



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 680**

51 Int. Cl.:  
**A61K 36/324** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02708608 .1**

96 Fecha de presentación : **05.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1480662**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54

Título: **Procedimiento para producir una fracción enriquecida hasta 100 % de ácido 3-O-acetil-11-ceto-beta-boswélico a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.11.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.11.2011**

73

Titular/es: **LAILA IMPEX  
40-15-14, Brindavan Colony  
Vijayawada 520 010 AP, IN**

72

Inventor/es: **Gokaraju Ganga Raju;  
Gakaraju Rama Raju;  
Gottumukkala Venkata Subbaraju;  
Golakoti Trimurtulu y  
Pratha Sridhar**

74

Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 680 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

Procedimiento para producir una fracción enriquecida hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto-beta-boswélico a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos

## Ámbito de la invención

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para producir una fracción enriquecida hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto-β-boswélico a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos.

## Antecedentes de la invención

- 10 La gomorresina de las especies de *Boswellia* conocidas como francoincienso ha sido usada como un agente antiinflamatorio en la medicina tradicional Ayurvédica en la India. Los estudios llevados a cabo han establecido actividad antiinflamatoria de un extracto alcohólico de la gomorresina obtenido de *Boswellia serrata* en ratones y ratas. Este extracto también muestra que inhibe la formación de leucotrienos en neutrófilos peritoneales de rata *in vitro*. La fuente de las acciones antiinflamatorias ha sido atribuida a los ácidos boswélicos (Safayhi, H., *et al.*, *Planta Medica*, publicada en EEUU y 63, 487-493, 1997; *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, 261, 1143-46, 1992) publicada en EEUU, un grupo de ácidos triterpénicos aislados de la resina de *Boswellia* (Pardhy, R. S., *et al.*, *Indian J. Chem.*, 16B, 176-178, 1978). Estos compuestos ejercen actividad antiinflamatoria inhibiendo la 5-lipoxigenasa (5-LO), una enzima clave para la biosíntesis de los leucotrienos y 5(S)-HETE a partir de ácido araquidónico. Un estudio detallado sobre los requisitos estructurales para los ácidos boswélicos indicó que de los seis ácidos, el ácido 3-O-acetil-11-ceto-β-boswélico, en lo sucesivo referido como AACB, muestra la actividad inhibitoria más pronunciada (Sailer, E. R., *et al.*, *British J. Pharmacology*, 117, 615-618, 1996). El AACB actúa mediante un único mecanismo, en el que se une a 5-LO de manera dependiente de calcio y reversible y actúa como un inhibidor de tipo no-redox y no competitivo (Sailer, E. R., *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 256, 364-368, 1998).

- 15 Se ha sabido que la gomorresina de *Boswellia* y los ácidos boswélicos poseen otras actividades terapéuticas y están siendo usados para tratar malestares humanos tales como asma bronquial (Gupta, I., *et al.*, *Eur. J. Med. Res.*, 3(11), 511-514, 1998), colitis ulcerosa (Gupta, I., Parihar, A., *et al.*, *Eur. J. Med. Res.*, 2(1), 37-43, 1997) y leucemia humana (Yu Sao, Chi-Tang Ho *et al.*, *Planta Medica* publicada en EEUU, 64, 328-331, 1998). La propiedad anticarcinógena del extracto alcohólico de esta resina ha sido descrita por Mukherji, S., *et al.*, (*Indian J. Pharma.*, 32, 48-49, 1970). La actividad inmunomoduladora de los ácidos boswélicos ha sido informada por Sharma *et al.*, en *Phytotherapy Research*, (10, 107-112, 1996), publicada en EEUU.

- 20 Gupta, I., *et al.*, *Eur. J. Med. Res.*, (1998) 3: pgs. 511-514, declara en la página 512 que la gomorresina de *Boswellia serrata* en polvo encapsulada contenía 0,7% de AACB.

- 25 Hasan Safayhi *et al.*, *Planta Med.*, 66; (110-113), (2000), declara en la página 111 que los extractos etanólicos de Olíbano en granos y goma de *Boswellia serrata* contenían 4,5 ± 0,1% de AACB y 2,2 ± 0,1% de AACB, respectivamente.

## Descripción de la invención

- 35 Se ha encontrado que el extracto con disolvente orgánico de la gomorresina de *Boswellia serrata* contiene un total de seis ácidos boswélicos. Estos ácidos se muestran en la Fig. 1 y se representan por B1, B2, B3, B4, B5 y B6. La concentración de AACB, indicado como B2 en la Fig. 1, asciende sólo al intervalo de 1 hasta 10% en la fracción natural de ácidos boswélicos.

- 40 La presente invención está dirigida a enriquecer la concentración de AACB en la fracción de ácidos boswélicos hasta una concentración deseada hasta 100%. Otro objetivo de esta invención es separar los ácidos boswélicos inactivos o menos potentes convirtiéndolos en AACB altamente potente. Es posible obtener AACB de alta pureza hasta 100% mediante el sencillo procedimiento seguido por los inventores.

Una combinación de reacciones químicas y separaciones físicas por métodos cromatográficos alcanza estos objetivos.

- 45 La presente invención crea el procedimiento de la reivindicación independiente 1 y el procedimiento de la reivindicación independiente 2. Las reivindicaciones dependientes especifican las características preferidas pero opcionales.

- 50 La primera etapa en el procedimiento implica la oxidación de la mezcla de ácidos boswélicos a ácidos ceto-boswélicos. Para esta etapa se usa preferiblemente un oxidante usado convencionalmente para oxidación alílica. La segunda etapa implica la conversión de los ácidos 11-ceto-β-boswélicos obtenidos por oxidación en ácido 3-O-acetil-11-ceto-β-boswélico por acetilación. El material seco obtenido después de la acetilación mostró 30-40% de AACB por análisis por HPLC.

Alternativamente, la primera etapa en el procedimiento implicaba la acetilación de la mezcla de ácidos boswélicos a ácidos boswélicos acetilados. Esta etapa de podría ejecutar mediante cualquier agente acetilante típico como

anhídrido acético/piridina. La segunda etapa implica la conversión de los ácidos boswélicos acetilados en ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico por oxidación. Los agentes oxidantes tales como dióxido de selenio en un disolvente apropiado, dicromato sódico AcOH-Ac<sub>2</sub>O, cromato de t-butilo en CCl<sub>4</sub>-AcOH-Ac<sub>2</sub>O, CrO<sub>3</sub>-piridina, también se pueden utilizar para llevar a cabo la etapa de oxidación. El material seco obtenido después de la oxidación mostró 30-40% de AACB por análisis por HPLC.

AACB de mayor calidad se obtiene a partir de la mezcla de acetilación por metodología cromatográfica. En el procedimiento se pueden usar soportes sólidos tales como uno o más de gel de sílice, sílice de fase inversa, alúmina, Sephadex y Toyopearl. Las técnicas cromatográficas se seleccionan de columna de gravedad, cromatografía "flash", cromatografía de fase inversa, cromatografía líquida de alta presión preparativa y sus combinaciones. Se usan disolventes tales como acetona, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, hexano y agua, tanto solos como en combinación para desarrollar una columna de gravedad o columna "flash" o columna de media presión.

Esta invención se refiere a un procedimiento para producir una fracción enriquecida en AACB en el intervalo de 10% hasta 100% a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos obtenido de gomorresina de las especies *Boswellia*, que comprende las etapas de oxidar dicha fracción que contiene los ácidos boswélicos y posterior acetilación de dicha fracción oxidada, seguido por separación cromatográfica para obtener una fracción enriquecida en AACB en el intervalo de 30 hasta 100%. Una fracción enriquecida en AACB en el intervalo de 10-30% se puede conseguir diluyendo apropiadamente una muestra enriquecida de 40% con un excipiente apropiado o mezcla natural de ácidos boswélicos o controlando el grado de oxidación limitando el oxidante durante el proceso de conversión.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los seis ácidos boswélicos presentes en un extracto obtenido de la gomorresina.

La Figura 2 es un diagrama de flujos que muestra el esquema de reacción que consiste en oxidación y acetilación que dan como resultado AACB de 40,3% después de la conversión de los otros ácidos  $\beta$ -boswélicos en AACB.

#### Mejor método de llevar a cabo esta invención

El siguiente ejemplo ilustra uno de los mejores métodos de llevar a cabo el procedimiento según esta invención.

Etapa de oxidación: La mezcla de ácidos boswélicos (85%, 20 g) que contiene 2,7% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico se disolvió en 1,2 L de dioxano en un matraz de fondo redondo de 2 L. Después se añadió a la mezcla N-bromosuccinimida (24 g). Después se añadió carbonato cálcico (20 g) seguido por 0,12 L de agua. La mezcla de reacción se agitó después a temperatura ambiente. Después de 24 horas, se vertió la mezcla en hielo triturado y se extrajo con 2 x 300 mL de acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó sucesivamente con 200 mL de agua y 200 mL de salmuera y se secó sobre 50 g de sulfato sódico. El extracto se evaporó y se secó bajo vacío para obtener 18,4 g de una mezcla que contenía 28% de ácido 11-ceto- $\beta$ -boswélico (B1) y 13,2% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico (B2).

Etapa de acetilación: A una mezcla de ácidos ceto-boswélicos (20 g), obtenida en la etapa de oxidación, en 20 mL de dicloroetano, se añadieron 12 mL de cloruro de acetilo y 10 mL de piridina. La mezcla se agitó a 60°C durante 3 h y a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo triturado y se continuó la agitación durante alrededor de 10 min. El precipitado blando formado se filtró y lavó a fondo con agua destilada y se secó a 50°C en un secador de vacío durante tres horas para obtener una mezcla de ácidos boswélicos como acetatos (20,3 g). El análisis por HPLC mostró que la mezcla contenía 40,3% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico (AACB).

Enriquecimiento adicional de AACB: 10 g de la mezcla de ácido boswélico anterior, que se había ensayado que contenía 40,3% de AACB, se sometió a cromatografía "flash" sobre una columna de sílice usando 200 mL de hexano, 200 mL de acetato de etilo al 8%/hexano y 200 mL de acetato de etilo al 12% en hexano como eluyentes. Se recogieron fracciones cada 20 mL. Las fracciones que contenían AACB se combinaron y evaporaron para obtener un residuo de 4,0 g que exhibió 80% de AACB por análisis por HPLC.

#### Enriquecimiento de AACB hasta 100%

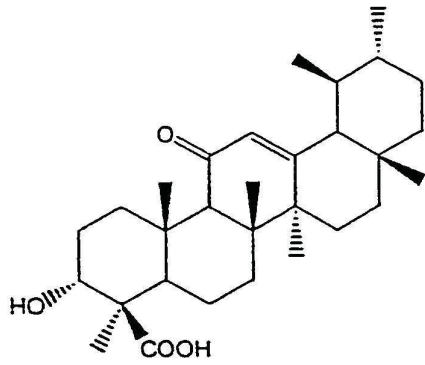
El AACB 80% puro obtenido en la etapa previa se sometió a cromatografía repetida sobre gel de sílice usando mezclas de acetona y hexano como eluyentes para obtener AACB de 98 hasta 100%.

Alternativamente, se sometió AACB 80% puro a HPLC preparativa sobre columna de C18 (Phenomenex, Luna, 250 mm x 21,2 mm, 10  $\mu$ ,  $\lambda_{\max}$  248 nm, 20 mL/min) usando mezclas de acetonitrilo y agua como eluyentes para obtener AACB de 99-100% ( $t_R$  13 min).

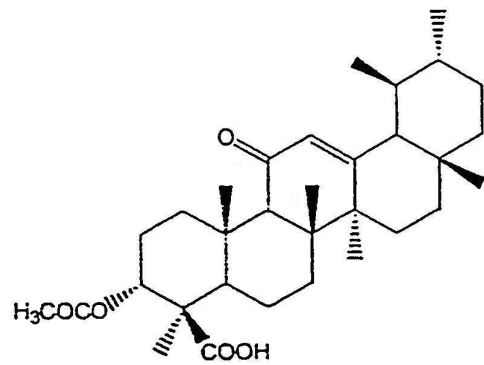
El anterior ejemplo describe una realización específica de esta invención.

## REIVINDICACIONES

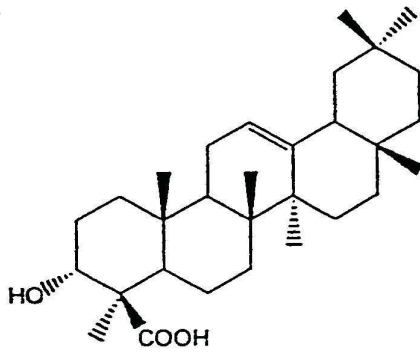
- 5 1. Un procedimiento para producir una fracción enriquecida hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos obtenido de gomorresina de especies de *Boswellia*, que comprende las etapas de oxidar la fracción que contiene los ácidos boswélicos de dicho extracto con posterior acetilación de dicha fracción oxidada seguido por separación cromatográfica para obtener una fracción enriquecida en ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico en el intervalo de 10 hasta 100%.
- 10 2. Un procedimiento para producir una fracción enriquecida hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico a partir de un extracto que contiene una mezcla de ácidos boswélicos obtenido de gomorresina de especies de *Boswellia*, que comprende las etapas de acetilar la fracción que contiene los ácidos boswélicos de dicho extracto con posterior oxidación de dicha fracción acetilada seguido por separación cromatográfica para obtener una fracción enriquecida en ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico en el intervalo de 10 hasta 100%.
- 15 3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que un extracto en disolvente orgánico de la resina de *Boswellia serrata* que contiene seis ácidos boswélicos se somete a oxidación, acetilación y separación cromatográfica para obtener una fracción enriquecida en ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico.
4. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha oxidación se lleva a cabo tratando la fracción de ácidos boswélicos con N-bromosuccinimida y carbonato cálcico en dioxano y agua.
5. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo; dicho extracto de acetato de etilo se lava, se seca y se evapora para separar el disolvente orgánico.
- 20 6. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha etapa de acetilación se lleva a cabo tratando dichos ácidos ceto-boswélicos de la etapa de oxidación en dicloroetano con cloruro de acetilo en presencia de piridina.
7. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha mezcla de reacción se vierte en hielo triturado y el precipitado blanco obtenido se separa y se seca bajo vacío.
- 25 8. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho extracto después de la oxidación y acetilación se somete a cromatografía en columna de gel de sílice y se eluye con disolventes orgánicos tales como acetato de etilo y hexano o solos o en combinación.
9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la fracción eluída de dicha columna se seca y se re-cromatografía para obtener 98% hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico.
- 30 10. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dichos soportes sólidos se seleccionan de sílice de fase inversa, alúmina, Sephadex y Toyopearl y los disolventes se seleccionan de acetona, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, hexano y agua o solos o en combinación para desarrollar una columna de gravedad o columna "flash" o columna de media presión.
- 35 11. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha fracción eluída de dicha columna se seca y se somete a HPLC sobre columna de C18 y se eluye con una mezcla de agua y acetonitrilo o metanol para obtener ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico mayor que 99% puro.
12. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11, en el que los ácidos  $\beta$ -boswélicos en dicha fracción natural de ácidos boswélicos tienen diferente proporción relativa.
- 40 13. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, en el que se obtiene una fracción enriquecida con 30% hasta 100% de ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico.



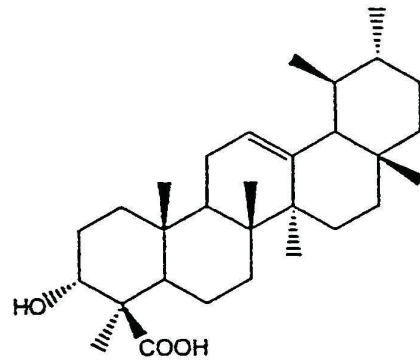
ácido 11-ceto- $\beta$ -boswélico (B1)



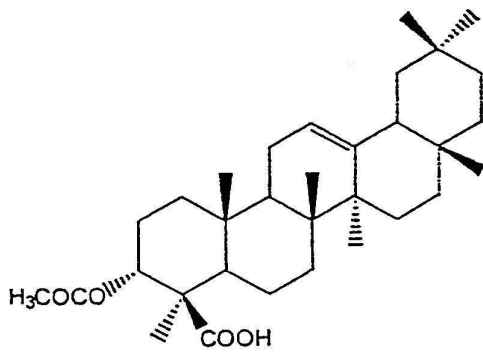
ácido 3-O-acetil-11-ceto- $\beta$ -boswélico (AACB, B2)



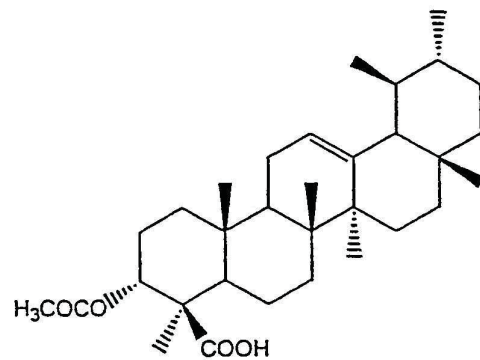
ácido  $\alpha$ -boswélico (B3)



ácido  $\beta$ -boswélico (B4)

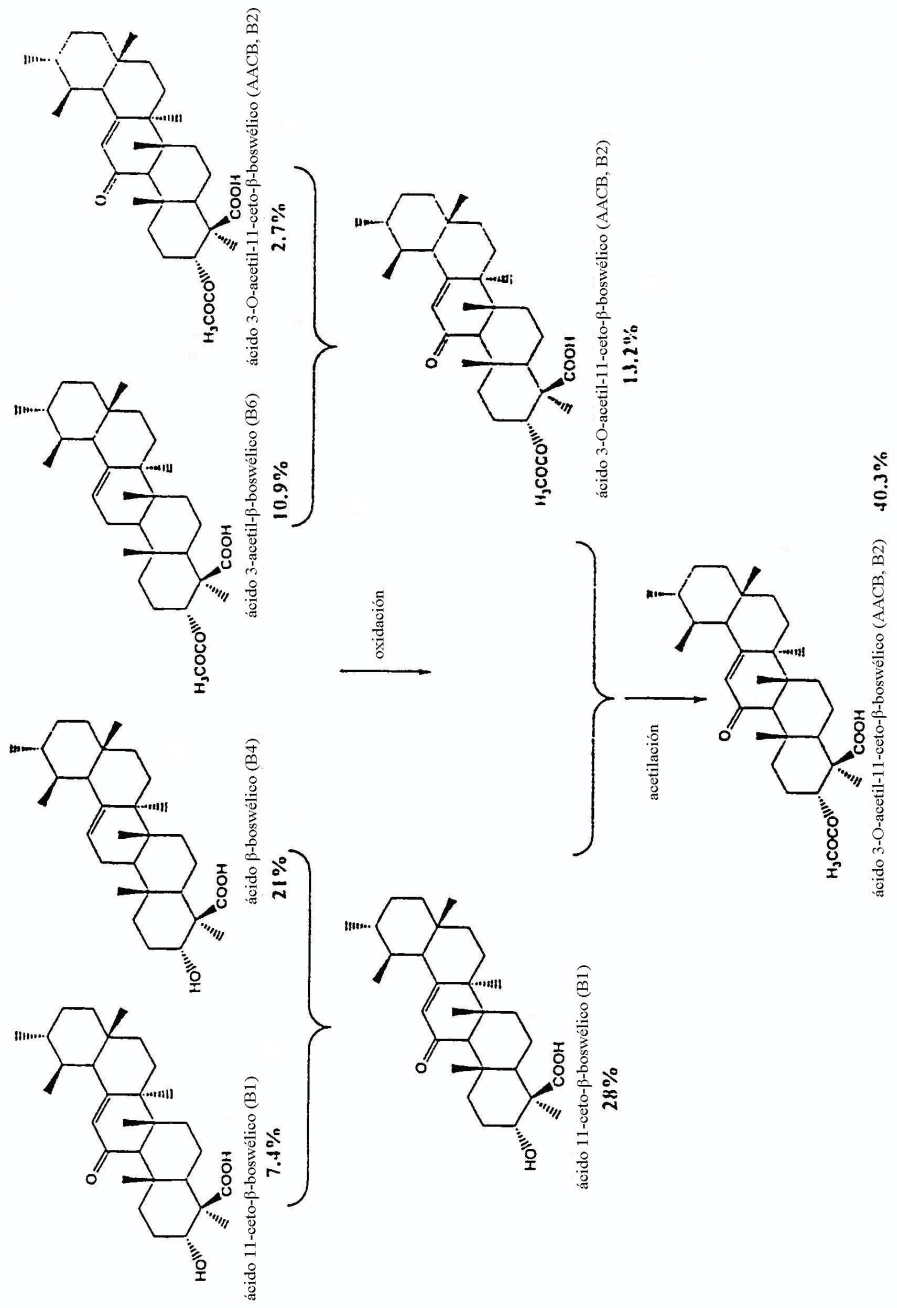


ácido 3-acetil- $\alpha$ -boswélico (B5)



ácido 3-acetil- $\beta$ -boswélico (B6)

**Fig. 1**



**Fig. 2**