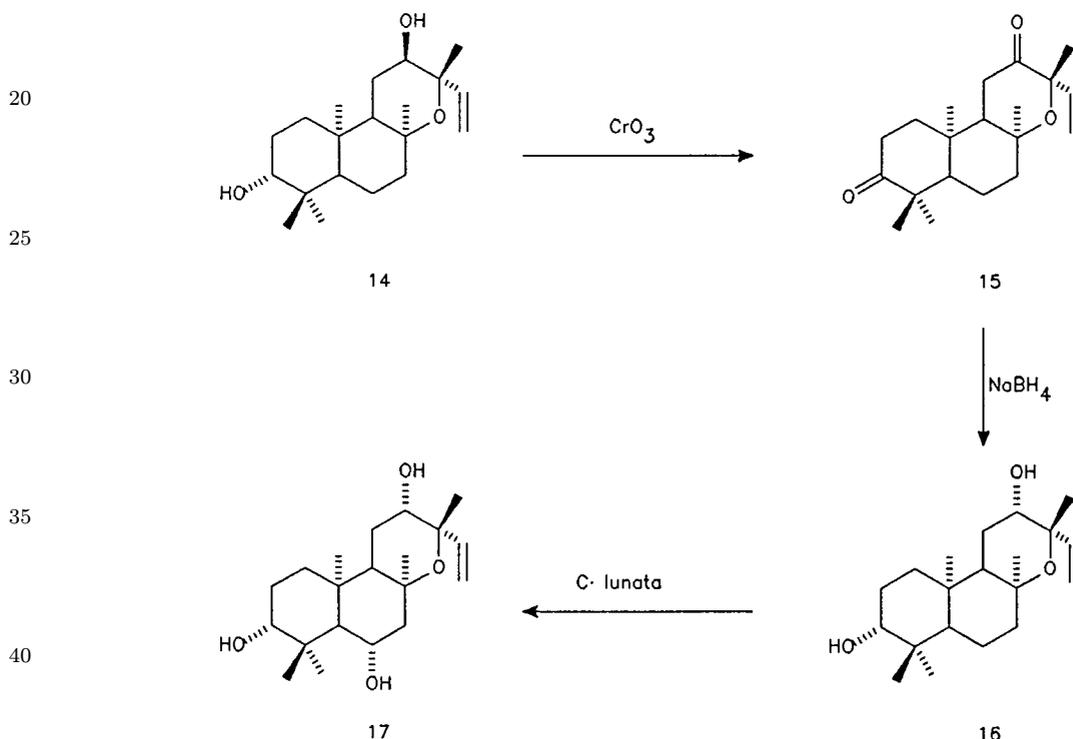
puede obtenerse por síntesis total.

ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13-epi-óxido de manoilo (3)

5 ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13(S)-óxido de manoilo (3)

ent-[8 α ,13(S)]-epoxi-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxiabd-14-eno (3)

El producto 3 puede obtenerse, por ejemplo a partir del producto 4 (*varodiol*)²³, un producto natural
10 descrito por primera vez por nuevo grupo de investigación, cuya oxidación origina la dicetona 5 que por
reducción con hidruros da lugar al epímero en C-12 (6)²⁴. cuya incubación con hongos hidroxilantes,
como por ejemplo el *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], produce una
15 hidroxilación axial sobre C-6 (producto 3) cuya actividad biológica ha sido probada, resultando ser un
activador suave de la AC.



Ejemplo

Obtención del producto 3

50 El producto 3 puede obtenerse a partir del ent-3 β , 12 α -dihidroxi-8 α ,13(S)-epoxilabd-14-eno (*varodiol*,
4) aislado de la *Sideritis varoi*²³ en nuestro grupo de investigación. La oxidación de este producto con
el reactivo de Jones conduce a la formación de ent-[8 α ,13(S)]-epoxilabd-14-en -3,12-diona (5) cuya re-
ducción mediante borohidruro sódico da lugar a ent-3 β ,12 β -dihidroxi-[8 α ,13(S)]-epoxilabd-14-eno²⁴ (6).
55 El producto 16 (250 mg) se disuelve en 5 ml de etanol que se distribuyen en 5 Erlenmeyer que contienen
el cultivo de *Curvularia lunata* (preparado como se indica en la ref. 25). La incubación se mantiene
durante 7 días. Después de recuperar y purificar la mezcla de metabolitos obtenidos se obtiene el ent-[8 α ,
13(S)]-epoxi-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxiabd-14-eno (3, 22 mg, 10%): $[\alpha]_d = -20^\circ$ (c 1, EtOH)

60 IR (μ_{max} , cm^{-1}): 3421, 1459, 1383, 1062, 1037, 971 y 925.

¹H RMN (300 MHz, δ): 6.32 (1H, dd, $J_1=17.8$, $J_2=11.3$ Hz, H-14);

ES 2 065 842 B1

5.42 (1H, dd, $J_1=17.8$, $J_2=1.4$ Hz) y 5,23 (1H, dd, $J_1=11.3$, $J_2=1.4$ Hz)(2H-15); 4.53 (1H, ddd, $J_1=3.7$, $J_2=J_3=2.8$ Hz, H-6);

3.50 (1H, dd, $J_1=11.4$, $J_2=4.8$ Hz, H-12); 3,15 (1H dd, $J_1=8.7$, $J_2=6.9$ Hz, H-3); 1,53, 1.33, 1.13, 1.11 y 1.06 (3H cada uno, s, grupo metilo).

^{13}C RMN (75.47 MHz, δ (C)): 39.48 (1), 27.44 (2), 79.16 (3), 39.60 (4), 56,07^a (5), 68.88 (6), 50.08, (7), 76.43 (8), 58.40^a (9), 36.77 (10), 25.38 (11), 77.80 (12), 75.15 (13), 140.46 (14), 117.11 (15), 38.38^b (16), 25.48 (17), 27.48^b (18), 16.78 (19), 17.53 (20) (Los valores que tienen el mismo superíndice pueden ser intercambiables)

EM (Ionización química)(%): $[\text{M}+1]^+$ 339 (4), 337 (9), 321 (100), 303 (39), 285 (15).

15

Bibliografía citada

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. t Fehlhaber, H.W., (1977), *Tetrahedron Letters*, 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
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.
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.
9. Prakash, O., Roy, R.. y Dhar, M.M., (1986), *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1979.
10. Caprioli, J., Sears, M., (1983), *Lancet*, 958.
11. Erhardt, P.W., (1987), *J. Med. Che.*, **30**, 231.
12. Lichey, J., Friedich, T., Priesnitz, M., Biamino, G., Usinger, P., Huckauf, H., (1984), *Lancet*, 167.
13. (a) Pfeuffer, E., Dreherm, R.M., Metzger, H., Pfeuffer, T., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 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.
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.
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 Patente Application No. 346/BOM84, fecha 14 Diciembre de 1984.
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.
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) Georgieva, J. y Danchev, N., (1990), *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 12(10), 6376.

5 22. Ashedel, C.L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.*, 822, 219.

23. Algarra, J., García-Granados, A., Sáez de Buruaga, A. y Sáenz de Buruaga, J.M., (1983), *Phytochem.*, 22, 1779.

10 24. 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.

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

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Producto potenciador de la actividad de la adenilatociclasa **caracterizado** por consistir en un *enantio-13-epi-óxido* de manoilo cuyo nombre es ent-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi -13-epi-óxido de manoilo que
5 también puede nombrarse como ent -3 β ,6 β ,12 β -trihidroxi-13(S)-óxido de manoilo o ent -[8 α ,13(S)]-epoxi-3 β ,6 β ,12 β -trihidroxiabd-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