



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 065 844**

21 Número de solicitud: 9300492

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: 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  
Granada, ES**

72 Inventor/es:  
**García-Granados López de Hierro, Andrés;  
Rodríguez Martínez, Antonio;  
Rivas Sánchez, Francisco y  
Flavia, Mirta**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Aplicación de ent-16,18-dihidroxi-6-oxo-óxido de manoilo como inhibidor de la adenilatoclasa.**

57 Resumen:  
Aplicación de ent-16, 18-dihidroxi-6-oxo-óxido de manoilo como inhibidor de la adenilatoclasa. Se patenta un producto inhibidor de la actividad de la adenilatoclasa. Se trata de un enantio-óxido de manoilo cuyo nombre es ent-16, 18-dihidroxi-6-oxo-13 (S)-óxido de manoilo (que también puede nombrarse como ent-16, 18-dihidroxi-óxido de manoilo o ent-16, 18-dihidroxi-[8 $\alpha$ , 13 (S)]-epoxilabd-14-en-6-ona).

ES 2 065 844 B1

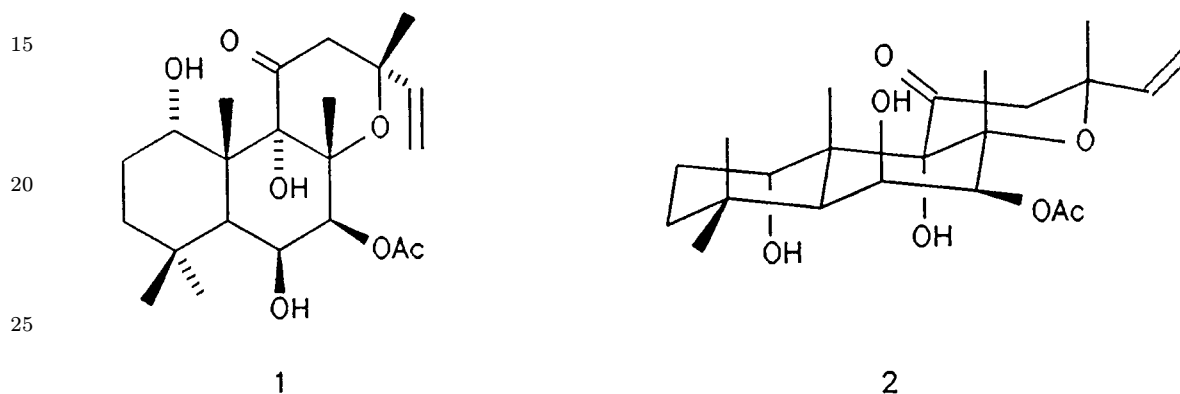
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

## 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)<sup>1-9</sup> 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 glaucoma<sup>10</sup>, contra enfermedades de congestión cardiaca<sup>11</sup> y asma bronquial<sup>12</sup>. 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 cíclico<sup>13</sup>. 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 enzima<sup>14</sup>. Las propiedades han sido revisadas<sup>15</sup>.

Se han realizado también una serie de transformaciones microbiológicas, para dar lugar a 3-hidroxiderivados que perdieron su actividad biológica<sup>16</sup>. También se han incubado 1,9-dideoxiforskolinas, dando principalmente lugar a derivados hidroxilados en C-2 y C-3 con muy poca actividad biológica<sup>17</sup>, aunque un 15,16-dihidroxiderivado obtenido, figura como patente<sup>18</sup>.

Actualmente se publican gran cantidad de trabajos, sobre todo de experiencias *in vitro* de la acción de la *forskolina*<sup>19</sup>, de análogos de la *forskolina*<sup>20</sup> y de algún otro labdano en este caso para el estudio del comportamiento locomotor en animales<sup>21</sup>.

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 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 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 calcio<sup>22</sup>. 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 inhibidor de la actividad de la AC. Este producto se trata de un óxido de manoilo de la serie *enantio*, obtenido semisintéticamente por vía química a partir de un producto natural aislado de una *Sideritis*, aunque evidentemente también puede obtenerse por síntesis

total.

ent-16,18-dihidroxi-6-oxo-óxido de manoilo (3)

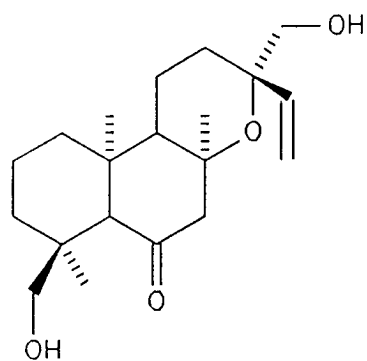
5 ent-16,18-dihidroxi-6-oxo-13(S)-óxido de manoilo (3)

ent-16,18-dihidroxi-[8 $\alpha$ ,13(S)]-epoxilabd-14-en-6-ona (3)

10

15

20



8

25

30

35

40

45

50

55

60

Este producto 3 puede obtenerse, entre otras formas, de la manera siguiente: A partir de *andalusol*<sup>23</sup> (4) o mezcla de sus acetatos, por acetilación se obtiene el diacetilandalusol<sup>24</sup> 5, el cual se epoxida con un perácido o sus precursores (p.e. ácido m-cloroperbenzónico), lo que además de la epoxidación da lugar a la ciclación para obtener los epímeros 6 y 7<sup>25</sup>. El epímero 6 se saponifica y oxida selectivamente para dar lugar a 3 (véase esquema). Estos procesos pueden realizarse en combinación con la protección selectiva de los alcoholes primarios, fundamentalmente el alcohol en C-18 que es el más reactivo, oxidación en C-6 y desprotección de C-18.

(Ver Fórmulas en la página siguiente.)

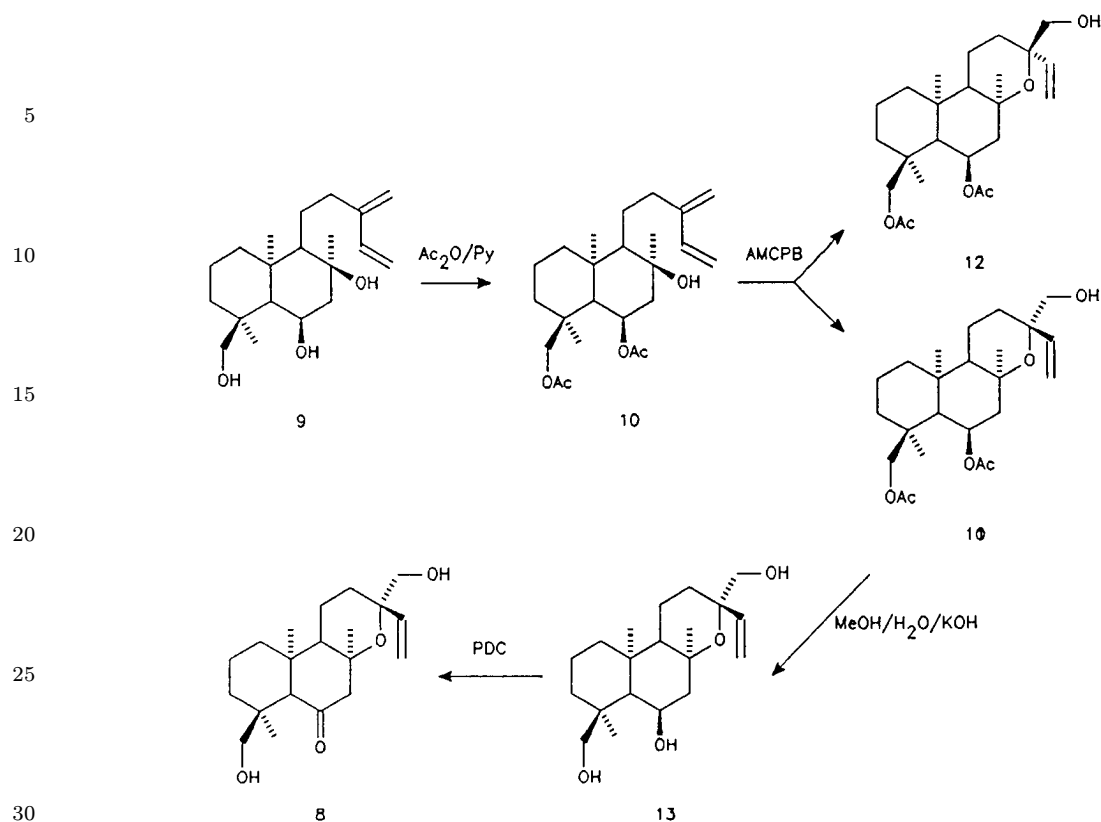
40

45

50

55

60



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.

#### Ejemplo

El producto 3 puede obtenerse a partir del ent-6 $\alpha$ , 8 $\alpha$ ,18-trihidroxiabda-13(16),14-dieno (*andalusol*, 4) aislado de la *Sideritis arborescens*<sup>23</sup>. La acetilación del triol 4 con  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$  durante 12 horas a temperatura ambiente origina el ent-6 $\alpha$ ,18-diacetoxi-8 $\alpha$ -hidroxilabda-13(16),14-dieno<sup>24</sup> (5). El tratamiento del diacetato 5 con ácido metacloroperbenzóico en cloroformo a 0°C durante 24 horas da lugar a ent-6 $\alpha$ ,18-diacetoxi-[8 $\alpha$ ,13-(S)]-epoxi-16-hidroxiabd-14-eno<sup>25</sup> (6) y ent-6 $\alpha$ ,18-diacetoxi-[8 $\alpha$ ,13(R)]-epoxi-16-hidroxiabd-14-eno<sup>25</sup> (7). La saponificación del diacetato 6 con potasa alcohólica a reflujo durante una hora conduce al ent-[8 $\alpha$ ,13(S)]-epoxi-6 $\alpha$ ,16,18-trihidroxiabd-14-eno (8):

$[\alpha]_D = -37^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

IR ( $\mu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3343, 3088, 1465, 1444, 1387, 1050, 955, 922, 736.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz,  $\delta$ ): 5.79 (1H, dd,  $J_1=17.4$ ,  $J_2=10.8$  Hz, H-14); 5.25 (1H, dd,  $J_1=17.4$ ,  $J_2=1.4$  Hz) y 5.11 (1H, dd,  $J_1=10.8$ ,  $J_2=1.4$  Hz) (2H-15); 3.52 y 3.11 (2H, sistema AB,  $J=10.9$  Hz, 2H-18); 3.27 (2H,  $Q_{AB}$  colap., 2H-16); 1.30 (3H, s, 3H-17); 0.91 y 0.83 (3H cada uno, s, 3H-19 y 3H-20).

<sup>13</sup>C RMN (75.47 MHz,  $\delta$  (C)): 38.27<sup>a</sup> (1), 17.80 (2), 38.61<sup>a</sup> (3), 37.86<sup>b</sup> (4), 57.14 (5), 67.82 (6), 53.77 (7), 74.56 (8), 51.38 (9), 38.17<sup>b</sup> (10), 14.75 (11), 26.42 (12), 143.54 (14), 114.57 (15), 68.86 (16), 27.29 (17), 74.91 (18), 16.52 (19), 17.86 (20) (valores con el mismo superíndice pueden ser intercambiables)

La oxidación del triol 8 (500 mg) se realiza con dicromato de piridinio (556 mg) en 40 ml de cloruro de metileno seco durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se diluye con éter etílico y se filtra. El filtrado obtenido se concentra a vacío y el producto obtenido se purifica por cromatografía en columna, aislándose 290 mg (58 %) del ent-16,18-dihidroxi-[8 $\alpha$ ,13(S)]-epoxilabd-14-en-6-ona (3):

## ES 2 065 844 B1

$[\alpha]_D = -22^\circ$  (c 1,  $\text{CHCl}_3$ )

IR ( $\mu_{max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3535, 3084, 1709, 1473, 1444, 1388, 1284, 1043, 741

5

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\delta$ ): 5.82 (1H, dd,  $J_1 = 17.4$ ,  $J_2 = 10.8$  Hz, H-14); 5.25 (1H, dd,  $J_1 = 17.45$ ,  $J_2 = 1.4$  Hz) y 5.15 (1H, dd,  $J_1 = 10.8$ ,  $J_2 = 1.4$  Hz) (2H-15); 3.52 y 3.10 (2H, sistema AB,  $J = 10.5$  Hz, 2H-18); 3.29 (2H,  $Q_{AB}$  colap., 2H-16); 1.24 (3H, s, 3H-17); 1.09 y 0.92 (3H cada uno, s, 3H-19 y 3H-20)

10

$^{13}\text{C}$  RMN (75.47 MHz,  $\delta(\text{C})$ ): 38.82 (1), 17.51 (2), 35.86 (3), 36.90 (4), 60.97 (5), 210.07 (6), 60.15 (7), 77.38<sup>a</sup> (8), 52.71 (9), 40.14 (10), 15.07 (11), 26.65 (12), 77.62<sup>a</sup> (13), 143.31 (14), 114.60 (15), 68.50 (16), 26.52 (17), 71.53 (18), 16.59 (19), 17.74 (20) (valores con el mismo superíndice pueden ser intercambiables)

15

EM (Ionización química)(%):  $[\text{M}+1]^+$  337 (100), 319 (61), 301 (20).

### Bibliografía

1. Tandon, J.S., Dhar, M.M., Ramkumar, S. y Venkatesan, K., (1977), *Indian J. Chem.*, 15B, 880.

20

2. Bhat, S.V., Bajwa, B.S., Dornauer, H., De Souza, N.J. y 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.

25

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.

30

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.

35

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*, 1779.

40

10. Caprioli, J., Sears, M., (1983), *Lancet*, 958.

11. Erhardt, P.W., (1987), *J. Med. Chem.*, 30, 231.

12. Lichey, J., Friedrich, T., Priesnitz, M., Biamino, G., Usinger, P., Huckauf, H., (1984), *Lancet*, 167.

45

13. (a) Pfeuffer, E., Dreher, 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.

50

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.

60

18. *Polyoxygenated labdane Terpenoid*, Indian Patent Application No. 346/BOM/84, fecha 14 Diciembre de 1984.

## ES 2 065 844 B1

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.
- 5 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), 679.
- 10 22. Ashedel, C.L. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.*, 822, 219.
23. García-Granados, A., Martínez, A. y Onorato, M.E., (1985), *Phytochem.*, 24, 2517.
- 15 24. López, M.A., von Carsten, C., Rodríguez, B., Fayos, J. y Ripoll, M., (1977), *J. Org. Chem.*, 24, 2517.
- 25 25. García-Granados, A., Martínez, A., Martínez, J.P., Onorato, M.E. y Arias, J.M., (1990), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1261.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

**REIVINDICACIONES**

1. Producto potenciador de la actividad de la adenilatociclasa **caracterizado** por consistir en un *enantio*-óxido de manoilo cuyo nombre es ent-16,18-dihidroxi-6-oxo-13(S)-óxido de manoilo que también  
5 puede nombrarse como ent-16,18-dihidroxi-óxido de manoilo o ent-16,18-dihidroxi-[8 $\alpha$ ,13(S)]-epoxilabd-14-en-6-ona.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: 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