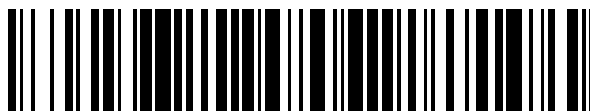


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 858**

21 Número de solicitud: 201031734

51 Int. Cl.:
C07D 491/22 (2006.01)
A61K 31/527 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **25.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.06.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:
**DELGADO MARTÍN, JULIO;
NOHEDA MARÍN, PEDRO;
PÉREZ AFONSO, RICARDO;
CANDENAS DE LUJÁN, M^a LUZ;
PINTO PÉREZ, FRANCISCO M^a;
JIMENO HERRANZ, M^a LUISA;
FORT AGUERRONDO, DIEGO;
PÉREZ HERNÁNDEZ, NATALIA;
BLANCO ANIA, DANIEL;
HERRERO RUIZ, DAVID y
GALLARDO CASTRO, MANUEL DAVID**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **COMPUESTOS MARINOS ANTAGONISTAS DE LOS CANALES DE CALCIO PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.**

57 Resumen:

Compuestos marinos antagonistas de los canales de calcio para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

La presente invención se refiere a una mezcla de crambescidinas con un potente efecto antagonista sobre los canales de calcio. Además la presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de un extracto de dichas crambescidinas y al uso del mismo para la elaboración de un medicamento como antagonista de los canales de calcio.

ES 2 383 858 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS MARINOS ANTAGONISTAS DE LOS CANALES DE CALCIO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

5 La presente invención se refiere una mezcla de crambescidinas con un potente efecto antagonista sobre los canales de calcio. Además la presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de un extracto de dichas crambescidinas y al uso del mismo para la elaboración de un medicamento como antagonista de los canales de calcio.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los antagonistas de los canales de calcio son medicamentos usados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como angina, arritmias (ritmos irregulares) e hipertensión. El calcio es necesario para la contracción de las células del músculo liso, del músculo esquelético y del músculo cardiaco. En el caso del músculo cardiaco, la contracción se produce por la alteración del movimiento del calcio a través de los canales en las células cardiacas. Los antagonistas de los canales de calcio ayudan a suprimir irregularidades en el ritmo cardiaco.

20

El calcio es importante también para los vasos sanguíneos, ayudando al control de la presión arterial. Los antagonistas de los canales de calcio provocan la relajación de la musculatura lisa arterial, siendo usados en el tratamiento de la hipertensión. El verapamilo, el nifedipina y el diltiazem son antagonistas de los canales de calcio con similares, aunque no idénticos, sitios de acción. Como el músculo cardiaco depende de la entrada de calcio a sus células para funcionar adecuadamente, los antagonistas de los canales de calcio pueden afectar al funcionamiento normal del corazón. Efectos colaterales peligrosos incluyen supresión de la función cardiaca, llevando a insuficiencia cardiaca congestiva, frecuencias cardiacas bajas y disminución de la tensión arterial.

30

Debido a lo anterior, se hace necesario el poder obtener nuevos compuestos que ejerzan un papel antagonista sobre los canales de calcio y que no tengan efectos negativos sobre el funcionamiento del corazón.

- 5 Los océanos y los mares son una fuente de un extenso grupo de productos naturales con estructura única, que son principalmente acumulados en invertebrados como las esponjas y los moluscos (Burkhard et al. *Drug. Dis. Today* **2003**, 8(2), 536-544). Varios de estos compuestos muestran una pronunciada actividad farmacológica y son candidatos interesantes para
- 10 nuevos medicamentos en varias áreas de tratamiento (Newman et al. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037). Las esponjas han provisto más productos naturales que cualquier otro organismo, debido en parte a su propensión a producir metabolitos bioactivos (Faulkner et al. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 1-48).
- 15 Por lo tanto, existe la necesidad de obtener nuevos compuestos capaces de modular los canales de calcio (VDCC), los cuales puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

En este mismo sentido unos productos naturales que se postulan como

20 antagonistas de los canales de calcio son las crambescidinas, procedentes principalmente de la esponja *Crambe crambe*. Dentro de este tipo de productos naturales está la crambescidina 800, conocida por su efecto protector frente al estrés oxidativo en células neuronales (*J. Nat. Med.* **2007**, 61(3), 288-295), como agente antimalárico (*J. Antibiot.* **2006**, 59(9), 583-590) o al igual que la

25 crambescidina 816, como modulador de los canales de calcio (*J. Nat. Prod.* **1993**, 56(7), 1007-1015). Sin embargo la extracción de este tipo de productos naturales supone llevar a cabo procedimientos complicados, mediante los cuales no se llegan a obtener grandes rendimientos y en la mayoría de los casos el poder purificar el extracto de dicha esponja se hace complicado. La

30 obtención de las crambescidinas 800 y 816 de fuentes naturales por extracción y purificación es un proceso arduo y largo debido a la complejidad estructural de estos alcaloides y a la mezcla de compuestos similares (p.ej. otras

crambescidinas, crambescinas, crambidina y ptilomicalina A) que suelen presentar las esponjas y estrellas de mar que las contienen. Las principales características estructurales que presentan las crambescidinas 800 y 816 son grupos polares (un catión guanidinio, alcoholes y aminas) y, a la vez, una
5 cadena hidrocarbonada apolar larga.

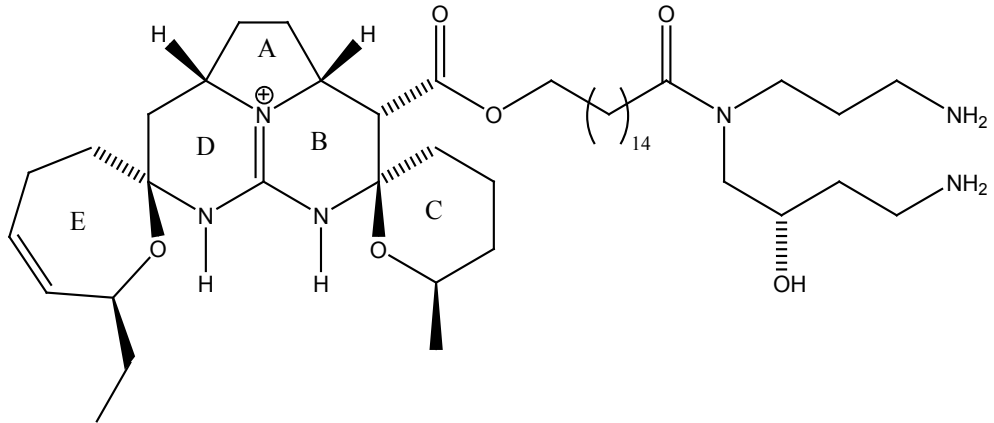
En la actualidad existen procedimientos para el aislamiento y purificación de estos compuestos naturales por separado, como es el caso de US5756734 o US5952332, en los cuales se exponen procedimientos para la obtención de las
10 crambescidinas, ya sean las 800, 816 o por ejemplo la 830, por separado pero nunca como una mezcla de la 800 y 816 con composición definida.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 A tenor de todo lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a una mezcla de las crambescidinas 800 y 816 en una proporción definida, que muestra un efecto sorprendente frente a la actividad que mostrarían cualquiera de ellas por separado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

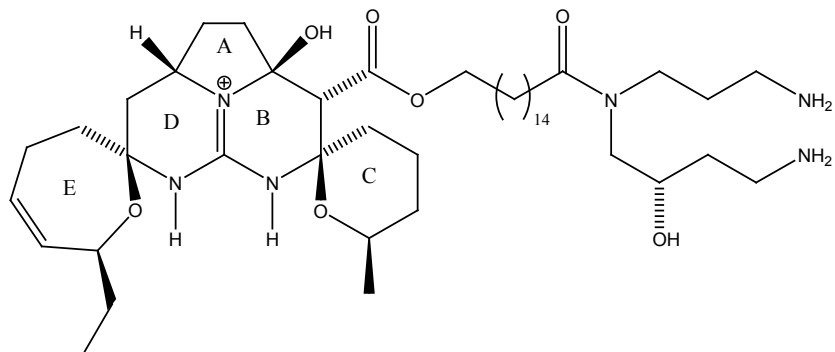
20 Además la presente invención describe un método eficaz y novedoso de aislamiento de las crambescidinas 800 y 816 como una mezcla. Finalmente se demuestra el potente efecto como antagonista de los canales de calcio que muestra esta mezcla de crambescidinas en proporción definida, para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

25 Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a una mezcla de las crambescidinas 800 y 816:



Crambescidina 800

5



10

15

Crambescidina 816

en proporción 1:3.

20 Según otra realización preferida, dicha mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 para su uso como medicamento.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o veterinaria, que comprende la mezcla de crambescidinas 800 y
25 816 en proporción 1:3, junto con uno o más excipientes farmacéutica o

veterinariamente aceptables y al menos un transportador farmacéutica o veterinariamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

5 De manera preferida, la composición farmacéutica o veterinaria además comprende otro principio activo.

10 Según otra realización preferida, la composición farmacéutica o veterinaria se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 o de la composición farmacéutica o veterinaria para la elaboración de un medicamento.

15 Según una realización preferida, se refiere al uso para la fabricación de un medicamento como antagonista de los canales de calcio.

20 Una realización preferida se refiere al uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades de la aneurisma, angina de pecho, aterosclerosis, ictus cerebral, arritmia cardiaca, infarto de miocardio, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca congestiva o enfermedad vascular periférica, cefalea en racimos, migraña, parto prematuro, síndrome de Raynaud y el tétano.

25 Además también de manera preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

30 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto que comprende una mezcla de crambescidinas 800 y 816 que comprende las siguientes etapas:

a. extracción a partir de la una esponja; y

b. purificación.

Según una realización preferida, la etapa de extracción comprende al menos una etapa de extracción con un disolvente orgánico. De manera preferida, se
5 llevan a cabo 3 tipos de extracción con disolvente orgánico.

Según una realización preferida, cada tipo de extracción se lleva a cabo desde 1 a 4 veces.

10 Según otra realización preferida, uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con acetona.

Según otra realización preferida, uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con dietil éter.

15

Según otra realización preferida, uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con butanol.

20 Según otra realización preferida, se llevan a cabo 3 extracciones. De manera preferida, la primera extracción se realiza con acetona, la segunda con butanol y la tercera con dietil éter.

Según otra realización preferida entre la extracción con acetona y la extracción con butanol se suspende el extracto con agua Mili Q.

25

Según otra realización preferida, la esponja es *Crambe crambe*.

30 Según una realización preferida, la etapa de purificación comprende hacer pasar el extracto obtenido de la etapa de extracción, por al menos 1 columna cromatográfica. De manera preferida se hace pasar al extracto procedente de la etapa de extracción por 3 columnas cromatográficas.

Según otra realización preferida, una de las columnas cromatográficas es de tipo Sephadex LH-20.

5 Según otra realización preferida, otra de las columnas cromatográficas es de tipo XBridge RP 18.

Según otra realización preferida, otra de las columnas cromatográficas es de tipo μ -Bondapak.

10 Según otra realización preferida, la primera columna es de tipo Sephadex LH-20, la segunda columna por la que se hace pasar el extracto es de tipo μ -Bondapak y la tercera es de tipo XBridge RP 18.

15 Según otra realización preferida, en todas las columnas se eluye con al menos metanol.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al extracto, mezcla de las crambescidinas 800 y 816, obtenible mediante el procedimiento de extracción anterior.

20 Según una realización preferida, dicho extracto comprende una mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporciones 1:3.

25 Según otra realización preferida, dicho extracto, mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 obtenible por el procedimiento anteriormente descrito para su uso como medicamento.

30 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o veterinaria, que comprende el extracto de la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 obtenible por el procedimiento anteriormente descrito, junto con uno o más excipientes farmacéutica o

veterinariamente aceptables y al menos un transportador farmacéutica o veterinariamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

5 De manera preferida, la composición farmacéutica o veterinaria además comprende otro principio activo.

10 Según otra realización preferida, la composición farmacéutica o veterinaria se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al uso del extracto, mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 obtenible por el procedimiento descrito anteriormente o de la composición farmacéutica o veterinaria que lo comprende para la elaboración de un medicamento.

15 Una realización preferida se refiere al uso para la fabricación de un medicamento como antagonista de los canales de calcio.

20 Otra realización preferida se refiere al uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades de la aneurisma, angina de pecho, aterosclerosis, ictus cerebral, arritmia cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad vascular periférica, cefalea en racimos, migraña, parto prematuro, síndrome de Raynaud y el tétano.

25 En la presente invención el término "composición farmacéutica o veterinaria" se refiere a un conjunto de componentes que está formada al menos por el extracto de la invención, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una
30 mejora del estado general de su salud, por ejemplo una aplicación cosmética, aunque puede no implicar un efecto fisiológico en el organismo sino una mejora en el bienestar del sujeto relacionada con su psicología. Por tanto, dicha

composición farmacéutica puede ser un producto de higiene personal, un producto cosmético o un producto que puede constituir la base para la elaboración de los productos anteriores o la base para la elaboración de un medicamento.

5

El “producto de higiene personal” se define como las sustancias o preparados que, sin tener la consideración legal de medicamentos, productos sanitarios, cosméticos o biocidas, están destinados a ser aplicados sobre la piel, dientes o mucosas del cuerpo humano con finalidad de higiene o de estética, o para neutralizar o eliminar ectoparásitos.

10

El “producto cosmético” se define como toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

15

El término “medicamento” tiene un significado más limitado que el significado de “composición farmacéutica”, tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto terapéutico es decir, un efecto fisiológico en el metabolismo del sujeto.

20

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades en seres humanos o que puedan usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades

30

curativas y/o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se
5 considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” -elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del extracto de la invención, estabiliza dicho extracto o ayuda a la
10 preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de
15 protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este
párrafo.

20 La composición de la invención puede comprender además un vehículo farmacológicamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el
25 sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las secuencias de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del extracto de la invención así como también de
30 otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El vehículo

farmacológicamente aceptable podría ser, pero sin limitarse, una nanopartícula, un liposoma, una micela o una microemulsión.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención se puede preparar mediante uno o más de estos procedimientos:

- (i) hacer reaccionar el compuesto de la invención con el ácido deseado
- (ii) convertir una sal del compuesto de la invención en otro, mediante reacción con un ácido apropiado o mediante una columna de intercambio iónico adecuada.

10

Las dos reacciones se llevan a cabo típicamente en solución. La sal puede precipitar en solución y se puede recoger mediante filtración o se puede recuperar soluciones del compuesto de la invención y el ácido o base deseado, según sea apropiado. La sal puede precipitar de una solución y recogerse mediante filtración o se puede recuperar mediante evaporación del disolvente. El grado de ionización en la sal puede variar entre completamente ionizado a casi no ionizado.

15

Sal farmacéuticamente aceptable por adición de ácidos, se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de las bases libres, que no son indeseables ni biológicamente ni de otra manera, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como, pero sin limitación, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido canfónico, ácido alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido 2-oxoglutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido

25

30

isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido oleico, ácido cerótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiociánico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico, y similares.

Sal farmacéuticamente aceptable por adición de bases se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son indeseables ni biológicamente ni de otra manera. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o de una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de sodio, de potasio, de litio, de amonio, de calcio, de magnesio, de hierro, de zinc, de cobre, de manganeso, de aluminio y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias; aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, guanidinas sustituidas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como amoníaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-metilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procalna, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilendiamina, glucosalina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, *N*-etilpiperidina, guanidina, resinas de poliamina y similares.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Expresión de canales de calcio en útero de rata.

5 **Figura 2 A y B** Contracciones inducidas por KCl.

Figura 3 A y B Contracciones inducidas por oxitocina y metacolina.

Figura 4 A y B. Contracciones inducidas por veratridina.

10

Figura 5. Efectos inducidos por la mezcla de crambescidinas 800 y 816 sobre las contracciones fásicas espontáneas del miometrio.

EJEMPLOS

15

Ejemplo 1: Procedimiento de aislamiento de un extracto de la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3.

20 Se sacó una muestra de esponja *Crambe crambe* de su medio, y se introdujo en una botella de cristal color topacio que contenía 750 mL de acetona en la cual se maceró durante 48 horas a temperatura de 7–8 °C. Después de ese tiempo se filtró a través de placa de vidrio y se volvió a poner en maceración durante otras 48 horas con nueva acetona (750 mL). Este procedimiento de macerado se repitió cuatro veces. Los filtrados de acetona se fueron llevando a
25 sequedad cada vez. El resto sólido de la esponja extraída se dejó secar a temperatura ambiente (102 g).

30 Lo extraído de la esponja se suspendió de nuevo en 250 mL de agua Mili Q (18 Mohms), se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con *n*-BuOH (3 × 250 mL). A continuación se lavó el agua con Et₂O (2 × 250 mL). Se reunieron

todos los extractos orgánicos y se los llevó a sequedad conformando lo que constituye el extracto de la esponja (10,4 g) de un color rojo muy fuerte.

5 A continuación se realizó una cromatografía en columna Sephadex LH-20 al extracto eluyendo con MeOH. Para ello se utilizó una columna de dicha gel de las siguientes características: Longitud: 66 cm; diámetro interno 3,6 cm; volumen de muestra (en MeOH): 20 mL; volumen muerto: 275 mL; volumen de fracción 20 mL; flujo: 3 mL/min. En estas condiciones el producto deseado eluyó en las fracciones 2 a 14, con un R_F de 0.46. La detección se hizo por
10 cromatografía en capa fina desarrollando con la mezcla *n*-BuOH/AcOH/H₂O (6:1.5:2.5; v/v/v), utilizando como revelador inmersión de la TLC en solución de ácido fosfomolibdico (30 g) en etanol (hasta 1 L) y posterior calentamiento de la TLC.

15 A continuación se purificaron las fracciones provenientes de la columna Sephadex LH20 a través de una columna μ -Bondapakde Waters (7,8 × 300 mm, 10 μ m de diámetro de partícula). Se eluyó con MeOH/NaCl 0.1M (9:1, v/v), a un flujo de 1.5 mL/min y detección por UV a 230 nm (PDA 996 de Waters). La fracción a purificar (184 mg) se disolvió en 1,5 mL de MeOH y se inyectaron
20 100 μ L cada vez. Se empezó a recolectar a los 5 minutos y se hizo hasta el minuto 15, tomando fracciones cada 30 segundos. El producto eluyó en las fracciones 8 y 9.

A continuación se eluyó el producto a través de una columna Waters XBridge
25 RP 18 (10 × 250 mm, 5 μ m de diámetro de partícula). La elución se hizo con gradiente de MeOH/NaCl 0.1M (60:40). El flujo fue de 5 mL/min y la detección por UV a 212 nm (PDA 996 de Waters). El gradiente fue de 60:40 (MeOH/NaCl 0.1 M) hasta 75:25 (<MeOH/NaCl 0.1M) en 45 minutos y luego de 60:40 (MeOH/NaCl 0.1M) durante 15 minutos para estabilizar la columna. La muestra
30 (100 mg) se disolvió en 2 mL de MeOH y se inyectaron 100 μ L cada vez. El producto eluyó del minuto 26 al minuto 35.

Al final de procedimiento anteriormente descrito se obtuvieron 57,5 mg de la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3.

5 **Ejemplo 2: Ensayos biológicos de actividad del extracto mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3.**

ACTIVIDAD

10 El extracto de composición definida (mezcla de **crambescidinas 800 y 816** en proporción 1:3, respectivamente) posee actividad biológica como bloqueador/agonista parcial de los canales de calcio dependientes del voltaje en útero de rata.

Estudios de expresión génica

15 El análisis de la expresión de los canales de Ca^{2+} en el útero se ha llevado a cabo mediante técnicas de RT-PCR, estudiando la presencia de los ARNm que codifican los distintos tipos de canales de Ca^{2+} existentes. La metodología que se ha seguido ha sido la siguiente:

- 20 1) Extracción de ARN total a partir de la muestra.
- 2) Obtención de ADNc a partir del ARN total obtenido de las muestras, en una reacción con transcriptasa inversa.
- 25 3) Amplificación con los cebadores adecuados y mediante PCR de los ADNc procedentes de los ARNm de los distintos canales de sodio y de la β -actina (cuyo ARNm en el útero se mantiene en una tasa prácticamente constante).
- 4) Separación de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio para su visualización a la luz UV.
- 30 5) Identificación de los fragmentos amplificados mediante la determinación de la secuencia del fragmento amplificado.

Estudios funcionales

Para el estudio de la actividad farmacológica de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** se analizaron sus efectos sobre la contractilidad del miometrio de rata. La elección de esta preparación farmacológica se basa en el hecho de ser uno de los únicos músculos lisos que posee canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ funcionalmente activos por lo que proporciona un modelo sencillo para el estudio de los efectos de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** sobre canales dependientes de voltaje.

Empleamos ratas Wistar vírgenes con un peso comprendido entre 200 y 250 g. Todas las ratas utilizadas se encontraban de forma espontánea en la fase *estro* del ciclo hormonal. La determinación de la fase del ciclo ovárico se realizó mediante frotis vaginal. Se obtuvieron segmentos de músculo liso uterino longitudinal que se montaron en la copa de un baño de órganos conteniendo solución fisiológica de Krebs a una temperatura de 37 °C. Los segmentos uterinos, de aproximadamente 1 cm de longitud y 2–3 mm de anchura, se sometieron a una tensión inicial de 1 g y se fijaron a transductores isométricos Grass FT-07, con el fin de detectar la contracción muscular y los cambios que se produzcan en la misma.

20

Para el estudio de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** se procedió a la adición de dosis acumulativas crecientes del compuesto (10 nM–0.3 mM) en preparaciones precontraídas por agonistas que actúan por distintos mecanismos:

25

1) KCl 40 mM, como modelo de contracción mediada primariamente por apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L. En segmentos uterinos montados en paralelo se analizaron los efectos de la nifedipina (inhibidor altamente selectivo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L, que son los predominantes en el músculo liso uterino) o su solvente.

30

- 2) veratridina 60 μM , con el fin de estudiar su posible efecto sobre los canales de Na^+ dependientes de voltaje. En segmentos uterinos montados en paralelo se analizaron los efectos de la tetrodotoxina (inhibidor altamente selectivo de canales de Na^+) o su solvente.
- 5 3) Contracciones inducidas por oxitocina (1 nM) y metacolina (10 μM). La oxitocina y la metacolina inducen contracciones a través de la activación de receptores específicos de membrana ligados a proteína G.
- 4) Contracciones espontáneas. En una solución fisiológica con Ca^{2+} 1.9 mM, el segmento aislado de útero de rata desarrolla una motilidad espontánea. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que estas contracciones son dependientes de la presencia de calcio extracelular e inhibidas de forma dependiente de la dosis por la nifedipina, lo que demuestra su dependencia de la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma celular a través de canales dependientes de voltaje.
- 10
- 15 En cada preparación uterina se ha estudiado un único compuesto y la primera dosis se adicionó al baño 30 min después de la adición del agonista (en el caso de la oxitocina y la metacolina), 90 min después de la adición del agonista (en el caso de la veratridina) o tras la obtención de una meseta estable de contracción (en el caso del KCl). En todos los casos se realizaron experiencias control en segmentos uterinos montados en paralelo en las que se estudiaron
- 20 a) los efectos del solvente de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816**, adicionado a la preparación a los mismos tiempos que el compuesto y b) la respuesta del agonista a los mismos tiempos, sin adición de producto ni solvente. Igualmente, se han realizado controles iniciales y finales de KCl (40
- 25 mM) y metacolina (MCh, 10 μM) con el fin de identificar la existencia de posibles efectos inespecíficos conducentes a un bloqueo general de la contractilidad del segmento uterino.

Resultados

- 30 Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son proteínas localizadas en la membrana celular que juegan un papel primordial en la regulación de un gran

número de funciones celulares. Se trata de proteínas muy complejas, constituidas por una subunidad muy voluminosa, denominada α_1 , y varias subunidades auxiliares denominadas α_2 , β , γ y δ . La subunidad α_1 que constituye el canal propiamente dicho, está constituida por cuatro motivos, cada uno de ellos con seis segmentos transmembrana de hélices en alfa. Existe una gran homología estructural entre los distintos canales iónicos dependientes de voltaje, como los de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , lo que habla de su origen evolutivo, ya que todos parecen derivar de un gen ancestral común que ha sufrido una serie de duplicaciones a lo largo de la evolución.

10

La diversidad estructural de los canales de Ca^{2+} deriva fundamentalmente de la existencia de distintas subunidades α_1 . Actualmente se conocen 10 subunidades α_1 , cada una de ellas codificada por un gen diferente. Recientemente se ha establecido una nomenclatura para estos canales que establece la existencia de tres subfamilias (Tabla 1). La subfamilia Ca_v1 está constituida por cuatro miembros ($\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ y $\text{Ca}_v1.4$) e incluye los conocidos clásicamente como canales tipo L. La subfamilia Ca_v2 está constituida por tres miembros ($\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.3$) e incluye los conocidos clásicamente como canales tipo P/Q, N y R. La subfamilia Ca_v3 está constituida por tres miembros ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$) e incluye los conocidos clásicamente como canales tipo T.

20

Nombre clásico	Nombre IUPHAR del receptor	Nombre del gen humano	Nombre del gen de rata	Nombre del gen de ratón
L	$\text{Ca}_v1.1$	<i>CACNA1S</i>	<i>Cacna1s</i>	<i>Cacna1s</i>
L	$\text{Ca}_v1.2$	<i>CACNA1C</i>	<i>Cacna1c</i>	<i>Cacna1c</i>
L	$\text{Ca}_v1.3$	<i>CACNA1D</i>	<i>Cacna1d</i>	<i>Cacna1d</i>
L	$\text{Ca}_v1.4$	<i>CACNA1F</i>	<i>Cacna1f</i>	<i>Cacna1f</i>
P/Q	$\text{Ca}_v2.1$	<i>CACNA1A</i>	<i>Cacna1a</i>	<i>Cacna1a</i>
N	$\text{Ca}_v2.2$	<i>CACNA1B</i>	<i>Cacna1b</i>	<i>Cacna1b</i>

R	Ca _v 2.3	CACNA1E	Cacna1e	Cacna1e
T	Ca _v 3.1	CACNA1G	Cacna1g	Cacna1g
T	Ca _v 3.2	CACNA1H	Cacna1h	Cacna1h
T	Ca _v 3.3	CACNA1I	Cacna1i	Cacna1i

Tabla 1. **Canales de calcio dependientes de voltaje.**

5 Se ha realizado un estudio previo con el fin de analizar la expresión y función de los canales de Ca²⁺ en el útero de rata. La expresión de canales de Ca²⁺ en el útero se ha realizado mediante amplificación por PCR a partir del ADN copia (ADNc), utilizando cebadores específicos para cada uno de los canales descritos en rata. Los resultados obtenidos demuestran que en el útero de

10 animales no preñados, en la fase *estro* del ciclo hormonal, se expresan los canales Ca_v1.1, Ca_v2.1 y los tres canales de la subfamilia Ca_v3 (Figura 1). Entre ellos, cabe destacar la expresión del canal Ca_v1.1, responsable de las corrientes de Ca²⁺ tipo L que se han demostrado como mayoritarias y de carácter esencial en la regulación de la contracción uterina.

15

Paralelamente, se han realizado estudios de contractilidad sobre segmentos aislados de miometrio de rata no preñada, con el fin de estudiar la acción farmacológica de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816**. La adición del compuesto sobre contracciones inducidas por KCl (que son debidas a la

20 entrada de Ca²⁺ a través de canales de tipo L) produjo una relajación dependiente de la dosis, aunque se necesitaron concentraciones muy superiores a las indicadas por Berlink y col. (*J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1007–1015) para la aparición de los efectos. En segmentos uterinos montados en paralelo, la nifedipina mostró una potencia y eficacia muy superior, con una IC₅₀

25 del orden nanomolar (Figura 2).

La adición de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** sobre contracciones inducidas por oxitocina (1 nM) o metacolina (10 μM) no indujo inhibición de las

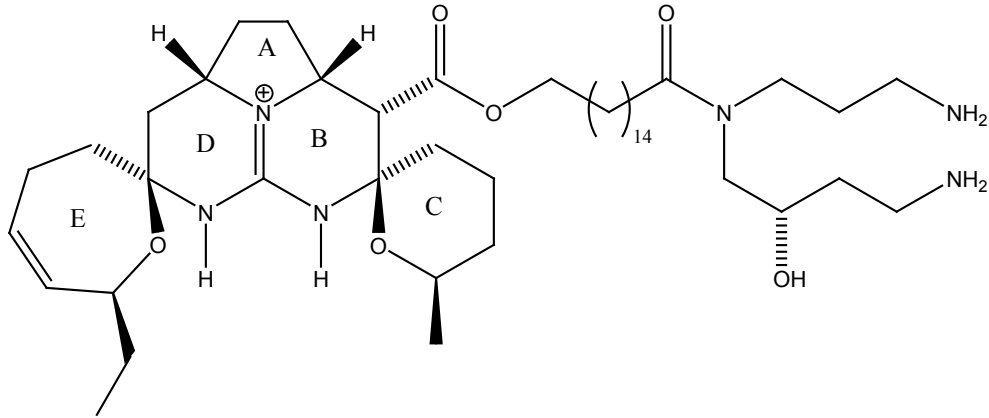
respuestas a estos agonistas. Por el contrario, a concentraciones iguales o superiores a 10 μM , la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** incrementó la contracción previa (Figura 3).

5 Se estudio a continuación los efectos de la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** sobre las respuestas a la veratridina. La adición de veratridina (60 μM) en segmento aislado de útero de rata induce una contracción en la que pueden diferenciarse claramente dos fases. La primera fase, en la que se observan contracciones rítmicas de amplitud y frecuencia irregular y que se extiende
10 durante un periodo de 40–60 min desde la adición del agonista al baño de órganos. En aproximadamente un 30% de los segmentos se produce una remisión completa de la respuesta. Se inicia entonces una segunda fase en la que la veratridina produce contracciones rítmicas de amplitud creciente, manteniéndose una frecuencia de contracción muy regular a lo largo de toda la
15 experiencia. Esta respuesta es totalmente inhibida por la tetrodotoxina, demostrando su dependencia de la apertura de canales de Na^+ para permitir la entrada subsiguiente de Ca^{2+} . Por el contrario, la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** se mostró totalmente incapaz de inhibir la respuesta a la veratridina, lo que demuestra que no es capaz de interaccionar con canales de sodio. De
20 forma similar a lo ocurrido con otros agonistas, la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** a concentraciones superiores a 1 μM , incrementó la contracción previa (Figura 4).

Se analizaron también los efectos inducidos por la mezcla de **crambescidinas**
25 **800 y 816** sobre las contracciones fásicas espontáneas del miometrio (Figura 5). También en este caso, la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** indujo contracciones tónicas dependientes de la concentración. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que la mezcla de **crambescidinas 800 y 816** se comporta como un agonista parcial de canales de calcio dependientes de
30 voltaje, necesitándose estudios más profundos para determinar de forma precisa su mecanismo de acción sobre estos canales.

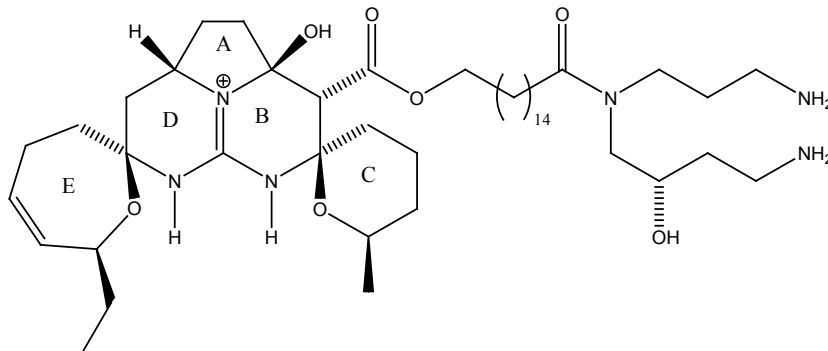
REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de crambescidinas 800 y 816:



5

Crambescidina 800



10

Crambescidina 816

15

en donde dichas crambescidinas están en proporción 1:3.

20 2. La mezcla según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.

3. Una composición farmacéutica o veterinaria, que comprende la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 de la reivindicación 1, junto con uno o más excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables y al menos

un transportador farmacéutica o veterinariamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

4. La composición farmacéutica o veterinaria según la reivindicación 3, que
5 además comprende otro principio activo.

5. La composición farmacéutica o veterinaria según cualquiera de las
reivindicaciones 3 ó 4, la cual se presenta en una forma adaptada a la
administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática,
10 rectal, transdérmica o inhalada.

6. Uso de la mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 de la
reivindicación 1 o de la composición farmacéutica o veterinaria de las
reivindicaciones 3 a 6, para la elaboración de un medicamento.

15 7. El uso según la reivindicación 6, para la fabricación de un medicamento para
el tratamiento o prevención de aneurismas, angina de pecho, aterosclerosis,
ictus cerebral, arritmia cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión arterial,
insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad vascular periférica, cefalea en
20 racimos, migraña, parto prematuro, síndrome de Raynaud y el tétano.

8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, para su administración
parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal,
transdérmica o inhalada.

25 9. Procedimiento de obtención de un extracto que comprende una mezcla de
crambescidinas 800 y 816 que comprende las siguientes etapas:

- a. extracción a partir de la una esponja; y
- b. purificación.

30 10. El procedimiento según la reivindicación 9, donde la etapa de extracción
comprende al menos una etapa de extracción con un disolvente orgánico.

11. El procedimiento según la reivindicación 10, donde se llevan a cabo 3 tipos de extracción con disolvente orgánico.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11, donde
5 cada tipo de extracción se lleva a cabo desde 1 a 4 veces.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con acetona.
- 10 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con dietil éter.
- 15 15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde uno de los 3 tipos de extracciones se lleva a cabo con butanol.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde se llevan a cabo 3 extracciones.
17. El procedimiento según la reivindicación 16, donde la primera extracción se
20 realiza con acetona, la segunda con butanol y la tercera con dietil éter.
18. El procedimiento según la reivindicación 17, donde entre la extracción con acetona y la extracción con butanol se suspende el extracto con agua Mili Q.
- 25 19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18, donde la esponja es *Crambe crambe*.
20. El procedimiento según la reivindicación 9, donde la etapa de purificación comprende hacer pasar el extracto obtenido de la etapa de extracción, por al
30 menos 1 columna cromatográfica.

21. El procedimiento según la reivindicación 20, donde se hace pasar al extracto procedente de la etapa de extracción por 3 columnas cromatográficas.
22. El procedimiento según la reivindicación 21, donde una de las columnas
5 cromatográficas es de tipo Sephadex LH-20.
23. El procedimiento según la reivindicación 21, donde una de las columnas cromatográficas es de tipo XBridge RP 18.
- 10 24. El procedimiento según la reivindicación 21, donde una de las columnas cromatográficas es de tipo μ -Bondapak.
25. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, donde la primera columna es de tipo Sephadex LH-20, la segunda columna por la que se
15 hace pasar el extracto es de tipo μ -Bondapak y la tercera es de tipo XBridge RP 18.
26. Un extracto, mezcla de las crambescidinas 800 y 816, obtenible mediante el
20 procedimiento de las reivindicaciones 9 a 25.
27. El extracto según la reivindicación 26, donde la mezcla de crambescidinas 800 y 816 está en proporción 1:3.
28. El extracto según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, para su uso
25 como medicamento.
29. Una composición farmacéutica o veterinaria, que comprende el extracto según la reivindicación 26, junto con uno o más excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables y al menos un transportador farmacéutica o
30 veterinariamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

30. La composición según la reivindicación 29, donde además comprende otro principio activo.

5 31. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 29 ó 30, donde se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

10 32. Uso del extracto, mezcla de crambescidinas 800 y 816 en proporción 1:3 obtenible por el procedimiento de las reivindicaciones 9 a 25 o de la composición farmacéutica o veterinaria para la elaboración de un medicamento.

15 33. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de de la aneurisma, angina de pecho, aterosclerosis, ictus cerebral, arritmia cardiaca, infarto de miocardio, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca congestiva o enfermedad vascular periférica, cefalea en racimos, migraña, parto prematuro, síndrome de Raynaud y el tétano.

20 34. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, para su administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

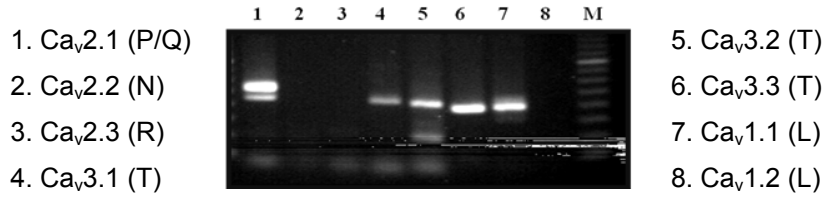


Figura 1

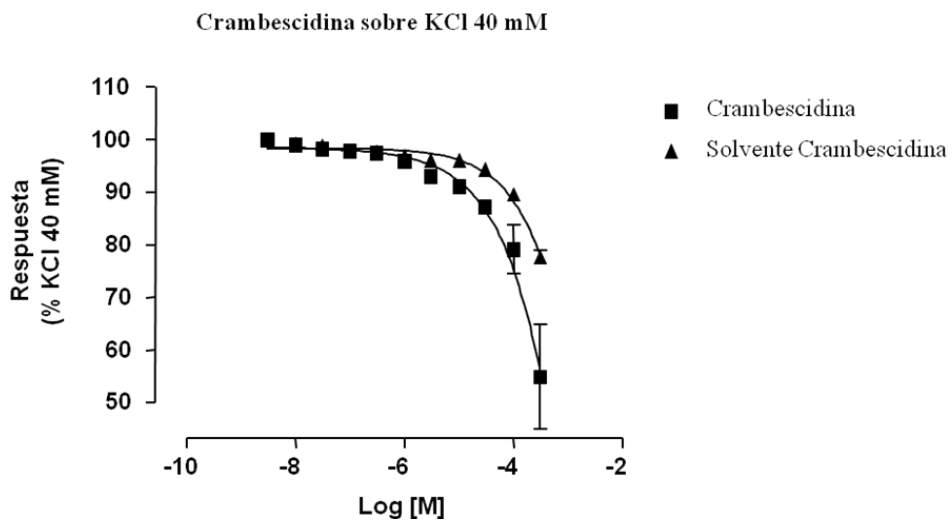


Figura 2A

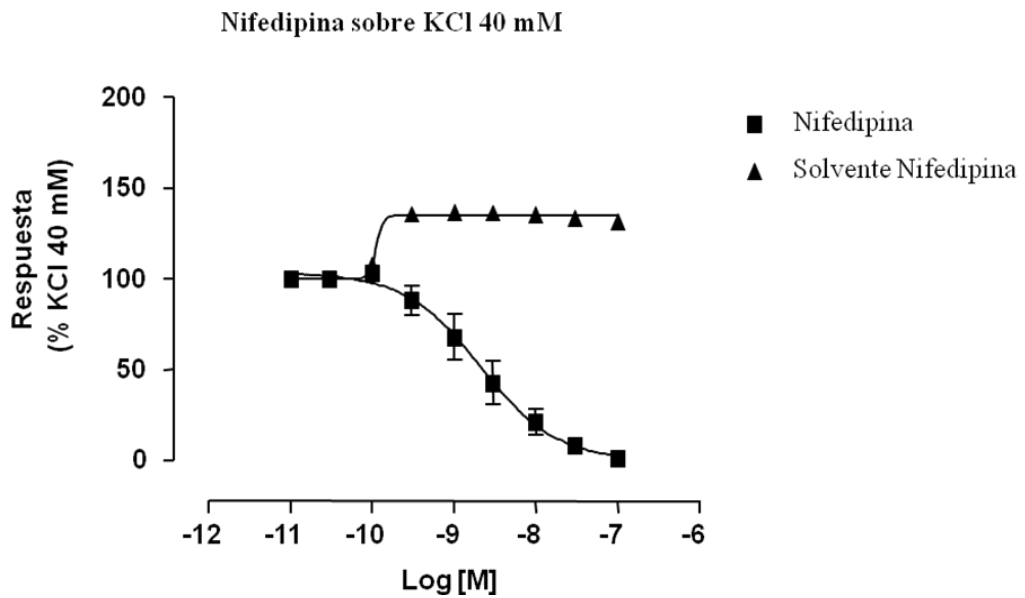


Figura 2B

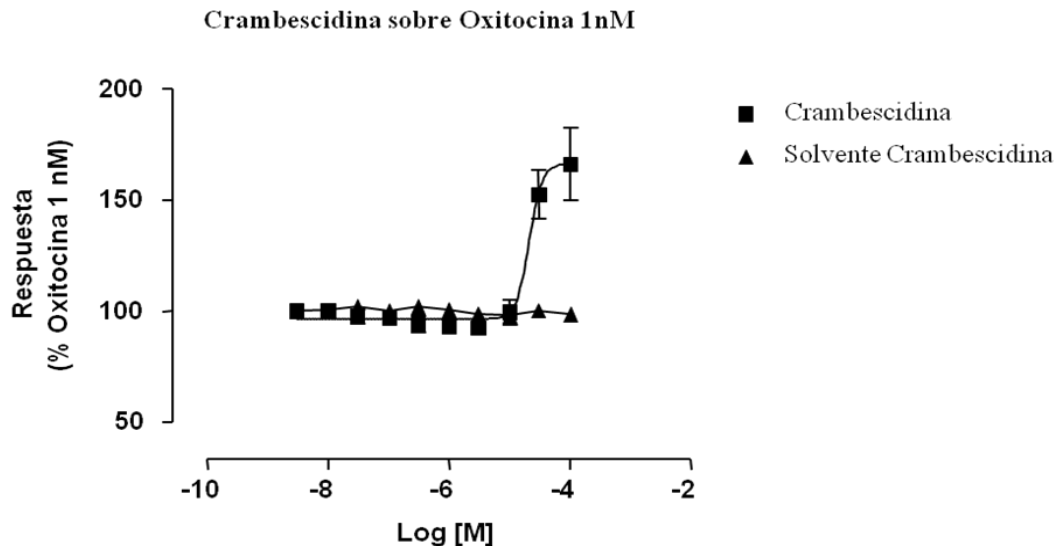


Figura 3A

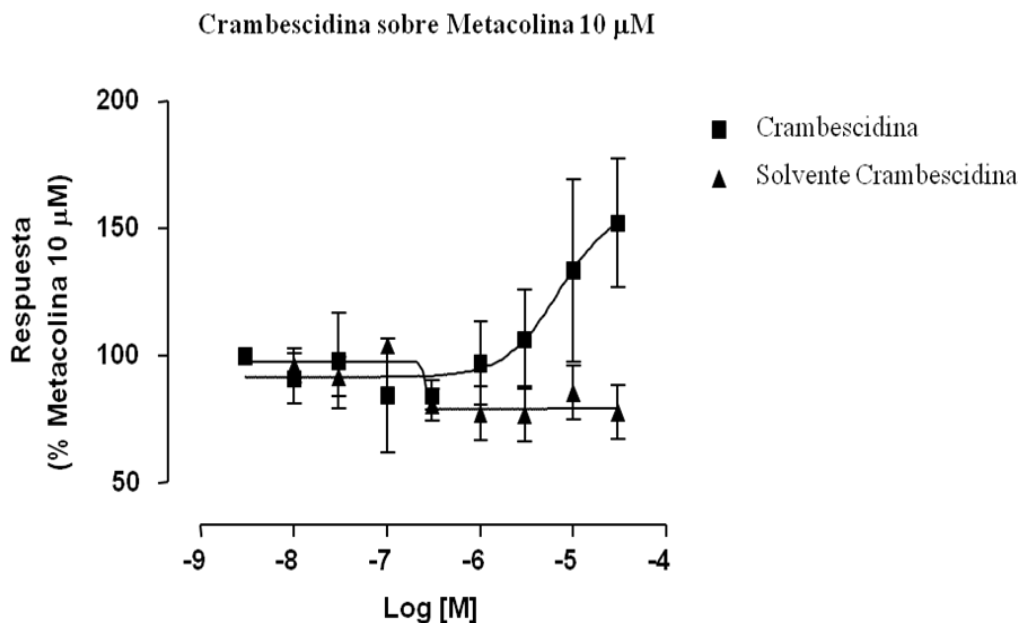


Figura 3B

TTX sobre Veratridina 60 μM

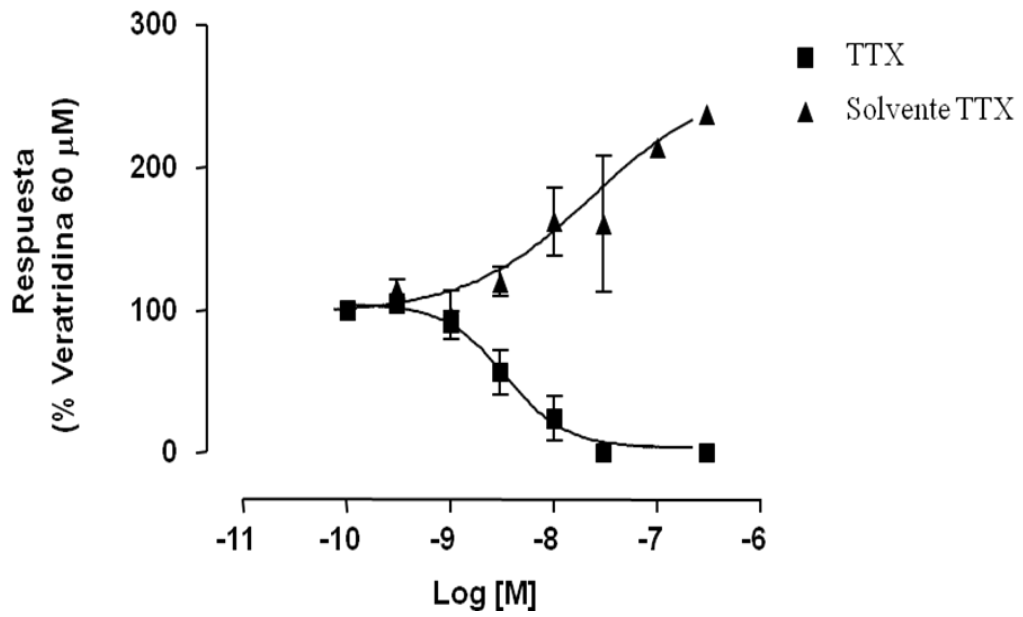


Figura 4A

Crambescidina sobre Veratridina 60 μM

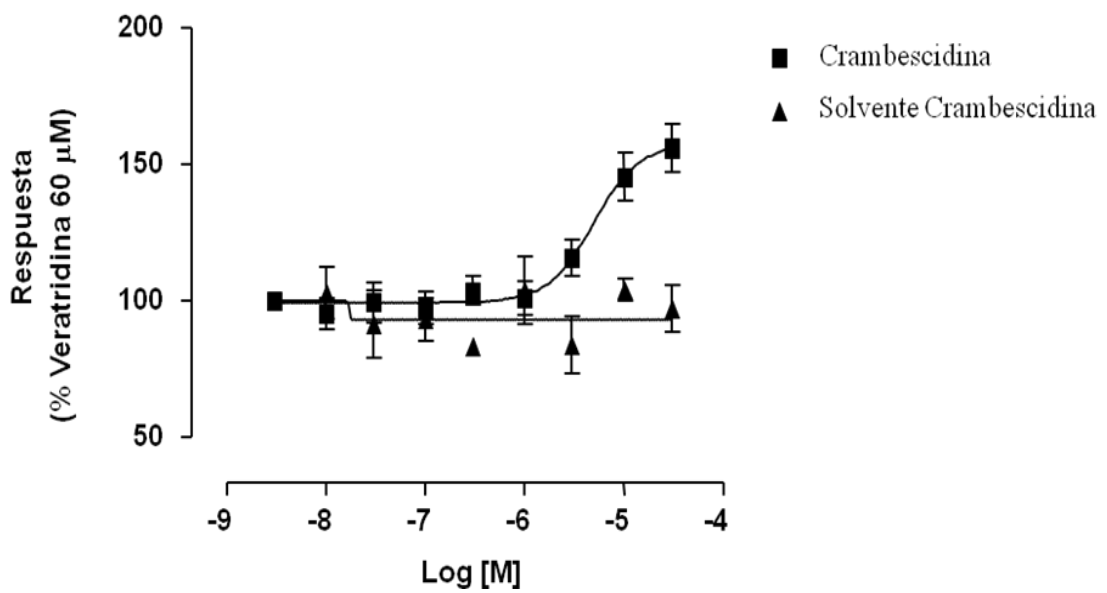


Figura 4B

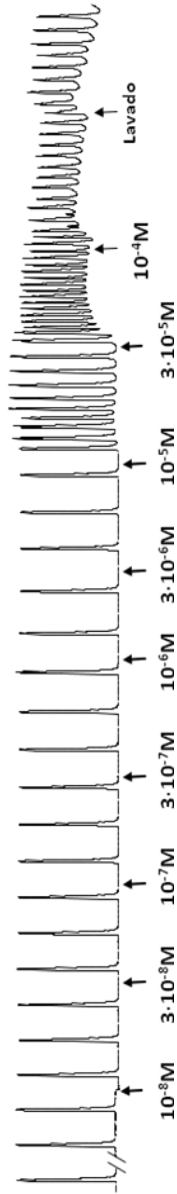


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031734

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07D491/22** (2006.01)
A61K31/527 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	R G S BERLINCK et al., Journal Natural Products 1993, vol 56, nº 7, págs 1007-1015. "Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge Crambe Crambe and Ca++ channel blocker activity of crambescidin 816", página 1007, estructuras 5 y 6, página 1013 parte experimental.	1-34
X	US 5952332 A (PHARMA MAR) 14.09.1999, ejemplo 1.	1,9-28
X	WO 2004028452 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 08.04.2004, todo el documento, en especial reivindicación 50.	2-8,29-34

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 nº:

Fecha de realización del informe
17.11.2011

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-34	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-34	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	R G S BERLINCK et al., Journal Natural Products 1993, vol 56, nº 7, págs 1007-1015. "Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge Crambe Crambe and Ca ⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816", página 1007, estructuras 5 y 6, página 1013 parte experimental.	1993
D02	US 5952332 A (PHARMA MAR)	14.09.1999
D03	WO 2004/028452 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA)	08.04.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a una mezcla 1:3 de las crambescidinas 800 y 816 (reivindicación 1), la composición farmacéutica que comprende dicha mezcla (reivindicación 3) y su uso para fabricar un medicamento útil en el tratamiento de angina, aneurisma, aterosclerosis, infarto de miocardio,... (reivindicaciones 6-8). También se reivindica un procedimiento para la obtención de un extracto que contiene la mezcla de crambescidinas 800 y 816 (reivindicación 9) por extracción con disolventes orgánicos y purificación cromatográfica y el extracto así obtenido (reivindicaciones 26-28) y su uso como medicamento.

El documento D1 divulga el aislamiento y caracterización de crambescidinas 800, 816, 830 y 844 de un extracto de esponja marina (*Crambe crambe*), ver página 1007 segundo párrafo y estructuras (5) y (6) y página 1013 parte experimental. También divulga (página 1013 segundo párrafo) que este tipo de compuestos, y más concretamente la crambescidina 816 tienen actividad antagonista de Ca⁺⁺ y son inhibidores de acetilcolina.

El documento D2 divulga, partiendo de un extracto de *C. crambe*, la separación cromatográfica de una fracción que contiene una mezcla de crambescidinas 800, 816 y 830 (ver ejemplo 1).

El documento D3 divulga, ver reivindicación 50, la actividad inhibidora de los canales de Ca⁺⁺ de las crambescidinas citadas.

En el estado de la técnica expuesto se divulga la mezcla de crambescidinas de la reivindicación 1 y el extracto de la reivindicación 26 de la solicitud (D1 y D2), así como el procedimiento de obtención a partir de un extracto de la esponja por cromatografía en columna (D1 y D2), las particularidades técnicas de las reivindicaciones 10 a 25 de la solicitud no se consideran inventivas puesto que un técnico en la materia utilizaría diferentes tipos de disolventes orgánicos y diferentes tipos de relleno de columnas para optimizar el aislamiento de las fracciones de interés a partir del procedimiento general de utilización de la cromatografía en columna, que es el usado habitualmente para el aislamiento de productos naturales. Tampoco puede reconocerse actividad inventiva al hecho de que la mezcla esté en proporción 1:3 pues es una mera selección entre las diferentes proporciones posibles.

Consecuentemente las reivindicaciones 1 y 26 carecen de novedad y las reivindicaciones 9-25 y 27 de actividad inventiva. Respecto a las reivindicaciones 2-8 y 28-34 carecen asimismo de novedad y actividad inventiva pues la actividad inhibidora de los canales de Ca⁺⁺ está divulgada en los documentos D1 y D3 y es de conocimiento general en farmacología que los antagonistas de los canales de Ca⁺⁺ se usan en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (relacionadas con el músculo cardíaco) tales como angina, hipertensión...

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-34 de la solicitud carecen de novedad y actividad inventiva tal como establecen los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.