



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 260**

51 Int. Cl.:
C07D 407/14 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03709465 .3**
96 Fecha de presentación : **25.03.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1487825**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de derivados sintéticos de los lignanos dibencilbutirolactónicos que presentan propiedades antichagas.**

30 Prioridad: **25.03.2002 BR 0201237**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2011

73 Titular/es: **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**
Rua Pio XI, 1500
CEP 05468-901 Alto da Lapa, São Paulo, BR

72 Inventor/es: **Silva, Márcio, Luis, Andrade;**
Albuquerque, Sérgio;
Souza, Gustavo, Henrique, Bianco;
Bastos, Jairo Kenupp y
Silva, Rosângela

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 362 260 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a procedimientos para obtener derivados semisintéticos de la cubebina, especialmente hinoquinina y 6,6'-dinitrohinoquinina, que se utilizan para preparar fármacos destinados a proporcionar una actividad por lo menos cinco veces superior a la observada para la violeta de genciana y para otros compuestos utilizados hasta el momento para el tratamiento sanguíneo y la profilaxis de la enfermedad de Chagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La utilización de plantas medicinales con fines terapéuticos se remonta al inicio de la civilización, en función de las necesidades humanas, cuando se inició un largo camino de manipulación, adaptación y modificación de los recursos naturales para su propio beneficio. Todavía en la actualidad, una gran parte de la población, especialmente personas de bajos ingresos, utiliza este antiguo arte como el recurso principal para el mantenimiento y el alivio de enfermedades.

15 En este contexto, la etnofarmacología actúa como herramienta muy importante en el estudio y la investigación de nuevos fármacos de origen vegetal, debido a que la diversidad molecular del reino vegetal todavía se considera ilimitada, a pesar de los avances científicos. Además, debido a que los productos procedentes de dichos organismos son muy similares a los del metabolismo de los mamíferos, estos productos naturales con frecuencia muestran diversas propiedades biológicas por la posible acción sobre receptores en el interior del organismo de los mamíferos.

20 Con los avances tecnológicos, algunos estudios más exhaustivos han demostrado a los investigadores y a la industria farmacéutica que resulta necesario sintetizar sustancias bioactivas, con productos naturales como sus materias primas. Se han utilizado numerosas clases de diferentes productos naturales para sintetizar nuevos fármacos. A título de ejemplo, existen derivados de terpeno utilizados como materias primas para la síntesis de artemisina, un derivado de sesquiterpeno con importantes actividades antipalúdicas. La clase de los lignanos, en la que se incluye la cubebina, se considera muy importante debido a que, aparte de las actividades ya mencionadas, presenta actividades antitumorales y antiviricas. En un estudio de Yang de 1996, se evaluó la actividad anti-VIH *in vitro* de lignanos aislados de la especie *Trachelospermum gracilipes* (*Apocynaceae*), y los resultados han demostrado que la replicación vírica resultaba inhibida en las células H9 infectadas.

25 La enfermedad de Chagas fue definida en el continente americano en 1909. El agente causante de la enfermedad es *Trypanosoma cruzi* y afecta a más de 18 millones de personas en este continente, provocando aproximadamente 400.000 muertes cada año. En Brasil, un estudio realizado en la ciudad de Londrina (Parana) en 1995 presentó una estadística que mostraba que 834 niños de 7 a 14 años de edad mostraba serología positiva para la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, todavía resulta necesario investigar para identificar agentes que muestren actividad tripanocida. En el continente americano, la incidencia de la infección humana por *T. cruzi* se estima en 16 a 18 millones de casos. Sin embargo, 90 millones más, es decir, 25% de la población del continente, presentan riesgo de resultar infectados. Entre los 211 millones de habitantes en la parte sur del continente americano, 11 millones de personas se encuentran infectadas y aproximadamente 54 millones presentan un riesgo de infección, representando de esta manera el 31% de la población. Según la Organización Mundial de la Salud, cada año mueren más de 50.000 personas debido a la enfermedad de Chagas.

30 Un estudio con personas de más de 74 años de edad en la región de Ribeirao Preto, estado de Sao Paulo, ha dado a conocer que 13% de las enfermedades cardíacas son una consecuencia de la "enfermedad de Chagas".

40 La solución principal para evitar la enfermedad consiste todavía en combatir la triatomina, mientras que la contaminación por transfusión sanguínea puede evitarse mediante el ensayo serológico del donante o mediante la adición de violeta de genciana a la sangre infectada.

45 Una importante revisión de los principios activos naturales que presentaban actividad tripanocida fue publicado en 1996. En esta revisión bibliográfica se incluyen diversas clases de metabolitos secundarios, pero no se incluye ningún metabolito de entre los lignanos. Sin embargo, un documento publicado recientemente por el grupo de los presentes inventores, titulado "Evaluation of the Trypanocidal Activity of Lignans Isolated from the Leaves of *Zanthoxylum naranjillo*", de Basto, Albuquerque y Silva, en *Planta Medica* 65:541-544, 1999, ha observado que diversos lignanos dibencilbutirolactónicos muestran actividad tripanocida significativa, resultando la evaluación de los derivados de la cubebina prometedora contra la enfermedad de Chagas.

50 Durante la investigación realizada, se descubrió que los lignanos aislados a partir de *Zanthoxylum naranjillo*, tales como el metilpluviatólido y la cubebina, así como los derivados semisintéticos hinoquinina, o-acetil-cubebina, o-metil-cubebina, 6,6'-dinitrohinoquinina yo-dimetiletilamina-cubebina, presentan actividad antiChagas.

Respecto a la cubebina, sólo se ha encontrado una patente relacionada con la actividad profiláctica y terapéutica en enfermedades renales (patente JP nº 01180824-A; clasificación internacional: A61K-031/36, C07D-407/14), de 18 de julio de 1989.

SUMARIO DE LA INVENCION

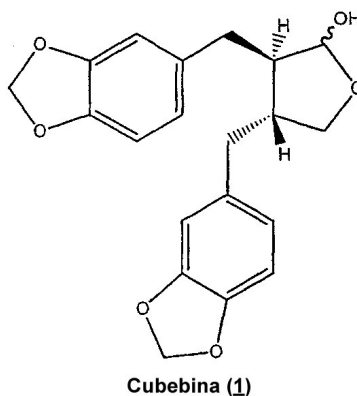
5 Según la exposición anterior, el objetivo de la invención tal como se propone en la presente memoria consiste en obtener los derivados semisintéticos cubebina, hinoquinina y 6,6'-dinitrohinoquinina, por medio de procedimientos descritos en la presente memoria, que se utilizarán para la preparación de fármacos que proporcionan una actividad por lo menos cinco veces más elevada que la observada con la violeta de genciana y otros compuestos utilizados hasta el momento presente para el tratamiento sanguíneo y la profilaxis de la enfermedad de Chagas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

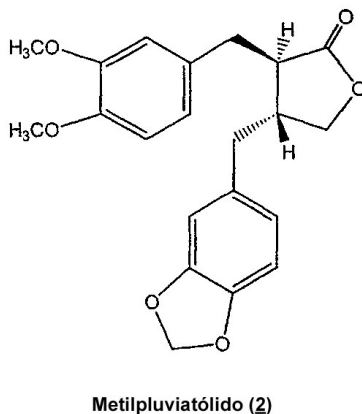
La figura 1 representa un diagrama de flujo del procedimiento para obtener lignanos a partir de *Zanthoxylum naranjillo* y *Piper cubeba*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Tal como se puede observar a partir de la figura 1, el procedimiento para obtener cubebina (1), lignano, con la fórmula estructural:



y el metilpluviatólido de lignano (2) con la fórmula estructural:



15 a partir de *Zanthoxylum naranjillo* incluye las etapas siguientes:

a) recolección y secado al horno de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* a una temperatura de entre 35°C y 55°C,

b) trituración de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* en un triturador de cuchillas,

20 c) maceración de los polvos obtenidos a partir de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* y extracción exhaustiva con hexano a 25°C durante aproximadamente cinco días,

d) preparación del extracto grueso mediante filtración del producto de maceración y concentración del mismo bajo presión reducida a la temperatura de 30°C hasta la eliminación completa del solvente,

25 e) purificación repetida del extracto grueso obtenido a partir de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* en una columna cromatográfica de gel de sílice y elución con un sistema de solventes partiendo de hexano, AcOEt (AcOEt) y etanol en proporciones crecientes, suministrando 210 partes cromatográficas de 500 ml cada una,

f) obtención y aislamiento de cubebina (1) y metilpluviatólido (2) a partir de las partes cromatográficas mediante cristalización (hexano/acetona (Me_2CO , 4:1) o cromatografía preparativa en capa fina (hexano/ Me_2CO , 4:1),

g) identificación realizada mediante análisis de datos de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C , $[\alpha]_D$, masa, IV.

5 Este procedimiento ha permitido obtener cubebina (1) y metilpluviatólido (2).

De manera similar, el procedimiento para obtener cubebina a partir de *Piper cubeba*, cuyo diagrama de flujo también se ha representado mediante la figura 1, incluye las etapas siguientes:

a) trituración de semillas de *Piper cubeba* en un triturador de cuchillas,

10 b) maceración de los polvos obtenidos a partir de semillas de *Piper cubeba* y extracción exhaustiva con etanol al 90% durante ciclos de 72 horas,

c) preparación del extracto grueso mediante la filtración del producto de maceración y concentración bajo presión reducida a la temperatura de 40°C hasta la eliminación completa del solvente,

d) solubilización del extracto de etanol crudo en una solución hidroalcohólica 9:1 de metanol y división con n-hexano para eliminar la parte de aceite de terpeno,

15 e) separación de la parte hidroalcohólica y posterior concentración hasta la eliminación completa de los solventes,

f) realización de la cromatografía líquida bajo vacío en gel de sílice de la parte hidroalcohólica cruda mediante la utilización de los sistemas de solventes siguientes: 100% de hexano, 50% hexano:diclorometano, 100% de diclorometano, 50% diclorometano:acetato de etilo y 100% de acetato de etilo,

20 g) eliminación del solvente bajo vacío de la parte en 100% de diclorometano y recristalizaciones sucesivas en hexano:acetona 4:1 para la purificación de la cubebina (1),

h) análisis de la pureza de la cubebina según cristaliza mediante cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia.

OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE CUBEBINA

25 **i) Hinoquinina**

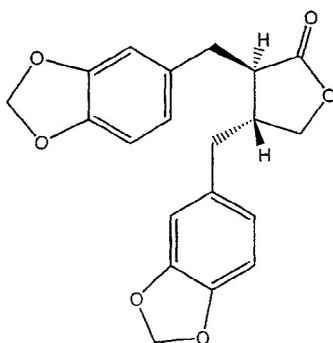
R) Reacción de la cubebina con PCC en diclorometano seco (en una microbalanza se disponen 50 mg de cubebina en un matraz que contiene diclorometano seco y se sella bajo atmósfera inerte (N_2). En un balón de tres cuellos, también bajo atmósfera inerte, se añade 1 equiv. mol. de PCC en diclorometano seco; la solución de cubebina en DCM se añade por medio de una jeringa hipodérmica, manteniendo en todo momento la atmósfera inerte durante 24 horas, a la temperatura de -6°C y bajo agitación constante,

30 S) análisis cromatográfico para el seguimiento de la reacción,

T) el aislamiento de la hinoquinina se llevó a cabo mediante: 1) vertido del medio de reacción en una columna cromatográfica (bajo vacío) con placa sinterizada nº 2 que contenía MgSO_4 monohidrato proporcionando filtración al vacío, 2) se somete la muestra a una columna cromatográfica con gel de sílice 60 y el sistema de gradiente de solventes siguientes: 100% de hexano, hexano:acetato de etilo 8:2, hexano:acetato de etilo 7:3, hexano:acetato de etilo 6:4, 100% de acetato de etilo y 100% de metanol,

35 U) por lo tanto, se transfirió la fase orgánica a un matraz de recolección, seguido de la purificación mediante cromatografía circular preparativa [CCP] (CROMATOTRON),

40 V) tras este procedimiento, se sometió el producto (6) a determinación de la pureza mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), encontrando un índice de pureza >95%. Se realizó el análisis de RMN ^1H y ^{13}C y de $[\alpha]_D^{26}$ del producto (hinoquinina).



Hinoquinina (6)

II) 6,6'-Dinitrohinoquinina

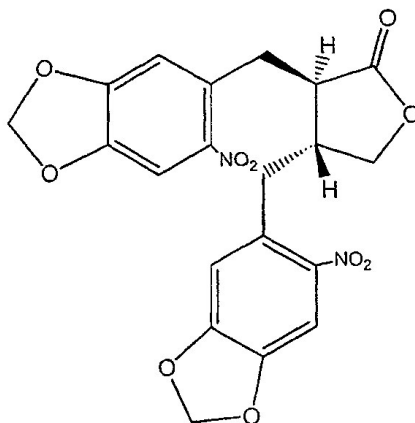
X) Reacción entre la hinoquinina y ácido nítrico en cloroformo (en una microbalanza se disponen 50 mg de hinoquinina en cloroformo manteniendo el medio de reacción a -6°C , añadiendo 6 equiv. mol. de ácido nítrico gota a gota lentamente y manteniendo la reacción bajo las mismas reacciones y bajo agitación constante durante dos horas, añadiéndose a continuación una solución saturada de Na_2CO_3 para su finalización),

Y) análisis cromatográfico para el seguimiento de la reacción,

Z) el aislamiento de la 6,6'-dinitrohinoquinina se realizó mediante: 1) extracción del medio de reacción con cloroformo y la posterior evaporación bajo presión reducida, 2) recristalizaciones bajo metanol,

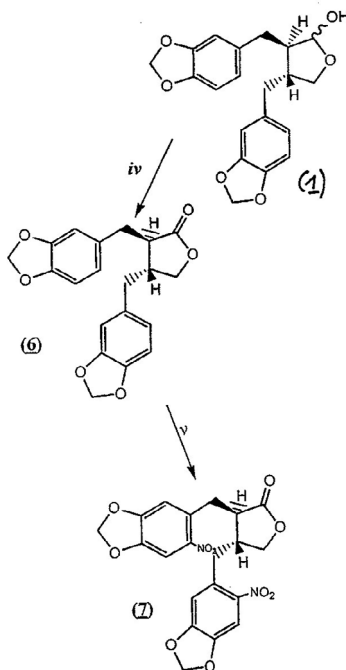
AA) por lo tanto, se transfirió la fase orgánica a un matraz de recolección, seguido de la purificación mediante cromatografía circular preparativa [CCP] (CROMATOTRON),

BB) tras el procedimiento, se sometió el producto (7) a determinación de la pureza mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), encontrando un índice de pureza $>95\%$. Se realizó el análisis de RMN ^1H y ^{13}C y de $[\alpha]_D^{26}$ del producto (6,6'-dinitrohinoquinina).



6,6'-dinitrohinoquinina (7)

En el Esquema 1, a continuación, las reacciones de obtención se ilustran con las estructuras correspondientes de los derivados semisintéticos de la cubebina (1), aislados a partir de semillas de *Piper cubeba*, constituidas por las etapas siguientes: iv y v.



Se llevó a cabo la evaluación de la actividad tripanocida mediante la comprobación del porcentaje de lisis de formas tripomastigotas sanguíneas de diferentes líneas de *Trypanosoma cruzi*, aisladas a partir de músculos de ratones en pico parasitémico. Se realizaron ensayos biológicos en microplacas de titulación de 200 μ l que contenían aproximadamente 10^6 formas del parásito en cada mililitro de sangre utilizada. Las concentraciones de sustancia utilizadas para la evaluación fueron 10, 25 y 50 μ g/ml, solubilizadas en tampón PBS que contenía dimetilsulfóxido al 5%. Tras añadir las sustancias, se incubó la sangre infectada a 4°C bajo agitación constante durante un periodo de 24 horas. Después de este periodo, se realizó un recuento del número de parásitos que había sobrevivido a la acción de las sustancias en un microscopio óptico y en comparación con el grupo de control negativo (sangre infectada con adición de la solución utilizada para solubilizar las sustancias), y se realizaron los cálculos para determinar los porcentajes de lisis. Como control positivo se utilizó violeta de genciana a una concentración de 250 μ g/ml, tal como se encuentra indicado para la quimioprofilaxis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El protocolo de actividad biológica descrito anteriormente ya se encuentra publicado en su totalidad y se utiliza en el campo científico, encontrándose por lo tanto estandarizado respecto a la actividad tripanocida (quimioprofilaxis y evaluación de susceptibilidad para el parásito).

Puede disponerse de diversos trabajos científicos que utilizan dicho método, que se presenta incluso en el trabajo original de evaluación de la actividad biológica de la cubebina, publicado por Bastos *et al.*, en 1999, en: "Evaluation of the Trypanocidal Activity of Lignans Isolated from the Leaves of *Zanthoxylum naranjillo*", *Planta Medica* 65:541-544, 1999.

Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran la actividad de los derivados semisintéticos de cubebina, así como sus potenciales quimioprofiláctico y terapéutico.

Tabla 1. Resultados de la evaluación de actividad antiChagas

Sustancias	μ g/ml ⁻¹ % de lisis		IC ₅₀ (μ g/ml)
Cubebina	25/7,3	50/52,3	97,6
Hinoquinina	25/80,1	50/95,4	0,9
6,6'-Dinitrohinoquinina	25/57,6	50/82,8	37,1
Metilpluviatólido	25/99,0	50/100	1,30
Violeta de genciana	250/100		76,0

Para las sustancias con 100% de actividad, la sangre tratada se inoculó en ratones sanos con el fin de verificar su capacidad quimioprofiláctica. Todas las sustancias en el presente ensayo demostraron una capacidad quimioprofiláctica.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener el derivado sintético de lignano hinoquinina, que comprende las etapas siguientes:

5

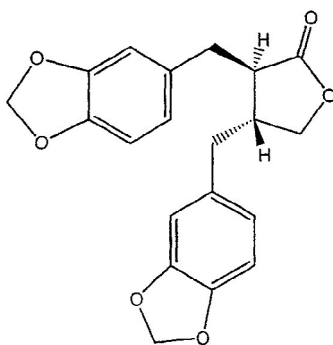
a) reacción de la cubebina con PCC en diclorometano seco, en una atmósfera inerte (N_2), durante 24 horas, a una temperatura de aproximadamente $-6^\circ C$ bajo agitación constante;

b) análisis cromatográfico para el seguimiento de la reacción;

10

c) aislamiento de la hinoquinina (6) mediante: 1) vertido del medio de reacción en una columna cromatográfica (bajo vacío) con placa sinterizada nº 2 que contiene $MgSO_4$ monohidratado y proporcionando filtración al vacío, 2) sometimiento de la muestra a una columna cromatográfica con gel de sílice 60 y el sistema de gradientes de solventes siguiente: 100% de hexano, hexano:acetato de etilo 8:2, hexano:acetato de etilo 7:3, hexano:acetato de etilo 6:4, 100% de acetato de etilo y 100% de metanol;

d) transferencia de la fase orgánica a un matraz de recolección, seguido de la purificación en cromatografía circular preparativa [CCP] (CROMATOTRON)



Hinoquinina (6)

15

2. Procedimiento para obtener el derivado sintético de lignano 6,6'-dinitrohinoquinina, utilizando la hinoquinina según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

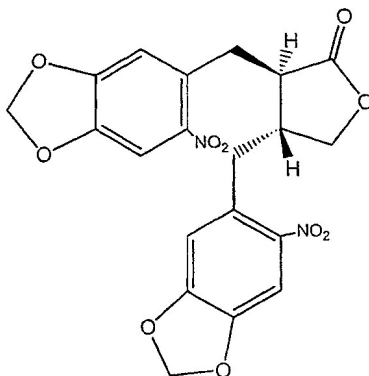
a) reacción de la hinoquinina con ácido nítrico en cloroformo a $-6^\circ C$ con agitación constante durante dos horas, seguido de la adición de una solución saturada de Na_2CO_3 ;

b) análisis cromatográfico para el seguimiento de la reacción;

20

c) aislamiento de 6,6'-dinitrohinoquinina (7) mediante: 1) extracción del medio de reacción con cloroformo y la evaporación posterior bajo presión reducida; 2) recristalización en metanol;

d) transferencia de la fase orgánica a un matraz de recolección, seguido de la purificación en cromatografía circular preparativa [CCP] (CROMATOTRON).



6,6'-dinitrohinoquinina (7)

25

3. Fármaco para la profilaxis de la enfermedad de Chagas que contiene los derivados sintéticos de lignano según la reivindicación 1 ó 2.