

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 160 093**

② Número de solicitud: 200000660

⑤ Int. Cl.⁷: C07D 307/58

A61K 31/365

A61P 37/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **20.03.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2001**

Fecha de concesión: **01.04.2002**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2002**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.06.2002

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Investigación y Medicina S.L. y
Saetabis Bio Consulting**

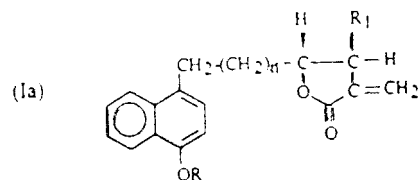
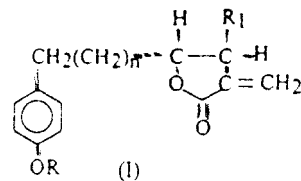
⑱ Inventor/es: **Bermejo Barrera, Jaime;
Hernández Silva, Margarita;
Álvarez de Mon, Melchor y
Pivel Ranieri, Juan Pablo**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Derivados del ácido p-hidroxifenil propiónico como agentes antiproliferativos.**

③ Resumen:

Derivados del ácido p-hidroxifenil propiónico como agentes antiproliferativos.
Derivados del compuesto ácido por p-hidroxifenil propiónico caracterizados por tener dichos derivados las fórmulas generales (I) y (Ia), donde n puede tomar los valores 1, 2, 3; R puede ser H ó CH₃ y R₁ puede ser CH₃ ó H con actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.



ES 2 160 093 B1

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

DESCRIPCION

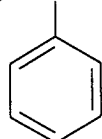
Derivados del ácido p-hidroxifenil propiónico como agentes antiproliferativos.

5 Sector de la técnica

Dentro del grupo terapéutico de los antiinflamatorios no esteroideos ocupan un lugar destacado, tanto desde el punto de terapéutico como comercial los derivados del ácido propiónico.

10 Dentro de este subgrupo podemos distinguir en primer lugar el ibuprofeno (1), que fue el primero de una serie en la que hoy podemos encontrar el naproxeno (2), el ketoprofeno (3) y el fenbufeno (4) entre otros.

15

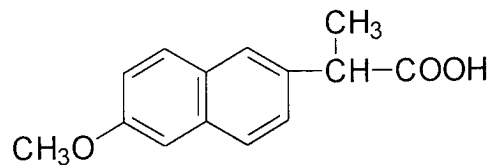


20



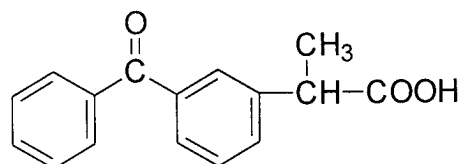
25

30



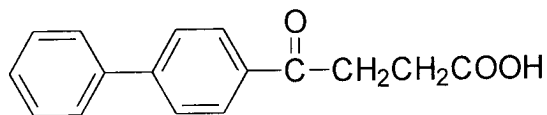
35

40



45

50

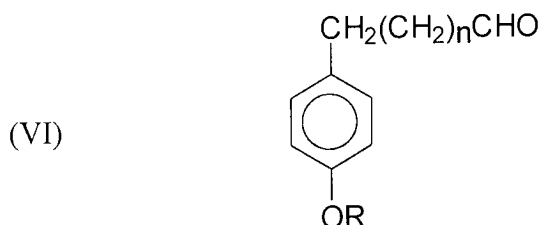


55

Las características farmacodinámicas de todos estos productos es similar, presentándolas en distinto grado de actividad antiinflamatoria, antitérmica, analgésica y antiplaquetaria, siendo todas inhibidoras no selectivas de las ciclooxigenasas (*Cox I* y *Cox II*) (**Terapéutica farmacológica del dolor**. Jesús Flores 1993. Ed. EUNSA. Pamplona 1993. *Colección clínica de la salud* Capítulo 5, pag: 121-156).

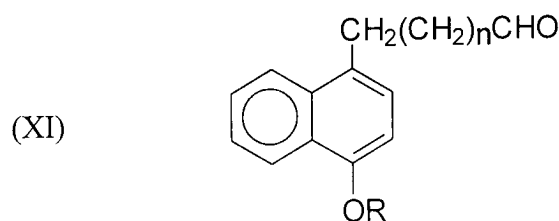
60

La analogía estructural entre los compuestos (1) y (VI) (hallado este último y descrito originariamente en un helecho "*Asplenium onopteris*"), nos ha llevado al estudio farmacológico de las dos series de moléculas funcionalizadas a partir de



10 n=1,2,3

R= CH₃,H



20 de acuerdo a lo mostrado en el esquema 1 y 2.

25 La idea central de la presente invención consiste por lo tanto en obtener una serie de moléculas a partir de una funcionalización adecuada utilizando el compuesto VI del Esquema 1 y usando como sintones funcionalizados, los correspondientes derivados de los anillos aromáticos, benceno y naftaleno.

30 Antecedentes de la invención

35 La célula, unidad estructural y funcional de todos los seres vivos está gobernada por una serie de mecanismos que presentan una toma de decisiones que determinan distintas conductas: proliferación, diferenciación, activación, senescencia y apoptosis. En organismos superiores, existen en algunos tejidos, células cepa (stem cells) que generan por proliferación y diferenciación las células maduras funcionales.

40 Dentro de los sistemas de los organismos superiores, el sistema inmunológico constituye un mecanismo de defensa esencial para conservar la viabilidad del individuo. Los seres multicelulares, incluyendo a los humanos, se encuentran en un entorno con múltiples microorganismos que pueden penetrar en su interior y utilizarlos para su propio crecimiento. El sistema inmune es capaz de reconocer a los microorganismos y desencadenar una respuesta efectora que conduce a su destrucción o anulación funcional. Por otra parte los seres multicelulares sufren errores en los procesos de proliferación celular y acumulan mutaciones que conducen a la transformación tumoral de algunos de sus componentes. El sistema inmune también es capaz de reconocer las células que han sufrido la transformación neoplásica y conseguir la supresión del crecimiento y diseminación tumoral. Sin embargo, la capacidad efectora del sistema inmune puede provocar alteraciones tisulares inflamatorias con lesión de los componentes parenquimatosos. Estos procesos se acompañan de la infiltración y proliferación de células del sistema inmune en los tejidos. Algunos se originan en la respuesta a agentes infecciosos y pueden ser agudos y sistémicos como las sepsis y la respuesta inflamatoria multiorgánica o crónicos y localizados como la hepatitis, artritis tuberculosa etc. Otros procesos inflamatorios mediados por el sistema inmune son los denominados autoinmunes que se desencadenan frente a componentes propios del organismo como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria del tubo digestivo etc. El sistema inmune, como sistema celular, también puede sufrir transformaciones tumorales dando lugar a los síndromes linfoproliferativos malignos. El sistema inmune también participa en la aptogénesis del daño tisular de procesos crónicos como algunas demencias y la arteriosclerosis.

60 En el análisis de las respuestas inmunológicas se distingue la inmunidad natural o inespecífica y la inmunidad adquirida o específica. Esta a su vez se divide en la inmunidad *humoral* caracterizada por la producción de anticuerpos por los linfocitos tipo B y en respuesta de mediación celular a través de los linfocitos T. La respuesta inmunológica está constituida por una compleja red retroalimentada en la que intervienen mediadores autocrinos y paracrinos, citoquinas, factores de crecimiento, etc., además de los

mediadores responsables de la conexión con el sistema endocrino y el sistema nervioso.

Un elemento esencial en la generación de la respuesta inmunológica específica es la capacidad de expandir subpoblaciones linfocitarias por el estímulo antigénico determinado a través de un complejo proceso de reconocimiento y procesamiento del antigénico seguido de un proceso de presentación a la célula efectora que genera finalmente la respuesta. Se puede resumir este proceso diciendo que la proliferación de las subpoblaciones correspondientes al antígeno es la propiedad esencial de los linfocitos maduros (Assas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 2nd ed. W.B. USA: Sanders Company, 1994:31-3).

Los mecanismos celulares de la proliferación supone a la vez un complejo mecanismo de recepción de señales externas a la célula a través de receptores de membranas, y la transmisión de dichas señales al núcleo celular para poner en marcha los mecanismos mitóticos que suponen asimismo procesos nucleares y citoplasmáticos (Metezeau PH, Ronot X, Le Loan-Merliquac Q, Ratinarid MH. *La Citometrie en Flux. In: Le Gorde Cellulaire*. Paris: MEDSI/Mc Gram Hin, 1988:77-87).

Los mecanismos fisiológicos del sistema inmunológico debe incluir necesariamente una disponibilidad de células “defensivas” en los sitios en donde su actividad es necesaria y de ahí la existencia de mecanismos de “llamada”, circulación, reclutamiento y adhesión.

La eficiencia del sistema inmunológico, sin embargo, está sujeta a disfunciones que en líneas generales se pueden separar en tres tipos fundamentales como previamente se ha indicado. La disfunción proliferativa, aquella en la que alguna población o subpoblación celular prolifera fuera de control, dando lugar a los distintos tipos de leucemias y linfomas y otros *síndromes linfoproliferativos malignos y benignos*. La disfunción funcional supone tanto una exacerbación de la respuesta que da origen por ejemplo a patologías auto inmunes por error en el reconocimiento antigénico, o una disminución de un tipo de respuesta dando lugar a las distintas situaciones de *inmunosupresión*. Un caso particular, lo constituyen las patologías o situaciones de *inflamación* (crónicas o agudas) con la concomitante destrucción tisular y alteración funcional, que se pueden producir en el contexto de *enfermedades auto inmunes sistémicas u órganos específicas así como en la respuesta a diversos agentes infecciosos*.

La patología del sistema inmunológico es en algún aspecto, y paradójicamente, paralela al curso de los procesos tecnológicos y sociales. Es indudable por ejemplo la estrecha relación entre el desarrollo de la pandemia del SIDA con los factores sociales tales como el enorme incremento de los desplazamientos, la liberalización de costumbres o la situación de desempleo con sus consecuencias de marginación y drogadicción (Balter M, Cohen J. *International AIDs Meeting Infects a dose of realism*. Science (New Fows) 1998;281:159-60., Mann JM, Tarantola DJ. *HIV 1998: the global picture*. Sci Am 1998;279(1):82-3., Bartlett JG, Moore RD. *Improving HIV therapy*. Sci Am 1998;279(1):84-7).

Otro factor trascendente de la patología inmunológica es el desarrollo de la industria química y la contaminación ambiental que propicia el desarrollo de alergias y de inmunotoxicidad (Descotes J. *Inmunotoxicology of drugs and chemicals*. Elsevier Press, 1990., Herchman E, Kimber I, Purches IFH. *Inmunotoxicology: Supresive and stimulatory effect of drugs and enviromental chemicals on the immune system*. Arch Toxicol 1989;63:257-73).

Finalmente podemos mencionar que, al menos en países desarrollados, el aumento del promedio de vida, variaciones en la nutrición, modificaciones en las interacciones con agentes infecciosos, el estilo de vida actual, se ha asociado a una mayor incidencia y prevalencia de enfermedades autoinmunes autoinmunes con reconocimiento inadecuado de los tejidos, vistos como “no propio” tales como la artritis reumatoides (Lugmano R, Gordon C; Bacon P. *Clinical Pharmacology and modifier of autoimmunity and inflammatorion in rehmmatoid disease*. Drugs 1994;47(2):259-83), diabetes autoimmune (Riestra Moriegue JL, Guerreo Silva R, Fenández Sánchez JA, Balio Hernández J, Rodríguez Pérez A. *Revisión de los inmunosupresores en el tratamiento de la artritis reumatoide*. Inflamación 1993; IV (6):368-81).etc.

Finalmente mencionaremos dentro de los aspectos ligados al desarrollo tecnológico y ambiental la repercusión de la exposición a radiaciones ionizantes.

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos y la creciente repercusión social de las patologías inmunológicas, ha llevado en los últimos 30 años al desarrollo de sustancias capaces de manipular terapéuticamente el sistema inmunológico (inmunomoduladores).

En resumen debe entenderse que la disfunción inmunológica es siempre ambivalente y que el desarrollo

de la supresión de algunas de las funciones puede ocasionar la exacerbación de otras (y viceversa), y que esto supone una especial dificultad en la efectiva manipulación terapéutica del sistema inmunológico.

Uno de los hechos farmacológicos más sorprendentes es la *disparidad estructural* de los distintos tipos de productos clasificados específicamente como inmunomoduladores (**Wemer GF, Jolle's P.** *Immunostimulating agents: what next?. A review of their present and potential medical applications.* Eur J Biochem. 1996;242:1-19) aún dejando de lado las sustancias antiinflamatorias y los agentes citostáticos (antimitóticos).

A partir de estas consideraciones resulta clara la posibilidad de diseño de nuevos principios activos dotados de actividad farmacológica frente al sistema inmunológico a partir de algún tipo de interferencia con los procesos descontrolados de diferenciación, activación, proliferación o muerte celular programada (apoptosis).

Uno de los aspectos esenciales ya mencionados y al que la presente invención está especialmente vinculado, es la capacidad de un tipo de células inmunes, los linfocitos, de entrar en proliferación (mitosis) a través de distintos estímulos para los que dispone de receptores específicos.

De ahí que una vía de bloquear ese fenómeno proliferativo puede ser la de bloquear uno o alguno de los mecanismos de activación, sea el bloqueo de receptores específicos, a la interferencia con los transmisores de la señal hasta el núcleo celular.

En la presente invención se describe la obtención de un conjunto de sustancias capaces de interferir con distintos mecanismos de transmisión de las señales de activación en células inmunocompetentes bloqueando así procesos de proliferación celular. Esto podrá permitir el uso terapéutico de dichas sustancias en procesos acompañados de inadecuada proliferación de las células del sistema inmune. Esto supone los procesos de infiltración tisular inflamatoria con proliferación linfocitaria como las denominadas enfermedades autoinmunes y las respuestas inadecuadas a agentes infecciosos con inducción de daño tisular mediado por el sistema inmune. Incluyendo evidentemente también a los procesos linfoproliferativos malignos y benignos. La proliferación linfocitaria también participa patogenicamente en diversas enfermedades crónicas como la amiloidosis, demencia tipo Alzheimer, arteriosclerosis etc que pueden ser tributables de beneficiarse del empleo de estos agentes.

El diseño de dichas sustancias parte de la presencia del ácido 3-(4 -hidroxifenil)propionico (II) en extractos metanólicos del helecho *Asplenium onopteris* (**Hernández Silva H.** *Aportación a la fitoquímica de helechos. Síntesis y funcionalización de una nueva molécula natural bioactiva.* Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna (1996)). La similitud estructural de esta molécula con algunos antiinflamatorios no esteroideos, llevó al uso de ésta molécula como "cabeza de serie" (lead product) para su funcionalización y evaluación farmacológica.

Existen antecedentes de actividad farmacológica de lactonas, en particular actividad citostática de lactonas sesquiterpénicas (**Kupchan SM, Eakin MA, Thomas AM.** *Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones.* J Med Chem 1971; 14(12): 1147-52., 13., **Nakagawa M, Hirota A, Sakai H., Isogai A.** *Terrecyclic acid A, a new antibiotic from Aspergillus terreus. I. Taxonomy, production, and chemical and biological properties.* J Antibiot 1982; 35:778-82).

Otro antecedente lo constituyen las lactonas derivadas del kava, planta de uso en la medicina tradicional indonesia (**Lebot V, Levesque J.** *El Kava ¿un remedio contra el estrés?.* Mundo Científico 1987; 178:366-70).

Estos productos están siendo ensayados en un amplio campo de situaciones clínicas como depresiones y miorelajación, aunque recientemente se ha descrito toxicidad hepática y sanguínea para este tipo de productos (**Jappe V, Framke I, Reinhold D, Gollmick H.** *Sebotropia drug reaction resventing from kava-kava extract therapy. A new entity?.* J Am Acad Dermatology 1988; 38(1):104-6).

Los productos antiproliferativos deben, necesariamente, actuar a nivel del control del ciclo celular y por ello es necesario el conocimiento de los mecanismos bioquímicos implicados en el mismo. Esto permite (y permitirá) el diseño de inhibidores con mayor seguridad y especificidad (**Morgan DO.** *Principles of CDK regulation.* Nature 1995; 374:131-4., **Edgar BA, Lehner CA.** *Developmental control of cell cycle regulators: A fly's perspective.* Science 1996; 374:1646-52).

Se ha publicado muy recientemente el esquema de síntesis general de una "librería" de productos inhibidores de protein-quinasas con la idea de obtener efectos terapéuticos a partir de bloqueos específicos de sistemas enzimáticos responsables de la progresión del ciclo celular (**Gray N, Wodicka L, Thunnissen**

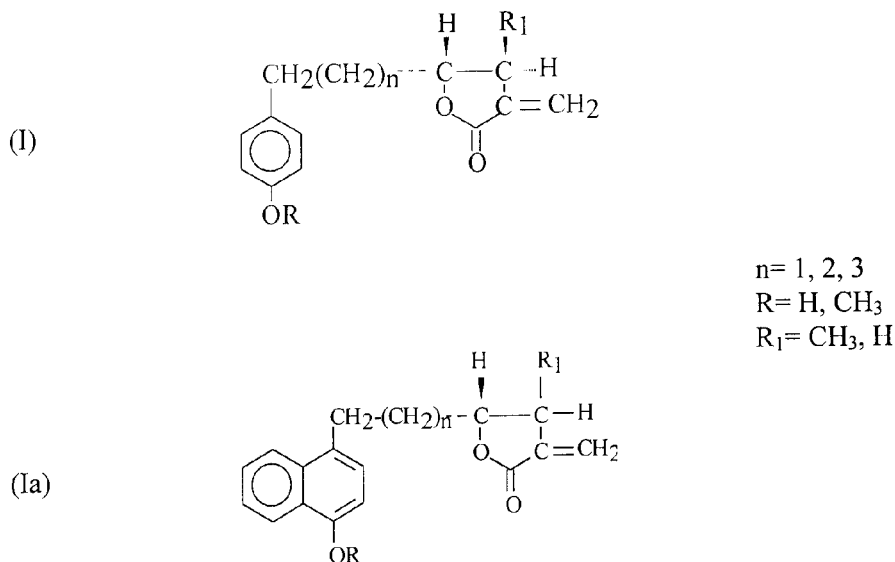
A, Norman T, Kwon S, Espinoza FH et al. *Exploiting chemical libraries, structure and genomics in the search for kinase inhibitors*. Science 1998; 281:533-8).

Se ha descrito también recientemente derivados indólicos (Garoti L, Roberti M, Rossi T, Castelli M, Malagolis M. *Synthesis and antiproliferative activity of 3-substituted 1H indole [3,2-d]-1,2,3-triazin-4(3H)-ones*. Eur J Med Chem 1993; 33:43-6.) y del ácido gálico (Serrano A, Palacios C, Roy G, Crespón C, Villar M, Nocito M et al. *Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation*. Arch Bioch Biophys 1998; 330(1):49-54.), dotados de esta actividad farmacológica, aunque a través de distintos mecanismos.

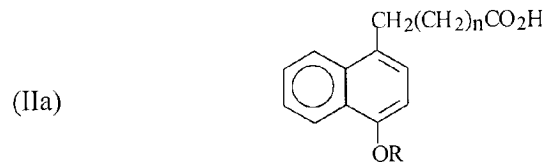
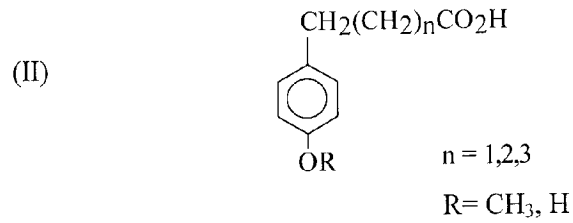
De todo lo expuesto surge claramente que el desajuste de los caminos de transducción de señales que controlan el crecimiento celular, puede llevar al desarrollo de patologías tumorales. Por consiguiente, existe la posibilidad de un diseño de fármacos dirigidos específicamente hacia el bloqueo de la transducción de señales (sean del tipo proteína-proteína o del tipo "fosforilación en cascada" (Saltiel AR, Sainyer TK. *Targeting signal trasduction in the discovery of antiproliferative drugs*. Chem and Biology 1996; 3(11):887-93.)). Se menciona finalmente, antecedentes novedosos en relación a sustancias antiproliferativas (Babit-Le-Bouteiller C, Jamme MF, David M, Silve S, Lanau C, Dhers C et al. *Antiproliferative effects of SR31747A in animal cell lines are mediated by inhibition of cholesterol biosynthesis at the sterol isomerase step*. Eur J Biochem 1998; 256:342-59., Dell CP. *Antiproliferative naphthopyrans: biological activity, mechanistic studies and therapeutic potential*. Current Medicinal Chemistry 1998; 5:179-94., Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M. *Inhibition of cell growth in cultures by quinones*. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 1998; 13(3):185-188., Zafra-Polo MC, Figadere B, Gallardo T, Tormo JR, Cortes D. *Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanism of action*. Phytochemistry 1998; 48(7): 1087-117., Cheviron N, Grillon C, Carlier MF, Wdzieczak-Bakala J. *The antiproliferative activity of the tetrapeptide acetyl-N-SerAspLysPro, an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation, is not mediated by a thymosin β 4-like effect on actin assembly*. Cell Prolif 1996; 29:437-46).

Descripción de la invención

Los compuestos de la invención tienen las siguientes estructuras químicas:



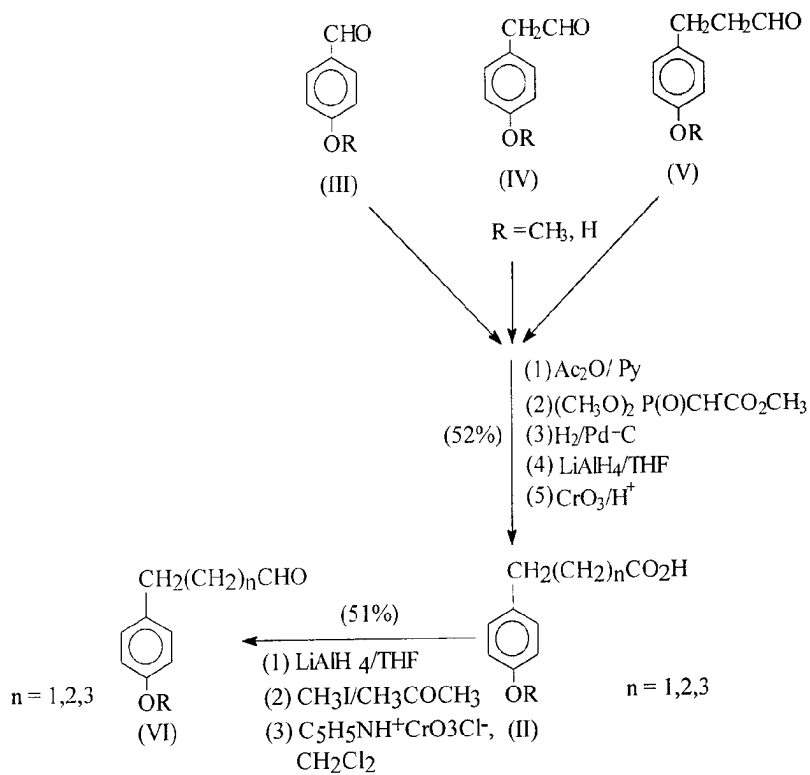
A los efectos de la descripción general de la invención, nos planteamos la síntesis del precursor (II) o del correspondiente de la serie naftil (IIa).



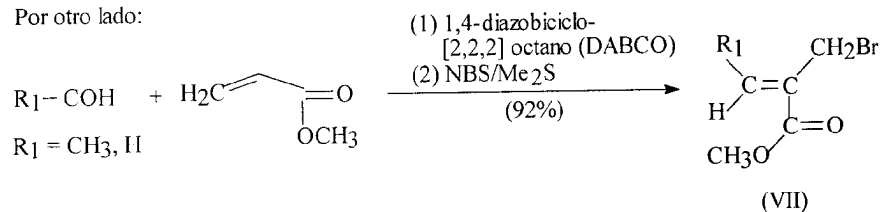
Para ello partimos de las sustancias (III),(IV) y (V) según el Esquema 1:

Esquema 1

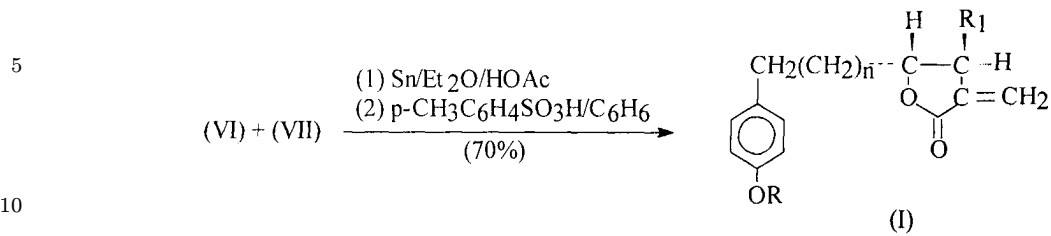
(serie bencilo)



Por otro lado:



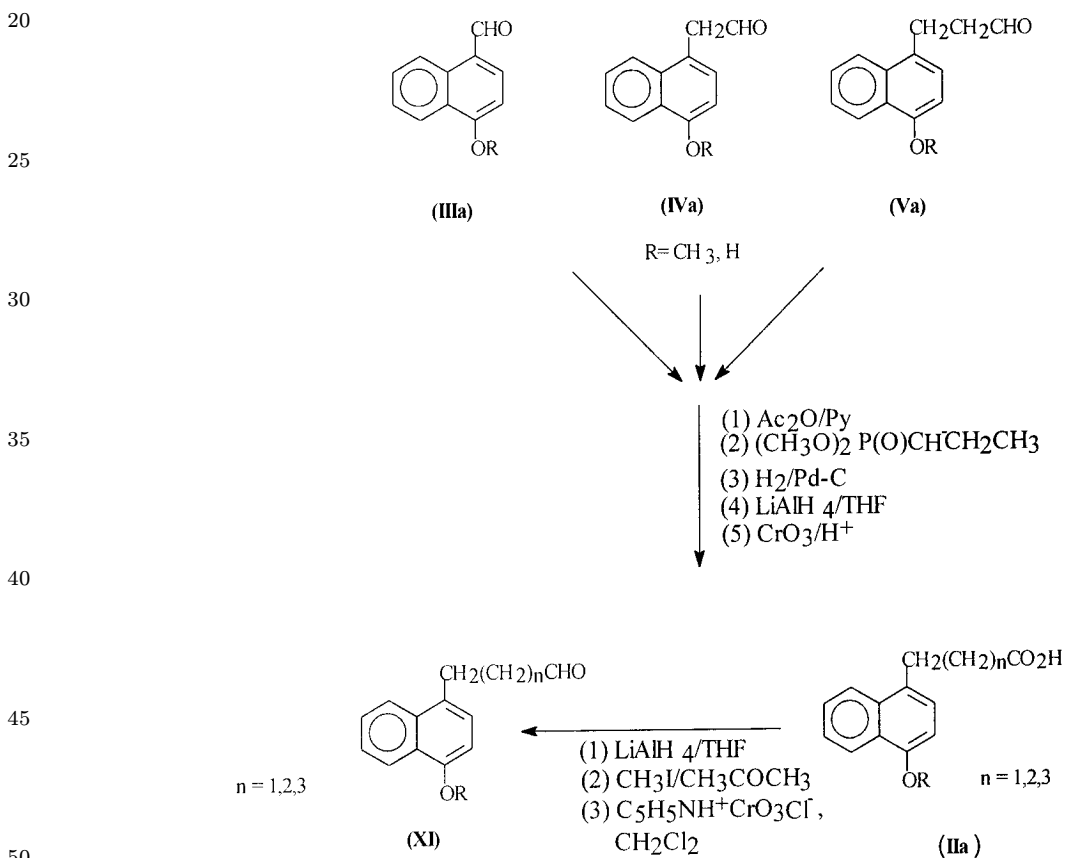
Una funcionalizada alilación de (VI) y (VII) nos proporcionó (I)



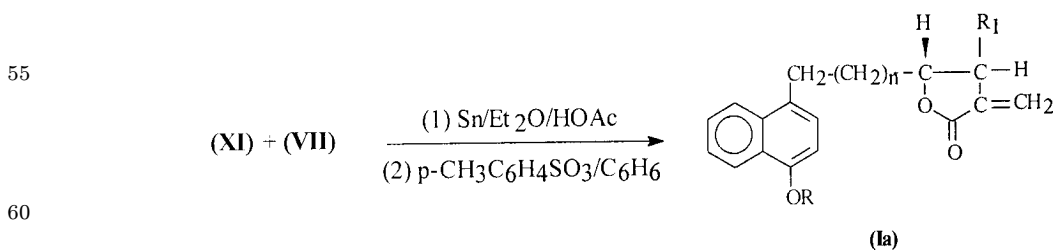
Para la serie "naftilo" ver Esquema 2:

15 Esquema 2

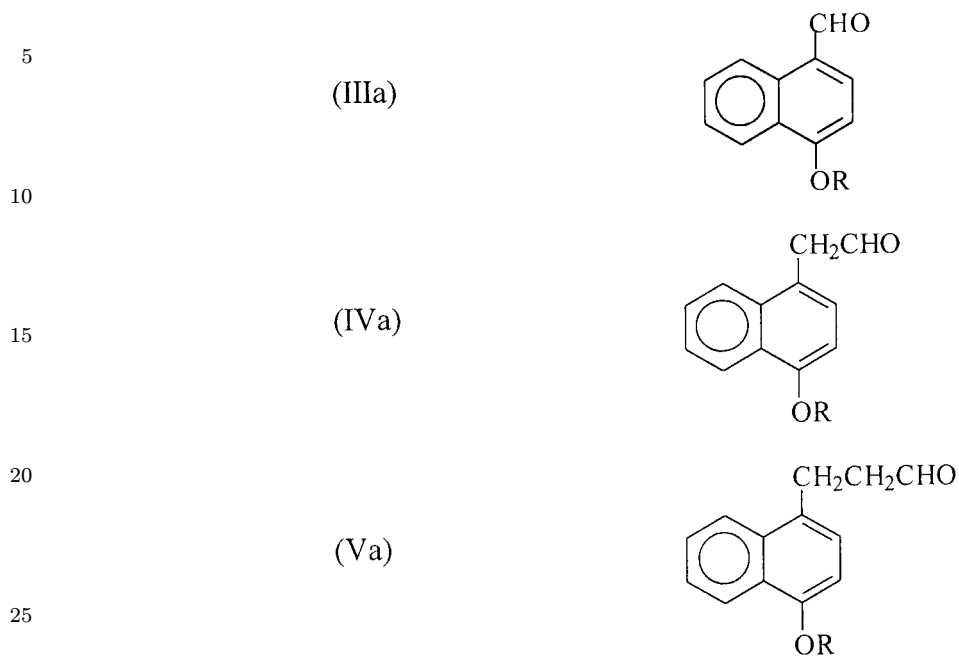
(serie naftilo)



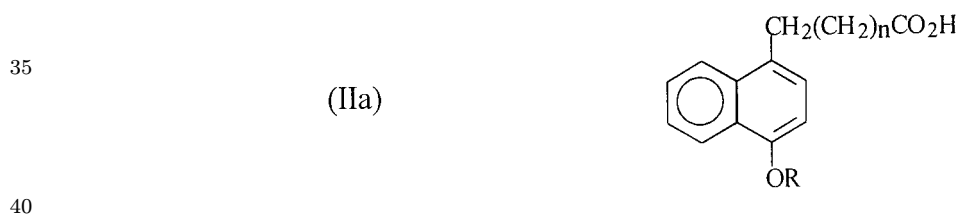
Una funcionalizada alilación de (XI) y (VII) como en el esquema 1 nos proporcionó (Ia).



Los precursores serían:



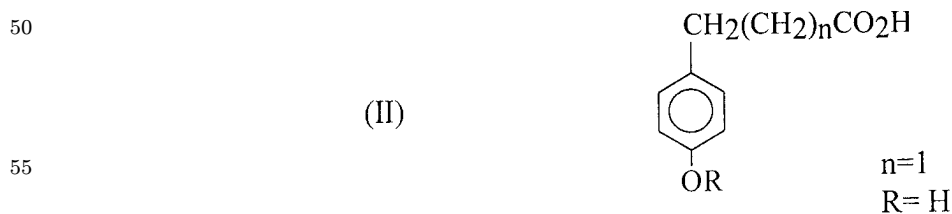
30 manteniéndose todos los pasos de síntesis del Esquema 1 hasta la obtención de los productos finales. (I), siendo el producto (IIa) el correspondiente precursor de la serie naftilo.



A continuación se describe la síntesis del producto de la invención (I) cuando $n=1$, $R=R_1=CH_3$; $n=1$, $R=CH_3$, $R_1=H$.

45 Para ello hemos preparado los compuestos siguientes:

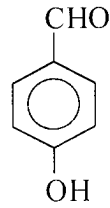
Acido 3-(4-Hidroxifenil)propiónico, correspondiéndole la siguiente fórmula estructural:



60 el cual puede prepararse del 4-hidroxibenzaldehido comercial, de fórmula:

5

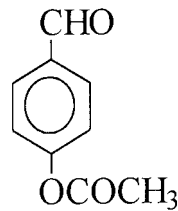
(III)



10

Para la preparación del acetil derivado de (III), de fórmula:

15



20

El aldehído (III) se trató con anhídrido acético $[(\text{CH}_3\text{-CO})_2\text{O}]$ y piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$).

25 Ejemplos de realización de la invención

La invención se explica a través de las siguientes experiencias:

30

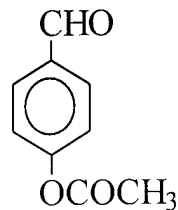
Preparación del ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico

Acetilación de 4-hidroxibenzaldehído (III)

35

6.0 g (48.18 mmoles) de (III), se disolvieron en 1 ml de piridina y se le añadieron 2 ml de anhídrido acético. La mezcla se dejó en reposo durante 24 h. a temperatura ambiente. Se vertió sobre agua (200 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). Los extractos etéreos se lavaron tres veces con 100 ml cada uno, con una solución de ácido clorhídrico diluído (0.5 N) y luego con bicarbonato sódico. Los extractos etéreos se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a vacío dando un aceite 6.3 g. (100 % de rendimiento) de 4-acetilbenzaldehído.

40



45

50

55

60

ES 2 160 093 B1

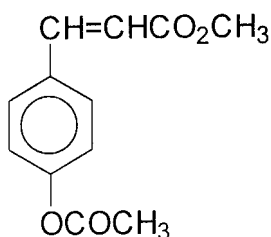
Datos espectroscópicos

5	IR ν_{macuteax} (CHCl_3) cm^{-1} :	2830, 2743, 1762, 1702, 1601, 1503, 1370, 1300, 1194, 1156, 1013, 911, 860, 830, 781, 711.
	EM m/z (int. rel.):	164 $[\text{M}]^+$ (4), 122 $[\text{M}-42]^+$ (17), 121 $[\text{M}-43]^+$ (34), 92 (20), 93 (14), 65 (100).
10	^1H RMN (δ , CDCl_3):	2.09 (s, 3H, CH_3CO), 7.05 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 9.74 (s, 1H).
	^{13}C RMN (δ , CDCl_3):	20.84 (q), 122.16 (d) (intensidad para 2CH), 131.42 (d) (intensidad para 2CH), 155.14 (s), 168.56 (s), 190.92 (s).

15 Preparación del metil éster del ácido 4-acetilcinámico

En un balón de dos bocas, conteniendo 250 ml de benceno seco, se añadieron 2 g de una suspensión de hidruro sódico (1.19 g, 49.98 mmoles) en atmósfera de argón y a 0°C . Posteriormente se añadió lentamente acetato de trimetilfosfona (8.24 ml, 49.98 mmoles). Cuando el iluro se formó, se adicionó el 4-acetilbenzaldehído (5.47 g, 33.33 mmoles). Al cabo de una hora, la reacción fue completa y se vertió sobre una disolución saturada de NaCl. Se extrajo tres veces con éter dietílico y las fases se lavaron dos veces con agua destilada. Se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, por destilación. Después de purificar en columna de gel de sílice, se obtuvieron 6.74 g (92 % de rendimiento) de un producto cristalino blanco, m.p. $61-62^\circ\text{C}$.

25



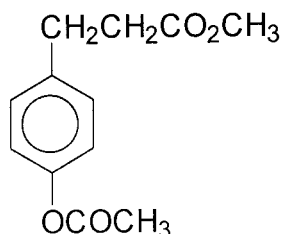
Datos espectroscópicos

40	IR ν_{macuteax} (CHCl_3) cm^{-1} :	1763, 1712, 1637, 1435, 1370, 1204, 1165, 985, 834, 791.
	EM m/z (int. rel.):	220 $[\text{M}^+]$ (9), 189 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (6), 178 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (92), 148 $[\text{M}-72]^+$ (10), 147 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$ (100), 119 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{CH}_3 + \text{COCH}_3]^+$ (22), 91 (23), 77 (5).
45	^1H RMN (δ , CDCl_3):	2.19 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 3.70 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 6.31 (d, $J=16$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.03 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=16$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$).
50	^{13}C RMN (δ , CDCl_3):	21.02 (q), 51.64 (d), 117.83 (d), 122.05 (d), 129.11 (d, intensidad para 2CH), 131.98 (s), 143.65 (d), 151.99 (s), 167.21 (s), 169.05 (s).

55 Preparación del metil éster del ácido 3-(4-acetil-fenil) propiónico

6.70 g (30.45 mmoles) de metil éster del ácido 4-acetil cinámico se disolvieron en 100 ml de acetato de etilo y se hidrogenaron usando 5 % Pd/C (1.5 g) como catalizador bajo H_2 , durante cuatro horas. Se filtró y concentró dando un aceite, 6.17 g (99.2 % de rendimiento) del metil éster del ácido 3-(4-acetilfenil) propiónico.

60



5

10

Datos espectroscópicos

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3025, 2952, 2852, 1750, 1723, 1602, 1507, 1437, 1369, 1369, 1296, 1228, 1194, 1166, 1102, 913, 849, 638.

15

EM m/z (int. rel.): 222 [M⁺] (6), 180 [M-(CHCO₂CH₃ + COCH₃)]⁺ (98), 149 [M-CH₂CO₂CH₃]⁺ (10), 107 [M-(CHCO₂CH₃ + COCH₃)]⁺ (100), 91 (5), 77 (4).

20

¹H RMN (δ , CDCl₃): 2.25 (s, 3H, COCH₃), 2.60 (t, J= 7.6 Hz, 2H), 2.29 (t, J= 7.7 Hz, 2H), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 6.98 (d, J= 8.5 Hz, 2H), 7.18 (d, J= 8.5 Hz, 2H).

25

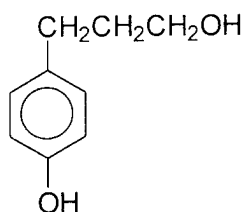
¹³C RMN (δ , CDCl₃): 20.73 (q), 29.96 (t), 35.25 (t), 121.26 (d, intensidad para 2CH), 128.96 (d, intensidad para 2CH), 138 (s), 148.99 (s), 169.56 (s), 173.13 (s).

30

Preparación de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol

A 3.82 g (17.36 mmoles) de metil éster del ácido 3-(4-acetil fenil) propiónico, se le añadieron 100 ml de tetrahidrofurano seco. A esta disolución se le adicionaron lentamente 1.80 g (47.43 mmoles) de hidruro de aluminio y litio (LiAlH₄). La mezcla de reacción se reflujoó con agitación en atmósfera de argón durante 4 horas. Al término de la reacción se le añadió cuidadosamente agua, se extrajo tres veces con éter dietílico, se secó sobre sulfato sódico anhidro y concentró a vacío, dando 1.70 g (65 % rendimiento) de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol. Por cristalización en metanol dio un sólido blanco cristalino de PF= 52-53°C.

40



45

Datos espectroscópicos

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 3338, 2924, 2853, 1612, 1514, 1460, 1376, 1240, 1037, 824.

50

EM m/z (int. rel.): 152 [M⁺] (81), 134 [M-18]⁺ (39), 121 [M-CH₂OH]⁺ (8), 108 [M-C₂H₅OH]⁺ (30), 107 [M-C₂H₅O]⁺ (100), 91 (12), 77 (7).

55

¹H RMN (δ , CDCl₃): 1.87 (m, 2H, -CH₂-), 2.65 (t, J= 7.5 Hz, aril-CH₂), 3.69 (t, J= 6.5 Hz, 2H, CH₂O), 6.76 (d, J= 8 Hz, 2H), 7.06 (d, J= 8 Hz, 2H).

60

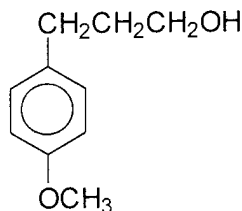
¹³C RMN (δ , CDCl₃): 29.68 (t), 62.3 (t), 115.22 (d, intensidad para 2CH), 129.45 (d, intensidad para 2CH), 133.68 (s), 153.80 (s).

ES 2 160 093 B1

Preparación del 3-(4-metoxifenil)-1-propanol

2.26 g (14.87 mmol) de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol se disolvieron en acetona seca (20 ml) y se añadió carbonato potásico (2.05 g, 14.87 mmol) seguido por yoduro de metilo (Mel) (2.11 g, 14.87 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo en baño de agua a 60-70°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se diluyó con agua y la acetona se eliminó a presión reducida. Se extrajo con éter dietílico, se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y evaporó el disolvente a vacío dando un aceite (2.35 g) (94.93% de rendimiento) de 3-(4-metoxifenil)-1-propanol.

10



15

Datos espectroscópicos

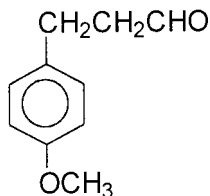
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	3360, 2937, 2832, 1604, 1578, 1515, 1460, 1260, 1034, 1030, 835.
EM m/z (int. rel.):	166 [M ⁺] (32), 148 [M-18] ⁺ (15), 135 [M-31] ⁺ (5), 121 [M-C ₂ H ₅ O] ⁺ (100), 107 [M-C ₃ H ₇ O] ⁺ (5), 91 (25).
¹ H RMN (δ , CDCl ₃):	1.89 (m, 2H, -CH ₂ -), 2.66 (t, J= 7.8 Hz, 2H, fenil-CH ₂ -), 3.67 (t, J= 6.5 Hz, -CH ₂ O), 3.80 (s, 3H, fenil-OCH ₃), 6.84 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.13 (d, J= 8.4 Hz, 2H).
¹³ C RMN (δ , CDCl ₃):	30.94 (t), 34.23 (t), 55.04 (q), 61.77 (t), 113.60 (d), 113.68 (d), 129.12 (d), 129.20 (d), 133.80 (s), 157.52 (s).

35

Preparación de 3-(4-metoxifenil)-propanal

2.34 g (14.10 mmol) de 3-(4-metoxifenil)-1-propanol fueron disueltos en 20 ml de diclorometano seco y se adicionaron lentamente a una suspensión de 4.56 g (21.15 mmol) de clorocromato de piridinium en 25 ml de diclorometano. Una vez completa la reacción, la cual fue seguida por cromatografía en capa fina, se adicionaron 3 ml de éter dietílico en porciones y se filtró sobre celita. La fase etérea se lavó tres veces con agua y se dejó secar sobre sulfato sódico anhidro durante toda la noche. El 3-(4-metoxifenil)-propanal se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente acetato de etilo: diclorometano en polaridad creciente, obteniéndose 1.20 g de un aceite (52% de rendimiento).

50



55

60

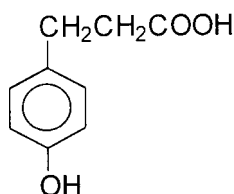
ES 2 160 093 B1

Datos espectroscópicos

	IR ν_{max} (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	2840, 2730, 1716, 1600, 1580, 1511, 1440, 1175, 1109, 1076, 814.
5	EM m/z (int. rel.):	164 [M ⁺] (23), 121 (100), 108 (30), 91 (25), 78 (20), 77 (16).
10	¹ H RMN (δ , CDCl ₃):	2.70 (t, J=7.5 Hz, 2H, -CH ₂ -), 2.91 (t, J= 7.3 Hz, 2H, fenil-CH ₂ -), 3.79 (s, 3H, fenil-OCH ₃), 6.84 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.12 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 9.60 (s, 1H, CHO).
15	¹³ C RMN (δ , CDCl ₃):	27.11 (t), 45.38 (t), 55.09 (q), 113.75 (d), 113.84 (d), 129.10 (d), 129.15 (d), 132.21 (s), 157.94 (s), 201.72 (s).

Preparación del ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico

0.79 g (5.19 mmoles) de 3-(4-hidroxifenil)-1-propanol se disolvieron en acetona (20 ml) y se le añadió gota a gota el reactivo de Jones (anhídrido crómico en ácido sulfúrico) (8 ml) hasta que persistió el color amarillo-marrón. La solución se agitó durante una hora a 0°C. El exceso de reactivo se destruyó con metanol y la solución se filtró y evaporó a presión reducida. El residuo fue extraído en acetato de etilo, secado sobre sulfato sódico anhidro y concentrado, dando un residuo impuro (0.6470 g), el cual se cromatografió sobre gel de sílice, obteniéndose 0.545 g (63.1 % de rendimiento) del ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico. Recristalización en metanol dio de PF= 121°C.



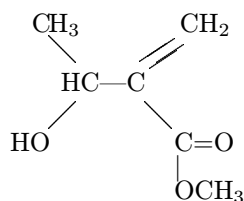
Datos espectroscópicos

40	IR ν_{max} (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	3400, 2930, 1702, 1597, 1511, 1460, 1377, 1298, 1222, 1176, 1105, 919, 928, 774, 722.
	EM m/z (int. rel.):	166 [M ⁺] (46), 107 [M-59] ⁺ (100), 91 (6), 77 (7).
45	¹ H RMN (δ , CDCl ₃):	2.53 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.80 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 6.73 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 7.06 (d, J= 8.4 Hz, 2H).
50	¹³ C RMN (δ , CDCl ₃):	30.57 (t), 36.33 (t), 115.93 (d, intensidad para 2CH), 130.03 (d, intensidad para 2CH), 132.53 (s), 156.50 (s), 174.18 (s).

Preparación del 3-hidroxi-2-metilidén-butanoato de metilo

8.8 g (0.2 ml, 11.3 moles) de acetaldehído recientemente destilado, se hicieron reaccionar con 25.83 g (27.0 ml, 0.30 moles) de acrilato de metilo y 2.5 g (0.002 moles) de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octano (DABCO). La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación, hasta que todo el acetaldehído hubo reaccionado (aproximadamente siete días). Al cabo de este tiempo se extrajo con éter dietílico (2 x 100 ml) y se lavó con agua (2 x 400 ml). Los extractos etéreos se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se concentraron a vacío, dando 23.4 g (90 % de rendimiento) de un aceite incoloro de 3-hidroxi-2-metilidén-butanoato de metilo.

ES 2 160 093 B1

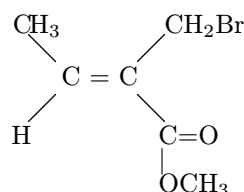


Datos espectroscópicos

10	IR $\nu_{\text{macute'ax}}$ (CHCl_3) cm^{-1} :	3446, 2976, 2855, 1716, 1629, 1438, 1282, 1196, 1163, 1094, 1041, 957, 925, 821.
	EM m/z (int. rel.):	130 $[\text{M}^+]$ (1), 115 $[\text{M}-15]^+$ (74), 112 $[\text{M}-18]^+$ (8), 99 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (25), 98 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$ (37), 71 $[\text{M}-59 (\text{CO}_2\text{CH}_3)]^+$ (32), 55 (100).
15	^1H RMN (δ , CDCl_3):	1.27 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, CH_3), 3.26 (s ancho, 1H, OH), 3.68 (s, 3H, CH_3O -), 4.55 (q, $J=6.3$ Hz, 1H, HC-OH), 5.79 (s ancho, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$ -), 6.13 (s ancho, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$ -).
20	^{13}C RMN (δ , CDCl_3):	21.75 (q), 51.69 (q), 66.63 (d), 123.87 (t), 143.60 (s), 166.91 (s).

Preparación de 2-bromometil-2-butenato de metilo

25 8.0 g (46 mmoles) de N-bromosuccinimida se disolvieron en 60 ml de diclorometano seco y se enfrió a 0°C . A la mezcla se le añadió gota a gota 4 ml (50 mmoles) de sulfuro de dimetilo disueltos en 40 ml de diclorometano. La mezcla se agitó durante 10 minutos a 0°C . Al cabo de este tiempo se le añadió lentamente 5.46 (42 mmoles) de una disolución de 3-hidroxi-2-metilidén-butanoato de metilo en 40 ml de
 30 diclorometano. La suspensión resultante se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente hasta obtener una solución transparente. A la mezcla se le añadió n-hexano (100 ml) y se vertió en un embudo de decantación que contenía 200 ml de una solución saturada de cloruro sódico y hielo. La fase orgánica se lavó con 100 ml de una solución saturada de cloruro sódico. Las fases acuosas se extrajeron con éter dietílico (2 x 100 ml), se lavaron con agua (3 x 100 ml) y secaron sobre sulfato sódico anhidro. Se
 35 concentró a vacío dando 7.45 g (92% de rendimiento) de un líquido siruposo de 2-bromometil-2-butenato de metilo.



Datos espectroscópicos

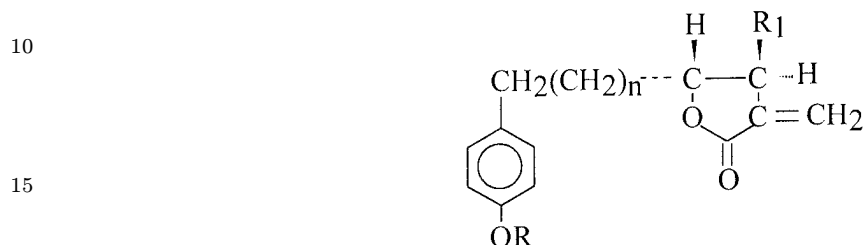
45	IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} :	1715, 1646, 1435, 1284, 1194, 1165, 1083, 1049, 876, 766.
50	EM m/z (int. rel.):	194 (5), 193 $[\text{M}^+]$ (5), 163 (7), 161 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (6), 135 (4), 133 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{CH}_3]^+$ (4), 113 $[\text{M}-\text{Br}]^+$ (95), 81 (53), 59 (97), 53 (100).
55	^1H RMN (δ , CDCl_3):	1.84 (d, $J=6.7$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{CCH}=\text{C}$), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 4.14 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Br}$), 6.97 (q, $J=7$ Hz, 1H, $\text{HC}=\text{H}$).
	^{13}C RMN (δ , CDCl_3):	14.36 (q), 23.78 (t), 51.77 (q), 129.95 (s), 143.04 (d), 165.55

Preparación del 5-[2-(4-metoxifenil-etil)-4-metil-3-metilén -dihidrofuran-2-ona (I)

60 A una suspensión de estaño metálico (1.34 g, 11.30 mmoles) en éter dietílico (22.6 ml) y agua (5.65 ml) se le añadió con agitación 2.18 g (11.30 mmoles) de 2-bromometil-2-butenato de metilo, 2.04 g (12.44

ES 2 160 093 B1

mmoles) de 3-(4-metoxifenil) propanal y cantidades catalíticas de ácido acético. La mezcla se reflujoó con agitación a 50°C durante 9 h. Al cabo de este tiempo se añadió agua y se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml), se lavó con agua y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se concentró obteniéndose 6.42 g de un producto aceitoso que, por posterior tratamiento con cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico en benceno a temperatura ambiente durante 12 h, dio 7.92 g (69.5% de rendimiento) de 5-[2-(4-metoxifenil-
 5 etil]-4-metil-3-metilen-dihidrofuran-2-ona [(I), n=1, R=H; R₁=CH₃] en forma de aceite.



Datos espectroscópicos

20

IR ν_{max} , (CHCl₃) cm⁻¹: 2938, 2837, 1736, 1663, 1611, 1513, 1456, 1246, 1178, 1124, 1034, 948, 832.

25

EM m/z (int. rel.): 246 [M⁺] (99), 147 [M-(C₅H₇O)]⁺ (98), 135 [M-(C₆H₇O₂)]⁺ (19), 134 [M-112]⁺ (29), 121 [M-(C₇H₉O₂)]⁺ (100), 107 [M-(C₈H₁₁O₂)]⁺ (14), 92 (29), 91 (84).

30

¹H RMN (δ , CDCl₃): 1.13 (d, J= 7 Hz, 3H, CH₃-), 1.74 (t, J= 7.8 Hz, 2H, CH₂), 2.67 (m, 2H, O-CH₂-), 3.17 (cuarteto deformado, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, O-OCH₃), 4.46 (cuarteto, J= 5.8 Hz, 1H, HCO), 5.57 (d, J= 2.5 Hz, 1H, =CH₂), 6.25 (d, J= 2.5 Hz, 1H, =CH₂), 6.88 (d, J= 8.6 Hz, 2H), 7.16 (d, J= 8.6 Hz, 2H).

35

¹³C RMN (δ , CDCl₃): 13.61 (q), 30.59 (t), 32.64 (t), 37.14 (d), 55.00 (q), 79.82 (d), 113.72 (d, intensidad para 2CH), 120.52 (t), 129.25 (d, intensidad para 2CH), 132.68 (s), 140.62 (s), 157.81 (s), 170.30 (s).

40

Preparación del 3-hidroxi-2-metiliden-propanoato de metilo

45 A una mezcla conteniendo 27 ml (25.83 g, 0.30 mmoles) de acrilato de metilo y 2.5 g (22.29 mmoles) de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octano (DABCO), se le añadió en corriente de nitrógeno, formaldehído (generado por pirólisis de paraformaldehído a 200°C) durante 1 h. Posteriormente la mezcla se dejó reaccionar durante 7 días a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se extrajo con éter dietílico (2 x 100 ml) y se lavó con agua (2 x 400 ml). Los extractos etéreos se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y
 50 concentró a vacío, dando 19.5 g (77% de rendimiento) de 3-hidroxi-2-metilidén -propanoato de metilo en forma de aceite.



ES 2 160 093 B1

Datos espectroscópicos

	IR $\nu_{m\acute{a}x}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	3428, 3009, 2953, 1718, 1636, 1513, 1439, 1309, 1272, 1159, 1057, 953, 819.
5	EM m/z (int. rel.):	115 [M ⁺ -1] (2), 101 [M-15] ⁺ (3), 98 [M-18] ⁺ (2), 85 [M-OCH ₃] ⁺ (89), 84 [M-CH ₃ OH] ⁺ (73), 83 [M-15-18] ⁺ (69), 61 (12), 55 (100).
10	¹ H RMN (δ , CDCl ₃):	3.68 (s, 3H, CH ₃ O), 4.22 (s, 2H, CH ₂ O), 5.78 (s, 1H, CH ₂ =C-), 6.17 (s, 1H, CH ₂ =C-).
	¹³ C RMN (δ , CDCl ₃):	51.82 (q), 61.69 (t), 125.50 (t), 139.39 (s), 166.77 (s).

Preparación del 2-bromometil-2-propenoato de metilo

15 A una solución de N-bromosuccinimida (5.17 g, 26.8 mmoles) en diclorometano seco (40 ml), se le adicionó, gota a gota, con agitación a 0°C durante 10 min, sulfuro de dimetilo (4 ml) en diclorometano (50 ml). A la mezcla resultante se le añadió el 3-hidroxi-2-metiliden-propanoato de metilo (3.15 g, 31.50 mmoles) disuelto en diclorometano (40 ml), dejándose durante 24 horas a temperatura ambiente. Al cabo
20 de este tiempo se vertió sobre una solución acuosa de cloruro sódico y hielo. Se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml), se lavó con agua y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de concentrar a vacío se obtuvo 4.33 g de un aceite amarillo (89% de rendimiento) del 2-bromometil-2-propenoato de metilo.



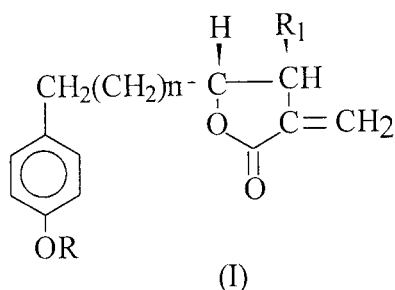
Datos espectroscópicos

35	IR $\nu_{m\acute{a}x}$ (CHCl ₃) cm ⁻¹ :	2997, 2954, 2835, 1736, 1612, 1584, 1513, 1437, 1299, 1248, 1176, 1128, 1035, 960, 825, 772.
40	EM m/z (int. rel.):	181, 179 [M ⁺] (22), 164 [M-15] ⁺ (20), 1488 [M-OCH ₃] ⁺ (5), 121 [M-CO ₂ CH ₃] ⁺ (93), 85 [M-CH ₂ Br] ⁺ (13), 61 (100).
	¹ H RMN (δ , CDCl ₃):	3.76 (s ancho, 3H, CH ₃ O), 4.07 (m, 2H, CH ₂ Br), 5.90 (s ancho, 1H, HC=C), 6.25 (s ancho, 1H, HC=C).
45	¹³ C RMN (δ , CDCl ₃):	33.95 (t), 53.59 (q), 129.19 (19 t), 137.27 (s), 168.20 (s).

Preparación del 5-[2-(4-metoxifenil)-etil]-3-metilen-dihidrofuran-2-ona

50 A una suspensión formada por estaño metálico (730 mg, 6.15 mmoles), éter dietílico (12.5 ml) y agua (3.1 ml), se le añadieron 1.10 g (6.15 mmoles) de 2-bromometil-2-propenoato de metilo y 1.11 g (6.77 mmoles) de 3-(4-metoxifenil) propanal, con cantidades catalíticas de ácido acético. La mezcla se calentó a 50°C con agitación durante 9 horas. Al cabo de este tiempo se vertió sobre agua (200 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). Se secó sobre sulfato sódico anhidro y concentró a vacío, dando un aceite
55 780 mg (70% de rendimiento) de 5-[2-(4-metoxifenil) -etil]-3-metilen-dihidrofuran-2-ona [(I), R=CH₃; R₁=H].

60

*Datos espectroscópicos*

15

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹: 2996, 2926, 2854, 1760, 1665, 1612, 1584, 1513, 1464, 1398, 1352, 1300, 1279, 1247, 1178, 1129, 1035, 983, 886.

20

EM m/z (int. rel.): 232 [M⁺] (23), 147 [M-C₄H₅O₂]⁺ (31), 135 [M-C₅H₅O₂]⁺ (6), 121 [M-C₆H₇O₂]⁺ (100), 91 (27), 77 (27), 65 (13).

25

¹H RMN (δ , CDCl₃): 1,96 (m, 2H, CH₂), 2,70 (,2H, -CH₂), 3,78 (s, 3H, O-OCH₃), 4,8 (m, 1H, -CH₂O-), 5,62 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 6,22 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 6,83 (d, J= 8.5 Hz, 2H), 7,11 (d, J= 8.5 Hz, 2H).

30

¹³C RMN (δ , CDCl₃): 33.23 (t), 33.35 (t), 38.13 (t), 55.10 (q), 76.40 (d), 113.61 (d, intensidad para 2CH), 121 (t), 129.23 (d, intensidad para 2CH), 132.48 (s), 157.89 (s), 170.18 (s).

Actividad biológica

35 Se describe actividades biológicas del producto descrito en el ejemplo 1 (en adelante "lactona").

*Proliferación de esplenocitos murinos. Material y métodos**Ensayo de proliferación linfocitaria*

40

*Materiales**Procesamiento del bazo*

- 45
- Pinzas curvas finas
 - Pinzas separadoras
 - Placas Petri de plástico de 60 x 15 mm (FLOW)
- 50
- Pipetas de 5 ml
 - Tubos plástico de centrifuga de 10 ml
 - Soporte de caucho para disección
- 55
- Solución de Hank's balanceada (HBSS) (FLOW)
 - Pinzas planas anchas
 - Tijeras finas
- 60
- Malla metálica de entramado fino
 - Pipetas Pasteur

ES 2 160 093 B1

- Papel de filtro
- Etanol al 70%.

Ensayo

5

- Medio de cultivo: DMEM + penicilina 50 U/ml + estreptomicina 50 μ g/ml + glutamina 2 mM + 10% de suero de ternera fetal (medio completo) (FLOW).
- 2 Mercaptoetanol (2ME) (Sigma).

10

- Mitógenos controles: Concanavalina A (Con A) (SIGMA)
Fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA)
Pokeweed (PWM) (SIGMA)
Lipopolisacárido 055:B5 (LPS) (SIGMA)

15

- Azul tripán
- Placas de 96 pocillos con fondo plano (FLOW)

20

- Puntas de pipeta (NUNC)
- Timidina tritiada (AMERSHAM)
- Filtros de papel wathman (Titerted/Skatron)

25

Aparatos

- Centrífuga refrigerada (BECKMAN)
- Contador de centelleo líquido LKB 1211 Rack-beta

30

- Microscopio óptico
- Harvester Skatron

Animales

35

Se utilizan ratones Balb/c, machos, de 6-8 semanas de edad (IFFA-CREDO).

Método

40

Procesamiento del bazo

- El bazo se extrae en condiciones estériles.
- Se lava con 5 ml de HBSS en una placa Petri.
- Se coloca el bazo sobre la malla metálica.
- Se disgrega con ayuda de unas pinzas anchas.
- Se lava la malla con 5 ml de HBSS y se recoge en placa Petri.
- Se recoge el macerado tisular con una pipeta Pasteur y se lleva a un tubo de centrifuga estéril de 10 ml.
- Se lava en 10 ml de HBSS dos veces, centrifugando a 1.200 r.p.m.
- Se resuspende en 11 ml de HBSS.
- Se deja reposar 5 minutos.
- Se trasvasan 10,5 ml a otro tubo de centrifuga de 10 ml.

60

ES 2 160 093 B1

- Se realiza un recuento de variables con azul de tripán.
- Se centrifuga la suspensión celular a 1.200 r.p.m.
- El "pellet" celular se resuspenden en medio completo a una concentración de 4×10^6 células/ml.

Ensayo

- En un placa de 96 pocillos de fondo plano se realizan diluciones seriadas de la muestra problema mitógeno con o sin "lactona" en un volumen de $10 \mu\text{l}$ en medio completo al que se ha añadido 5×10^5 M 2ME. todas las determinaciones se hacen por triplicado.
- A continuación se añaden $100 \mu\text{l}$ de la suspensión celular, quedando un volumen final de $200 \mu\text{l}$.
- La placa se incuba en estufa a 37°C , 5% CO_2 durante 66 h.
- Pasado este tiempo de incubación, a cada pocillo se le añade $1 \mu\text{Ci}$ de timidina tritiada.
- Se incuba de nuevo la placa durante 6 h.
- Pasado este nuevo período de incubación se procesa la placa en un Harvester Skatron, utilizando un filtro de papel Wathman especial para ello.
- El filtro se seca al aire.
- Se reparten los filtros en tubos de contador β , a los que se añaden 2 ml de líquido de centelleo.
- Cada tubo se introduce en un vial de 12 ml.
- Las cpm se determinan en un contador de centelleo líquido.

Controles

- Control negativo: células en presencia de medio de cultivo completo.
- Control positivo: células en presencia de algún mitógeno.

Resultados

Se expresan como:

(1) Media aritmética de cpm \pm desviación estándar

(2) Índice de estimulación = $\frac{\text{media cpm muestra}}{\text{media cpm control medio}}$

La significación estadística se determina por el método de la t de student.

Ensayos sobre células murinas. Resultados

Se estudia en primer lugar el efecto de "lactona" *per se* en relación a posibles efectos proliferativos sobre esplenocitos murinos, no encontrándose ningún efecto en el rango $100-0,75 \mu\text{g/ml}$ (la muestra se disolvió en DMSO a $40,0 \text{ mg/ml}$). Tampoco se observaron efectos de citotoxicidad en los rangos indicados.

TABLA 1

Respuesta proliferativa de esplenocitos murinos tras 72 h de incubación

Proliferación de esplenocitos murinos Mitógeno (cpm \pm DS)				
Lactona $\mu\text{g/ml}$	Con A 2.5 $\mu\text{g/ml}$	PHA 50 $\mu\text{g/ml}$	a CD3 20 $\mu\text{g/ml}$	LPS 10 $\mu\text{g/ml}$
100	147 \pm 10	19.500 \pm 2.000	285 \pm 20	614 \pm 35
50	190 \pm 10	19.000 \pm 1.800	1.235 \pm 200	2.700 \pm 120
25	244 \pm 15	21.000 \pm 2.000	5.600 \pm 300	3.200 \pm 400
12	370 \pm 20			
6	78.200 \pm 725			
3	92.600 \pm 100			
1.5	150.400 \pm 12.500			
0.75	131.523 \pm 10.000			
0	150.000 \pm 15.000	20.000 \pm 2.000	40.000 \pm 4.000	30.000 \pm 1.600

Sin embargo, la lactona demostró claramente su capacidad para inhibir la proliferación inducida por distintos agentes mitogénicos: ConA, antiCD₃ y LPS, pero no la inducida por PHA.

Los resultados se resumen en las siguientes tablas (se indican las cpm tras un pulso de timidina tritiada. Las muestras de esplenocitos se cultivaron durante 72 h en presencia de mitógeno y de lactona a las concentraciones indicadas).

Los resultados indican la capacidad de lactona por inhibir de manera específica algunas señales de actuación y no otra, lo que, en los estudio efectuados sobre esplenocitos murinos se ve cómo la actuación indicada por la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) no es inhibida.

Ensayos sobre células monocucleares humanas de sangre periférica. Material y métodos

Con el fin de profundizar en los efectos de la lactona sobre la proliferación celular, comprobarnos si los efectos descritos en el apartado anterior sobre células de origen murino eran específicos del tipo celular y la especie o por el contrario, estos efectos eran xeno-independientes. Para ello purificamos células mononucleares humanas de sangre periférica de controles sanos y procedimos a estudiar los posibles efectos de inhibición sobre la actividad proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas inducida por distintos agentes mitogénicos actuando sola y/o en coestimulación con otros mitógenos y en presencia o ausencia de interleucina 2 recombinante humana (rhIL-2).

Ensayo de proliferación linfocitaria

Materiales

Aparatos

- Bomba de aire para pipeteo, Pipetus (Flow Lab., Alemania).
- Cámara de contaje Neubauer (Saaringia, Alemania).
- Cámara de flujo laminar vertical Gelaire TC 48 (Flows labs., Alemania).
- Centrífuga refrigerada GPR (Beckman, Reino Unido).
- Colector de cultivos SKATRON AS (Flow Lab. Lierbayen, Noruega).
- Congelador de -30°C (Selecta, Tarrasa, España).
- Congelador de -70°C (Selecta, Tarrasa, España).
- Contador beta. Betamatic (Kontron).

ES 2 160 093 B1

- Eppendorf multipipeta 4780 (Hamburgo, Alemania).
- Estufa de cultivo de CO₂ Napco digital 6100 (National Appliance Co., Portland, EEUU).
- Filtros estériles de 22 μ m Millex-GS (Millipore, Molsheim, Francia).
- Microscopio Olympus CHS-2 (Olympus, Tokyo, Japón).
- Pipetas de cristal de 1, 5 y 10 ml, estériles.
- Pipetas de volumen ajustable Piptman P de 20, 200, 1000 y 5000 μ l (Gilson, Francia).
- Placas estériles de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA., USA).
- Portaobjetos y cubreobjetos de cristal (Hirschman, Alemania).
- Puntas de propileno virgen, estériles (Daslab, Madrid, España).
- Puntas estériles Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- Tubos de plástico de 5, 10, 15 y 50 ml estériles (Daslab, Madrid, España).
- Tubos no estériles de plástico de 3 ml (Indubages, S.A., Manresa, España).

Ensayo

- Azul Tripán (Flucke AG., Buchs SG., Alemania).
- Heparina Leo (Lab. Leo, Madrid, España).
- Lymphoprep (Ficoll-Hypaque) (Nyegaard Co, Oslo, Noruega).
- Suero salino fisiológico (SSF) Apiroserum clorurado simple (Ibys, Madrid, España).
- Solución de centelleo Opticint “hisafe” (FSA, Leics, Reino Unido).
- Suero bovino fetal (FCS) (Gibco, Grand Island, NY, EEUU).
- Tritio metil-³H timidina. Actividad específica 1 μ Ci/ml. (Amersham inter., Reino Unido).
- Mitógenos: Fitohemaglutinina M (PHA) (Difco Lab., Detroit, Mi., EEUU), Concanavalina A (Con A, 2 μ g/ml, Sigma Chemical Co., MI, USA), Anti-CD3 inmovilizado (OKT3, 5 μ g/ml, Ortho-mune, Orthodiagnostic System) y rIL-2 (100 IU/ml, Hoffinan-La Roche, NJ, USA).

Todos los reactivos, incluidos en estos ensayos fueron diluidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Walkersville, USA) suplementado con un 10% de suero bovino fetal descomplementado (Biochrom KG, Berlin), L-glutamina (2 mM, Biochrom KG), Hepes (25 mM, Biochrom KG) y antibiótico (1% penicilina estreptomicina, Difco Lab, Detroit, MI, USA).

Así mismo, todos los mitógenos fueron optimizados de forma dosis respuesta para la obtención de la máxima respuesta proliferativa tras 5 días de cultivo.

Método

Procesamiento de las muestras

Sangre venosa: Las CMSP fueron obtenidas a partir de sangre venosa extraída por punción venosa antecubital. Se extrajeron 50 ml de sangre a los que se añadieron 50 U de heparina cálcica y se diluyeron 1/1 (vol/vol) con SSF.

Células mononucleadas humanas: Para el aislamiento de las CMSP se procedió a su separación del resto de los componentes de la sangre mediante la formación de un gradiente de densidad sobre Ficoll. Las células así obtenidas se resuspenden en SSF y se centrifugan a 400 x g durante 10 minutos (proceso de lavado) y se resuspenden en SSF. Esta operación se repite tres veces. En la última de ellas se sustituye el SSF por medio completo.

En todas las suspensiones celulares se determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán al 0.1% y recuento con microscopio en cámara de Neubauer. El porcentaje de

ES 2 160 093 B1

células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante.

Condiciones generales de cultivo: Todos los cultivos celulares se desarrollaron en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical, empleando materiales estériles de un único uso o esterilizados en autoclave o con óxido de etileno. Los cultivos se conservaron en una estufa que mantenía una temperatura de 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. En los diversos experimentos realizados las preparaciones celulares CMSP purificadas se incubaron en placas estériles de 96 pocillos a concentraciones de 5 x 10⁴ células/pocillo (200 µl) en presencia de diferentes concentraciones de distintos mitógenos y durante 5 días.

Ensayo

El método empleado para cuantificar la proliferación celular fue el análisis de la incorporación de ³H-timidina (³H-T) al DNA sintetizado *de novo*, detectándose la emisión de radiación β de los extractos secos de los cultivos celulares a los que se había añadido la base tritiada antes de su finalización y recogida. La síntesis de DNA se realizó por triplicado en placas estériles de 96 pocillos de fondo plano.

De 20 a 24 horas antes de terminar el cultivo celular se añadió al medio 1 µCi de ³H-T a cada pocillo; los cultivos se recogieron por aspiración a través de un filtro de vidrio, utilizando para ello un colector de cultivos Skatron.

La síntesis de DNA se ha expresado en cuentas por minuto (cpm). Cada ensayo se realiza por triplicado, desechando aquellos datos que tengan una variabilidad mayor de un 10% de la media del triplicado, ya que podrían indicar un error técnico o una contaminación en el cultivo. Los cultivos se llevaron a cabo con un volumen de células constante por pocillo, así como con un volumen constante de 200 µl.

Controles

Control negativo: células en presencia de medio completo de cultivo.

Control positivo: estimulación de las células sin la presencia de lactona.

Ensayos sobre células mononucleares humanas de sangre periférica. Resultados

Se estudia el efecto de inhibición sobre la actividad mitogénica en linfocitos humanos, inducida por distintos agentes mitogénicos y de activación celular, actuando solos y/o en combinación (Tabla 2).

La respuesta blastogénica espontánea de las CMSP disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0,66 µg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por fitohemaglutinina M (PHA) disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0.25 µg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por Conavalina A (Con A) disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0.5 µg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por anti-CD3 inmovilizado (aCD3), disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0.06 µg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por aCD3 + PHA disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0.24 µg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por aCD3 + Con A disminuye en un 50% si al cultivo se adicionan 0.21 µg/ml de lactona.

TABLA 2

Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica

Proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica Mitógenos (cpn ± DS)						
Lactona μg/ml	Medio	PHA 10 μg/ml	Con A 2 μg/ml	aCD3 5 μg/ml	aCD3 + PHA	aCD3 + Con A
100	104 ± 26	1086 ± 308	204 ± 43	39 ± 10	13 ± 4	8 ± 6
10	72 ± 72	71 ± 14	48 ± 7	119 ± 7	23 ± 7	11 ± 1
1	1805 ± 1870	25118 ± 6642	13294 ± 3395	1286 ± 255	8689 ± 5361	829 ± 484
0.01	2867 ± 1527	71092 ± 3555	55503 ± 9023	40378 ± 219	67011 ± 8270	93139 ± 3070
0.0001	3175 ± 1574	76612 ± 15020	75329 ± 9144	44721 ± 4082	105395 ± 375	115090 ± 4133
0	2064 ± 39	77189 ± 686	73639 ± 9993	34088 ± 9498	95158 ± 7752	87804 ± 14148

A continuación, se estudia el efecto de inhibición sobre la actividad mitogénica en linfocitos humanos, inducida por distintos agentes mitogénicos y de activación celular, actuado solos y/o en combinación tras la adición de interleucina 2 exógena (Tabla 3).

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.26 μg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por PHA + rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.29 μg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por Con A + rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.27 μg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por aCD3 inmovilizado + rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.24 μg/ml de lactona.

La respuesta blastogénica inducida en CMSP por aCD3 inmovilizado + PHA + rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.26 μg/ml de lactona.

La respuestas blastogénica inducida en CMSP por aCD3 inmovilizado + Con A + rhIL-2 disminuye en un 50 % si al cultivo se adicionan 0.25 μg/ml de lactona.

TABLA 3

Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica en presencia de rhIL-2

Proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica Mitógenos en presencia de rhIL-2 (100 UI/ml) (cpm ± DS)						
Lactona μg/ml	Medio	PHA 10 μg/ml	Con A 2 μg/ml	aCD3 5 μg/ml	aCD3 + PHA	aCD3 + Con A
100	918 ± 1	892 ± 199	532 ± 109	400 ± 44	286 ± 10	237 ± 109
10	866 ± 66	579 ± 1033	611 ± 75	489 ± 25	304 ± 35	164 ± 65
1	9548 ± 808	110507 ± 698	71210 ± 5211	36280 ± 77	88220 ± 3174	66429 ± 9241
0.01	42568 ± 8631	106754 ± 698	54196 ± 80	39771 ± 3258	94165 ± 15647	130949 ± 16623
0.0001	56451 ± 4965	130524 ± 8929	96972 ± 18274	87091 ± 7078	133621 ± 12440	154981 ± 15723
0	45902 ± 7074	123500 ± 3682	118716 ± 4052	112214 ± 15621	147591 ± 16848	146999 ± 12727

TABLA 4

Control metodológico sobre el efecto observado de la lactona ante diferentes mitógenos

Proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica Mitógenos (cpm \pm DS)			
Lactona $\mu\text{g/ml}$	Medio	PHA 10 $\mu\text{g/ml}$	PHA + rhIL-2
100	47 \pm 5	906 \pm 251	341 \pm 21
0.25	283 \pm 9	60428 \pm 5820	144693 \pm 9470
0	318 \pm 37	113032 \pm 1649	158221 \pm 6856

Estudios de estabilidad

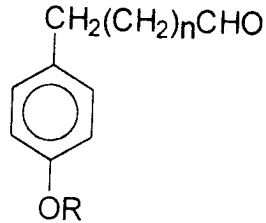
Por último, analizamos la estabilidad en el tiempo del producto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) mediante nuevos experimentos en los que de nuevo, se muestra la actividad biológica antiproliferativa de la lactona (Tabla 4).

La muestra permaneció durante 1 año, a temperatura ambiente y en una concentración de 40,0 mg/ml en DMSO.

REIVINDICACIONES

1. Derivados del compuesto,

5



10

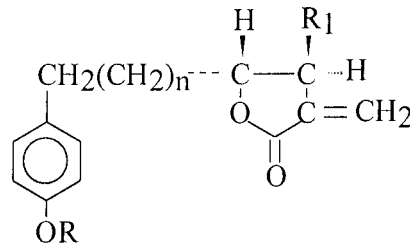
(VI)

15

n=1,2,3
R= CH₃,H

20 **caracterizados** por tener dichos derivados la siguiente formula general:

25



(I)

30

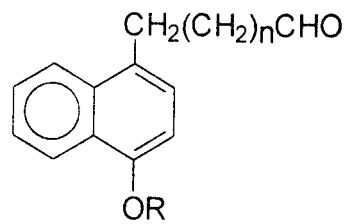
donde n puede tomar los valores 1, 2, 3; R puede ser H ó CH₃ y R₁ puede ser CH₃ ó H.

35

2. Compuestos según reivindicación 1 que presenten cualquiera de las combinaciones posibles entre los distintos valores de n y las estructuras correspondientes a los radicales R y R₁.

3. Derivados del compuesto,

40



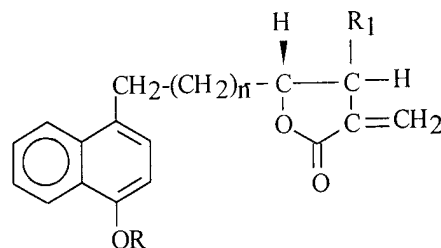
45

(XI)

50

caracterizados por tener dichos derivados la siguiente fórmula general:

55



(Ia)

60

ES 2 160 093 B1

donde n puede tomar los valores 1, 2, 3; R puede ser H ó CH₃ y R₁ puede ser CH₃ ó H.

4. Compuestos según reivindicación 3 que presenten cualquiera de las combinaciones posibles entre los diferentes valores de n y las estructuras correspondientes a los radicales R y R₁.

5

5. Compuestos según reivindicaciones 1 y 3 con actividad farmacológica y su aplicación en medicina para el tratamiento de desórdenes del sistema inmunológico.

6. Compuestos según reivindicaciones 1 y 3 y su aplicación en farmacia para su uso en la preparación de formas galénicas usuales incluyéndose en las mismas los compuestos originales y las prodrogas posibles tales como esteres, glicosidos, etc.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07D 307/58, A61K 31/365, A61P 37/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OGMUNDSDOTTIR, H.M. et al. Antiproliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-Lipoxygenase on malignant cell-lines and mitogen-stimulated lymphocytes. J. Pharm. Pharmacol., 1998, Vol. 50, n° 1, páginas 107-115, ISSN 0022-3573	1-6
A	HOWIE, G.A. et al. Potential antitumor agents. Synthesis of bifunctional alpha-methylene gamma-butyrolactones. J. Med. Chem., 1976, Vol. 19, n° 2, páginas 309-313.	1-6
A	NAKAGAWA, M. et al. Terrecyclic acid A, a new antibiotic from Aspergillus Terreus. I. Taxonomy, production, and chemical and biological properties. J. Antibiotic, 1982, Vol. 35, páginas 778-782.	1-6
A	KUPCHAN, S.M. et al. Tumor inhibitors. 69. Structure cytotoxicity relationships among the sesquiterpenes lactones. J. Med. Chem., 1971, Vol. 14, n° 12, páginas 1147-1152.	1-6

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°:

Fecha de realización del informe

13.06.2001

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/1