

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 237**

51 Int. Cl.:

A61K 31/222 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2006 E 06759410 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1888091**

54 Título: **Uso del oleocantal principal irritante en aceite de oliva, así como compuestos estructural y funcionalmente similares**

30 Prioridad:

09.05.2005 US 679136 P

29.07.2005 US 703565 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.04.2013

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)**

3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200

PHILADELPHIA, PA 19104, US y

MONELL CHEMICAL SENSES CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:

HAN, QIANG;

SMITH, AMOS B., III;

BEAUCHAMP, GARY K.;

BRESLIN, PAUL A. S.;

KEAST, RUSSELL S. J. y

LIN, JIANMING

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 401 237 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

Uso del oleocantal principal irritante en aceite de oliva, así como compuestos estructural y funcionalmente similares.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere al principio activo en el aceite de oliva, denominado oleocantal, y los métodos de uso de oleocantales en productos farmacéuticos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

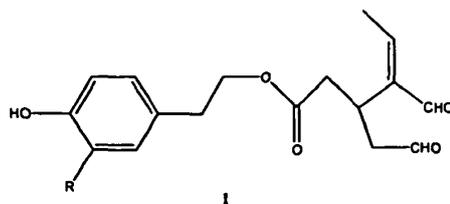
[0002] Hace más de cuarenta años, Fisher y Griffin sugirieron que la cavidad oral humana podría ser considerada como un preparado farmacológico *in situ*. Propusieron que la intensidad del amargor percibido de un compuesto refleja la actividad y la potencia farmacológica del compuesto. Como apoyo a esta idea, señalaron que para varios medicamentos, el isómero activo era más amargo que el inactivo. Existe también una correlación aproximada entre la potencia del amargor de toxinas seleccionados y sus valores LD₅₀.

[0003] Además de la calidad y la intensidad de una sensación, la localización percibida puede tener implicaciones farmacológicas. Muchos compuestos, cuando se colocan en la cavidad oral, provocan irritación (por ejemplo, ardor, escozor, enfriamiento) y, al igual que para el gusto amargo, la irritación puede servir como una señal de peligro potencial.

[0004] Algunos compuestos con irritación en el sitio específico tienen un efecto beneficioso. Un atributo deseable de muchos aceites de oliva premium es la irritación o picor distintivo que es inusual, ya que se perciben de manera casi exclusiva en la faringe y no en la boca.

[0005] En 1993, Montedoro y sus colaboradores informaron sobre el aislamiento de una nueva clase de compuestos fenólicos (1-4), incluidos las formas dialdehídica y aldehídica de ligustrósido (5) y oleuropeína (6) a partir de aceites de oliva vírgenes (Montedoro, G. et al. (1993) J. Agric. Food Chem. 41:2228-2234) (Ver Figura 1 para estructuras). Estos compuestos fenólicos constituyen importantes componentes menores del aceite de oliva virgen que se han implicado en características organolépticas como la amargura, la acritud, y la astringencia (Andrewes, P. et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 57:1415-1420). Además, se han sugerido estos agentes para contribuir a la estabilidad oxidativa del aceite de oliva virgen y, como tal, están asociados con beneficios para la salud de los aceites de oliva, especialmente sus actividades antioxidantes/anticancerosas (Owen, RW et al. (2000) Food Chem. Toxicology 38:647-659; Owen, RW. et al. (2000) Eur. J. Cancer 36(10):1235-1247; Baldioli, M. et al. (1996) J. Am. Oil Chem. Soc. 73(11):1589-1593; Manna, C. et al. (2002) J. Agric. Food Chem. 50(22):6521-6526). Se han divulgado características estructurales similares en los constituyentes del *Jasminum* (Somanadhan, B. et al. (1998) Planta Medica 64:246-50; Takenaka, Y. et al. (2002) Chem. & Pharm. Bull 50(3):384-389) y de especies afines de plantas (Takenaka, Y. et al. (2002) Fitoquímica 59(7):779-787). Se ha demostrado que tanto el ibuprofeno como la dieta mediterránea (es decir, rica en aceite de oliva), disminuye el riesgo/incidencia de cáncer de mama y cáncer de pulmón.

[0006] En 2003, Busch y sus colaboradores en Unilever Investigación y Desarrollo Vlaardingen (Holanda) identificaron aglicona ligustrósido deacetoxidialdehídica como un contribuyente principal a la potente sensación de acritud (ardor) en la parte posterior de la garganta asociada a los aceites de oliva virgen de alta calidad (Andrewes, P. et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 57:1415-1420). Los estudios en Firmenich, Inc., llegaron a la misma conclusión (estudio de Firmenich, Inc.). Se asignó la estructura de 1,

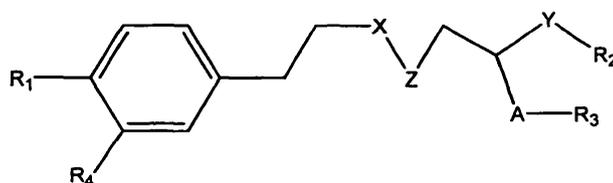


empleando una serie de experimentos 1 y 2D RMN (Andrewes, P. et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 57:14415-1420), En relación con la comparación de datos de la obra (Montedoro, G. et al. (1993) J. Agric. Food Chem. 41:2228-2234). La estereoquímica absoluta seguía siendo incierta. El hecho de que **1** fuera responsable de la fuerte sensación de acritud (ardor) en la parte posterior de la garganta se basó en una amplia serie de análisis del análisis de fracción HPLC, análisis de omisión y correlación, y los estudios de hidrólisis, en conjunto con estudios sensoriales humanos. Andrewes *et al.*, Sin embargo, reconocieron que "un compuesto de coelución que provoca la sensación de ardor" no podía ser eliminado sin completar una síntesis de **1**, que expusieron como "extremadamente difícil".

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] Se facilitan las síntesis enantioselectivas totales de los dos enantiómeros de oleocantal 1 (Figura 1), que no sólo confirman la estructura, sino que también permiten la asignación de la estereoquímica absoluta del aceite de oliva irritante. La síntesis proporciona una vía eficaz para ambos enantiómeros y su posterior evaluación biológica/sensorial. Los estudios demuestran que el (-)- enantiómero levógiro de 1 (Figura 1) es responsable de las propiedades organolépticas experimentadas con los aceites de oliva de primera calidad en la parte posterior de la garganta.

[0008] Se facilita la aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica aislada y purificada, lo que llamamos oleocantal. La invención proporciona derivados funcionales de oleocantal que tienen la fórmula general:



General Formula

en la que:

R₁ y R₄ son independientemente H o O₅
 R₂ y R₃ son independientemente CHO, o COOR₅
 R₅ es un H, alquilo C₁-C₅, o un glicósido
 X es O, NH o CH₂
 Y es C = CHCH₃, o CH-COOR₅
 Z es C = O o CH-OR₅
 A es CH₂, o CH-COOR₅

para uso en el método definido en la reivindicación 1, para uso en la fabricación de un medicamento como se define en la reivindicación 6, y en la composición anti-inflamatoria tal como se define en la reivindicación 11.

[0009] Los compuestos de Fórmula I, incluyendo oleocantal, se denominan colectivamente en este documento como "oleocantales". El término "oleocantal" se refiere específicamente a la aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica.

[0010] Se facilitan métodos de síntesis de los enantiómeros purificados de oleocantal.

[0011] Se facilitan métodos de uso de oleocantales en diversas formulaciones, incluyendo, aditivos alimentarios (por ejemplo, potenciadores del sabor, inhibidores de dulzura, especias, aromas, conservantes); productos farmacéuticos (por ejemplo, antioxidantes, micro-proteína G y los inhibidores de quinasa asociados, inhibidores A β 42, modificadores de la presenilina, inhibidores de γ -secretasa, anti-inflamatorios no esteroides, anti-antipiréticos, analgésicos contra síntomas del resfriado y de la gripe, inhibidores de COX-1, COX-2 y COX-3, inhibidores de la lipooxigenasa, y cicatrizantes); cosméticos; repelentes de animales, y herramientas de descubrimiento de genes receptores de irritación en mamíferos, productos de genes, alelos, variantes de empalme, transcripciones alternativas y similares.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0012] La figura 1 muestra compuestos fenólicos (1-4), incluyendo las formas dialdehídica y aldehídica de ligustrósido (5) y oleuropeína (6).

[0013] La figura 2 muestra un gráfico de la intensidad de irritación de los diversos aceites de oliva trazada frente a sus concentraciones de oleocantal.

[0014] La figura 3 muestra el esquema de síntesis de (-)-oleocantal.

[0015] La figura 4 muestra el esquema de síntesis de (+)-oleocantal.

[0016] La figura 5 muestra el esquema de un Estudio de Relación Estructura-Actividad (SAR).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

- 5 [0017] Las obras de referencia, patentes, solicitudes de patente y obras científicas a las que se hace referencia en la presente memoria establecen el conocimiento de los expertos en la técnica. Cualquier conflicto entre cualquier referencia citada en este documento y las enseñanzas específicas de la presente memoria se resolverá a favor de esta última.
- 10 [0018] En este documento se hacen diversas definiciones. La mayoría de las palabras tienen el significado que atribuiría a esas palabras un experto en la técnica. Las palabras definidas específicamente a continuación o bien en otra parte de este documento tienen el significado proporcionado en el contexto de la presente invención como un todo y como se entiende habitualmente por parte de los expertos en la técnica. Cualquier conflicto entre una definición de una palabra o frase de la técnica entendida y una definición de la palabra o frase como se muestra de manera específica en este documento se resolverá a favor de esta última. Los títulos utilizados en la presente memoria lo son por conveniencia y no deben ser considerados como limitativos.
- 15 [0019] Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de la síntesis química son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Al Vogel, LIBRO DE TEXTO DE QUÍMICA ORGÁNICA PRÁCTICA DE VOGEL (5ª EDICIÓN) Wiley, Nueva York 1989; y SÍNTESIS ORGÁNICAS. 9 volúmenes colectivos; Índice para vol. 1-8; Wiley, NY.
- 20 [0020] Obras de referencia estándar que exponen los principios generales de la tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica incluyen Ausubel et al., PROTOCOLOS ACTUALES EN BIOLOGÍA MOLECULAR, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998; Sambrook et al, CLONACIÓN MOLECULAR: UN MANUAL DE LABORATORIO, 2ª ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, 1989.; Kaufman et al., Eds., MANUAL DE MÉTODOS MOLECULARES Y CELULARES EN BIOLOGÍA Y MEDICINA, CRC Press, Boca Raton, 1995; McPherson, Ed., MUTAGÉNESIS DIRIGIDA: UN ENFOQUE PRÁCTICO, IRL Press, Oxford, 1991.
- 25 [0021], "Percepción del sabor", como se usa aquí, se refiere a una respuesta (por ejemplo, bioquímica, de comportamiento) o sensibilidad a un estímulo de sabor. "Estímulo de sabor", como se utiliza aquí, se refiere a cualquier compuesto que provoca, por ejemplo a nivel bioquímico (por ejemplo, activación o inhibición de un receptor del sabor) o nivel de comportamiento (por ejemplo, preferencia, indiferencia o desagrado), una respuesta de sabor que es percibida por un mamífero como al menos uno de los cinco sabores, incluyendo dulce, salado, amargo, ácido y umami. La "percepción del sabor" o "estímulo de sabor", o variantes de los mismos, no requieren, a pesar de incluirla, la transmisión de una señal neuronal que resulta en una sensación *in vivo* de sabor por parte de un mamífero. La modificación de la percepción del sabor incluye una alteración de (mejora, reducción, o cambio) una respuesta bioquímica, una respuesta ingestivo, una preferencia de sabor, o un comportamiento general de un mamífero en respuesta a un compuesto.
- 30 [0022] "Acilo" se refiere a un grupo alquilo-C=O lineal o ramificado. "Tioacilo" se refiere a un grupo alquilo-C=S lineal o ramificado. Los grupos de acilo y tioacilo preferidos son alcanóilo inferior y tioalcanóilo inferior que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en el grupo alquilo, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de éstos.
- 35 [0023] "Alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático saturado que puede ser lineal o ramificado y que tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de éste. Los grupos alquilo preferidos pueden ser lineales o ramificados y tienen de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono en la cadena. Se entiende por ramificado el grupo alquilo inferior como, por ejemplo, metilo, etilo o propilo, que se une a una cadena lineal de alquilo.
- 40 [0024] "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de éste.
- 45 [0025] "Cicloalquilo" se refiere a un anillo alifático que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el anillo, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de éste. Los grupos cicloalquilo preferidos tienen de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 átomos de carbono en el anillo.
- 50 [0026] "Carbamoilo" se refiere a un grupo $H_2NC=O$. Alquilcarbamoilo y dialquilcarbamoilo son aquellos en los que el nitrógeno del carbamoilo está sustituido por uno o dos grupos alquilo, respectivamente.
- 55 [0027] "Carboxilo" se refiere a un grupo $COOH$.
- 60 [0028] "Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo-O en el que el "alquilo" es como se ha descrito previamente. Los grupos de alcoxi inferior son los preferidos. Los grupos alcoxi ejemplares incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi y n-butoxi.
- 65

- [0029]** "Alcoخالquilo" se refiere a un grupo alquilo, como se ha descrito previamente, sustituido por un grupo alcoxi, también descrito previamente.
- [0030]** "Alcoxicarbonilo" se refiere a un grupo alcoxi-C=O.
- [0031]** "Arilo" se refiere a un radical carbocíclico aromático que contiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro del mismo. Los ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo y naftilo.
- [0032]** Se entiende por "aralquilo" el grupo alquilo sustituido por un radical arilo. "Aralquilo opcionalmente sustituido" y "arilo opcionalmente sustituido" significa que el grupo arilo o el grupo arilo del grupo aralquilo, pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, por ejemplo, alquilo, alcoxi, amino, nitro, carboxi, carboalcoxi, ciano, alquilo amino, halo, hidroxilo, hidroxialquilo, mercaptilo, alquilmercaptilo, trihaloalquilo, carboxialquilo o carbamoilo.
- [0033]** "Aralcoxicarbonilo" se refiere a un grupo aralquil-O-C=O.
- [0034]** "Ariloxicarbonilo" se refiere a un grupo aril-O-C=O.
- [0035]** "Carbalcoxi" se refiere a un sustituyente carboxilo esterificado con un alcohol de la fórmula $C_nH_{2n+1}OH$, en el que n va desde 1 a aproximadamente 6.
- [0036]** "Halógeno" (o "halo") se refiere a cloro, flúor, bromo o yodo. El preferido entre los halógenos (o halos) es el cloro.
- [0037]** "Heterociclilo" se refiere a una estructura de anillo que contiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 miembros en el que uno o más de los átomos en el anillo es un elemento distinto al carbono, por ejemplo, N, O o S. Los grupos heterociclilo pueden ser aromáticos o no aromáticos, es decir, los anillos pueden ser saturados, parcialmente insaturados, o totalmente insaturados. Los grupos heterociclilo preferidos incluyen, por ejemplo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, isoquinolinilo, quinolinilo, quinazolinilo, imidazolilo, pirrolilo, furanilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, piperidinilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo y morfonilnilito.
- [0038]** "Heterociclilo opcionalmente sustituido" significa que el grupo heterociclilo puede estar sustituido por uno o más sustituyentes, en los que los sustituyentes incluyen, por ejemplo, alcoxi, alquilamino, arilo, carbalcoxi, carbamoilo, ciano, halo, heterociclilo, trihalometilo, hidroxilo, mercaptilo, alquilmercaptilo y nitro.
- [0039]** "Hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un grupo hidroxilo. Los grupos de alquilo inferior hidroxilo son los preferidos. Los grupos preferidos ejemplares incluyen, por ejemplo, hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo y 3-hidroxipropilo.
- [0040]** "Catalizador de hidrogenación" se refiere a cualquiera de los compuestos conocidos en la técnica de la síntesis orgánica para facilitar la adición de hidrógeno. Los catalizadores de hidrogenación incluyen, pero sin limitarse a, paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, paladio sobre carbonato de calcio envenenado con plomo y platino sobre carbono.
- [0041]** "Agente de sulfonación" se refiere a cualquiera de los reactivos conocidos en la técnica de la síntesis orgánica para reaccionar con un alcohol y proporcionar un éster de sulfonato. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de metanosulfonilo, anhídrido metanosulfónico, cloruro de sulfonilo trifluorometano, anhídrido trifluorometanosulfónico, cloruro de bencenosulfonilo, cloruro de p-toluenosulfonilo, y anhídrido de p-toluenosulfonilo. "Éster sulfonato" incluye grupos que resultan cuando un agente de sulfonación se lleva a reacción con un alcohol en presencia de un eliminador de ácido para dar un compuesto de la forma-OA, en la que A es SO_2R' , con R' derivando del agente de sulfonación.
- [0042]** "Agente reductor" se refiere a cualquiera de los reactivos conocidos en la técnica de la síntesis orgánica para reducir el estado de oxidación de un átomo de carbono, por ejemplo, mediante la reducción de una cetona a un alcohol. Los agentes reductores incluyen, pero no se limitan a, derivados de hidruro, tales como borohidruros, incluyendo borohidruro de litio y borohidruros de sodio.
- [0043]** "Agente de metilación" se refiere a cualquier reactivo conocido en la técnica de la síntesis orgánica para donar un grupo metilo a un alcohol y formar de ese modo un éter. Los agentes de metilación incluyen, pero no se limitan a metil halidos tales como yoduro de metilo, cloruro de metilo, bromuro de metilo, y sulfato de dimetilo.
- [0044]** "Eliminador de ácido" se refiere a cualquier especie conocida en la técnica de la síntesis orgánica capaz de aceptar un protón sin reaccionar con el material o producto de partida.

- [0045]** "Concatenados" se refiere a procesos de varios pasos (es decir, procesos que contienen dos o más etapas) en donde los pasos se pueden realizar de una manera sustancialmente continua o secuencial, preferiblemente sin la necesidad de aislamiento y/o purificación provisional de los compuestos intermedios.
- 5 **[0046]** "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otras complicaciones problemáticas con una razonable relación beneficio/riesgo.
- 10 **[0047]** "Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica haciendo sales de ácido o de base del mismo. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, minerales o sales de ácidos orgánicos de residuos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Así, el término "sal de adición de ácido" se refiere a la sal correspondiente derivada de un compuesto de origen que ha sido
15 preparada por la adición de un ácido. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, de ácidos no tóxicos inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, y similares. Ciertos compuestos ácidos o básicos pueden existir como zwitteriones. Todas las formas de los compuestos, incluyendo ácido libre, base libre y zwitteriones, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.
- 20 **[0048]** Las reacciones de los métodos sintéticos descritos y reivindicados en la presente memoria se pueden llevar a cabo en disolventes adecuados que pueden ser fácilmente seleccionados por los expertos en la técnica de la síntesis orgánica. En general, los disolventes adecuados son disolventes que son sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios, o los productos a las temperaturas a las que las reacciones se
25 llevan a cabo, es decir, temperaturas que pueden oscilar desde la temperatura de congelación del disolvente a la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la reacción particular, se pueden seleccionar los disolventes adecuados para un determinado trabajo en marcha después de la reacción. Los disolventes adecuados, como se usan en la presente memoria, pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, disolventes clorados, disolventes de hidrocarburos, disolventes aromáticos, disolventes de éter, disolventes próticos, disolventes apróticos polares, y mezclas de los
30 mismos.
- [0049]** Los disolventes halogenados adecuados incluyen, pero no se limitan a tetracloruro de carbono, bromodichlorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano, hexafluorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, o-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, fluorotriclorometano, clorotrifluorometano, bromotrifluorometano, tetrafluoruro de carbono, diclorofluorometano, clorodifluorometano, trifluorometano, 1,2-diclorotetrafluoroetano y hexafluoroetano .
- 40 **[0050]** Los disolventes hidrocarbúricos apropiados incluyen, pero no se limitan a, disolventes de alcano o aromáticos tales como ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o-, o p-xileno octano, indano, nonano, benceno, etilbenceno, y m-, o-, o p-xileno.
- [0051]** Los disolventes de éter adecuados incluyen, pero no se limitan a, dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, éter dietílico, éter dimetílico de etilenglicol, éter dietílico de etilenglicol, éter dimetílico de dietilenglicol, éter dietílico de dietilenglicol, éter diisopropílico de trietilenglicol, anisol o éter metílico de t-butilo.
- 50 **[0052]** Los disolventes próticos incluyen, pero no se limitan a, agua, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilenglicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, i-butilo, alcohol t-butílico, 2-etoxietanol, dietilenglicol, 1-, 2-, o 3-pentanol, alcohol neo-pentílico, alcohol t-pentílico, éter monometílico de dietilenglicol, éter monoetílico de dietilenglicol, ciclohexanol, alcohol bencílico, fenol y glicerol.
- 55 **[0053]** Los disolventes apróticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), propionitrilo, formiato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de t-butilo, sulfolano, N, N-dimetilpropionamida, nitrometano, nitrobenceno y hexametilsfosforamida.
- 60 **[0054]** El término "forma sustancialmente pura", como se usa aquí, significa que los compuestos preparados mediante los presentes procedimientos pueden estar preferiblemente y de manera sustancial libres de impurezas
- 65

orgánicas. El término "impurezas orgánicas", como se utiliza aquí, se refiere a materiales orgánicos, compuestos, etc., distintos al producto deseado, que puede asociarse habitualmente con las transformaciones químicas sintéticas orgánicas incluyendo, por ejemplo, reactivos de partida que no han sido llevados a reacción, compuestos intermedios sin reaccionar, y similares. De manera preferida, los presentes procedimientos pueden proporcionar compuestos que son puros al menos aproximadamente al 75%, según lo determinado por las técnicas analíticas convencionales tales como, por ejemplo, HPLC. Preferiblemente, los compuestos preparados mediante los presentes procedimientos puede ser puro al menos aproximadamente al 80%, más preferiblemente con una pureza de al menos aproximadamente el 85%, incluso más preferiblemente, los compuestos preparados mediante los presentes procedimientos pueden ser puros al menos aproximadamente al 90%, siendo más preferida una pureza de al menos aproximadamente el 95%. En formas particularmente preferidas, los compuestos preparados mediante los presentes procedimientos pueden tener una pureza de más de aproximadamente el 95%, siendo especialmente preferida una pureza de aproximadamente el 100%.

[0055] Habitualmente, los restos químicos sustituidos incluyen uno o más sustituyentes que sustituyen al hidrógeno. Los sustituyentes ejemplares incluyen, por ejemplo, halo (por ejemplo, F, Cl, Br, I), alquilo, alqueno, alquino, aralquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo (OH), nitro (NO₂), Nitrosilo (NO), ciano (CN), cianato (CNO), tiocianato (SCN), amino (por ejemplo, NH₂, NHR', NR'₂), Azido (N₃), Carboxilo (COOH), C(O)R', OR', C(O)OR', NHC(O)R', aminocarbonilo, tiol, tiolato (SR'), ácido sulfónico (SO₃H), ácido fosfónico (PO₃H), SO₂R', fosfino (PH₂, PHR'PR'₂), sililo (SiR'₃, SiHR'₂, SiH₂R', SiH₃) y similares. En relación con los sustituyentes mencionados anteriormente, cada resto R' pueden ser, independientemente, cualquiera de los siguientes: H, alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o heterociclilo, por ejemplo.

[0056] Los presentes procesos pueden producir mezclas de diastereómeros. Así, en algunas formas, los procesos pueden, si se desea, incluir una etapa de separación para aislar diastereómeros. Los métodos para la separación de diastereoisómeros son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía en columna quirral, recristalización HPLC, o métodos clásicos de resolución que implican reactividad selectiva. En algunas formas, la síntesis asimétrica se puede usar para producir un diastereómero específico.

[0057] Como se usa en este documento, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico e incluye ADN genómico, ADNc, ARN, ARNm, polímeros mixtos, ácidos nucleicos recombinantes, fragmentos y variantes de los mismos, y similares. Los fragmentos de polinucleótido incluyen por lo menos 10, y preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, o 100 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido de referencia. Los polinucleótidos incluyen cadenas de sentido y antisentido. Los polinucleótidos pueden ser de origen natural o de origen no natural. Un "polinucleótido sintetizado", como se utiliza aquí, se refiere a polinucleótidos producidos por de manera totalmente química, en contraposición a los métodos enzimáticos. Las secuencias de ADN "totalmente" sintetizadas están por lo tanto producidas enteramente por medios químicos, y los ADNs "parcialmente" sintetizados adoptan aquellas en las que sólo partes del ADN resultante fueron producidas por medios químicos. Los polinucleótidos pueden ser de cadena simple o doble. Los polinucleótidos pueden estar químicamente modificados y pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas como se apreciará fácilmente por los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más nucleótidos con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como uniones sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos, etc), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, agentes alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos son sustituidos por enlaces de fosfato en la cadena principal de la molécula.

[0058] "Ácido nucleico recombinante" es un ácido nucleico generado por la combinación de dos segmentos de la secuencia de nucleótidos. La combinación puede ser, por ejemplo, por medios químicos o por ingeniería genética.

[0059] Como se usa en la presente memoria, "amplificación de polinucleótidos" se refiere a una amplia gama de técnicas para aumentar el número de copias de secuencias específicas de polinucleótidos. Habitualmente, la amplificación de una o ambas cadenas del ácido nucleico diana incluye el uso de uno o más enzimas modificadores de ácido nucleico, tales como una ADN polimerasa, ligasa, ARN polimerasa, o transcriptasa inversa dependiente de ARN. Los ejemplos de amplificación de polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (RVR), replicación autosostenida de secuencia (3SR), activación por desplazamiento de cadena (SDA), reacción en cadena de la ligasa, sistema de replicasa Q β , y similares. Una amplia variedad de metodologías de clonación alternativa y amplificación *in vitro* son bien conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos de estas técnicas se pueden encontrar en, por ejemplo, Berger et al., Guía de Técnicas de Clonación Molecular, MÉTODOS EN ENZIMOLOGÍA 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger).

[0060] Como se usa aquí, el término "primer" o "oligonucleótido" se refiere a una serie de residuos de nucleótidos unidos que tienen un número suficiente de bases para ser utilizados en una reacción en cadena de la polimerasa

- (PCR). Esta secuencia corta se basa en (o están diseñados a partir de) una secuencia genómica o de ADNc y se utiliza para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos incluyen porciones de una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 50 nucleótidos, a menudo aproximadamente de 12 o 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. Estos se sintetizan químicamente y pueden ser utilizados como sondas. "Par de cebadores" se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un "cebador secuencia arriba que se hibrida con el 5 extremo 5' de una secuencia diana a amplificar y un cebador secuencia abajo que se hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia diana a amplificar.
- [0061]** Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos de longitud variable, por ejemplo, entre al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 8.500, dependiendo del uso. Las sondas se utilizan en la detección de secuencias diana idénticas, similares o complementarias de ácido nucleico, en las que las secuencias diana pueden ser de una sola cadena o de doble cadena. Las sondas más largas se obtienen normalmente de una fuente natural o recombinante, son altamente específicas, y son mucho más lentas en la hibridación de oligómeros, o sondas más cortas. Estas pueden ser de una sola cadena o de doble cadena y se diseñan cuidadosamente para tener especificidad en la PCR, hibridación en membrana, o tecnologías similares a ELISA.
- [0062]** Como se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda, cebador, u oligonucleótido se hibridará con su secuencia diana, pero en un número mínimo de secuencias o sin otras secuencias. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes dependiendo de las circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan con especificidad a sus complementos adecuados a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) Para la secuencia específica con fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana están presentes generalmente en exceso, a T_m , el 50% de las sondas se hibridan a sus complementos en equilibrio. Las condiciones rigurosas de temperatura incluirán generalmente temperaturas superiores al 30 °C, habitualmente superior a 37 °C, y puede ser incluso superior a 45 °C. Las condiciones rigurosas de sal serán por regla general menos de 1,0 M, habitualmente menos de 0,5 M, y pueden ser inferiores a 0,2 M. Habitualmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M de ión de sodio, de forma habitual entre aproximadamente 0,01 y 1,0 M de ion de sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y cuya temperatura es al menos aproximadamente de 30°C para sondas cortas, cebadores, o oligonucleótidos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas más largas, cebadores, o oligonucleótidos. Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes, como formamida.
- [0063]** Tal como se utiliza en la presente memoria "oligonucleótido antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos diana de interés y se hibrida específicamente a la secuencia de nucleótidos diana en condiciones fisiológicas. El término "ARN de doble cadena" o "ARNbc", como se utiliza aquí, se refiere a una molécula de ARN bicatenario capaz de interferir en el ARN, incluyendo ARN pequeño interferente (ARNip) (véase, por ejemplo, Bass (2001) Nature 411:428-429; Elbashir et al. (2001) Nature, 411:494-498).
- [0064]** Como se usa aquí, el término "complementario" se refiere al emparejamiento entre bases de Watson-Crick entre unidades de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico.
- [0065]** El término "gen marcador" o "gen indicador" se refiere a un gen que codifica un producto que, cuando se expresa, confiere un fenotipo en el nivel físico, morfológico, bioquímico o en una célula transformada que es fácilmente identificable, ya sea directa o indirectamente, por técnicas estándar e incluye, pero no se limita a, genes que codifican proteínas que confieren resistencia a las toxinas o antibióticos tales como ampicilina, neomicina, metotrexato, y genes que codifican proteínas que complementan las deficiencias auxotróficas, así como los genes que codifican proteínas que suministran los componentes críticos no disponibles a partir de materiales complejos. Los ejemplos de genes marcadores incluyen la proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (DsRed), fosfatasa alcalina (AP), β -lactamasa, acetiltransferasa cloranfenicol (CAT), adenosina desaminasa (ADA), fosfotransferasa aminoglucósido (NeoR, G418r) dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (TK), lacZ (que codifica la β -galactosidasa), β -lactamasa, luciferasa (luc), y xantina guanina fosforibosiltransferasa (XGPRT). Al igual que con muchos de los procedimientos estándar, los expertos en la técnica serán conscientes de las secuencias adicionales que pueden servir a la función de un marcador o indicador. Por lo tanto, esta lista tiene meramente la intención de mostrar ejemplos de lo que se puede utilizar y no pretende limitar la invención.
- [0066]** Tal como se utiliza aquí, el término "promotor" se refiere a un elemento regulador que regula, controla o dirige la expresión de una molécula de ácido nucleico de interés y que se puede derivar de fuentes tales como adenovirus, SV40, parvovirus, virus vaccinia, citomegalovirus, o ADN genómico de mamífero. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen, pero no están limitados a, CMV, MSH2, trp, lac, fago, y promotores de ARNt. Los

promotores adecuados que se pueden usar en levadura incluyen, pero no se limitan a, promotores constitutivos tales como quinasa 3-fosfoglicerato y otros varios promotores glicolíticos de genes de enzimas tales como la enolasa o deshidrogenasa gliceraldehídos-3-fosfato, o promotores inducibles tales como el promotor de deshidrogenasa de alcohol 2 o el promotor de metalotionina. De nuevo, como con muchos de los procedimientos estándar, los expertos en la técnica estarán al tanto de promotores adicionales que puedan servir en la función de dirigir la expresión de un marcador o indicador. Por lo tanto, la lista tiene meramente la intención de mostrar ejemplos de lo que se puede utilizar.

[0067] "Unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes están en una relación funcional. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido o conectado a una secuencia codificante si controla la transcripción o expresión de la secuencia.

[0068] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria. "Polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos sin hacer referencia a una longitud específica. Los polipéptidos incluyen fragmentos de péptidos, derivados, y proteínas de fusión. Los fragmentos peptídicos tienen preferiblemente al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 aminoácidos. Algunos de los fragmentos peptídicos son biológicamente activos. Las actividades biológicas incluyen la inmunogenicidad, la unión del ligando, y la actividad asociada con el péptido de referencia. Los péptidos inmunogénicos y sus fragmentos generan una respuesta inmune específica al epítipo, en la que "epítipo" se refiere a un determinante inmunogénico de un péptido y contiene preferiblemente al menos tres, cinco, ocho, nueve, diez, quince, veinte, treinta, cuarenta, cuarenta y cinco, o cincuenta aminoácidos. Algunos de los péptidos inmunogénicos generan una respuesta inmune específica para ese péptido. Los polipéptidos incluyen péptidos de origen natural y no natural. El término incluye polipéptidos modificados (en los que los ejemplos de tales modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, fosforilación, carboxilación, ubiquitinación, marcado, etc.), análogos (como los aminoácidos de origen no natural, enlaces sustituidos, etc.), y miméticos funcionales. Varios métodos para marcado de polipéptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen isótopos radiactivos tales como ^{32}P o ^{35}S , ligandos que se unen a antiligandos marcados (por ejemplo, anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y antiligandos.

[0069] Tal como se utiliza aquí, el término "aminoácido" se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. En algunas formas, los aminoácidos son α -, β -, γ - o δ -aminoácidos, incluyendo sus estereoisómeros y racematos. Tal como se utiliza aquí, el término "L-aminoácido" se refiere a un ácido α -aminoácido que tiene la configuración L alrededor del α -carbono, es decir, un ácido carboxílico de fórmula general $\text{CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$ -(cadena lateral), que tiene la configuración L. El término "D-aminoácido" igualmente denota un ácido carboxílico de fórmula general $\text{CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$ -(cadena lateral), que tiene la configuración D alrededor del α -carbono. Las cadenas laterales de los L-aminoácidos de origen natural y no natural incluyen restos. Las cadenas laterales de aminoácidos de origen no natural (es decir, antinatural) son restos que se usan en lugar de cadenas laterales de aminoácidos de origen natural en, por ejemplo, análogos de aminoácidos. Los sustituyentes de amino ácidos pueden estar unidos, por ejemplo, a través de sus grupos carbonilo por medio del carbono carbonilo u oxígeno de los mismos, o a través de sus grupos amino, o bien por medio de funcionalidades que residen en sus porciones de cadena lateral.

[0070] Las secuencias de aminoácidos se presentan en el amino (N) para carboxi (C), de izquierda a derecha. El grupo α -amino N-terminal y los grupos β -carboxi C-terminal se representan en la secuencia. Las secuencias de nucleótidos se presentan solamente por cadenas simples, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha. Los nucleótidos y aminoácidos se representan de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, los aminoácidos también pueden estar representados por sus código de designación de tres letras.

[0071] Tal como se utiliza aquí, el término "unión" se refiere a la interacción física o química entre dos proteínas, proteínas compuestas o asociadas, y compuestos o combinaciones de los mismos. La unión incluye enlaces de hidrógeno iónicos y no iónicos, interacciones hidrófobas de van der Waals, etc. La interacción física, la unión, puede ser directa o indirecta, siendo indirecta a través de o debido a los efectos de otra proteína o compuesto. La unión directa se refiere a interacciones que no tienen lugar a través de o debido al efecto de otra proteína o compuesto, sino que se producen sin otros intermediarios químicos sustanciales. La unión se puede detectar muchas maneras diferentes. Como un ejemplo no limitante, la interacción física unión entre dos moléculas puede detectarse usando un compuesto marcado. Otros métodos de detección de la unión son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0072] Tal como se utiliza aquí, el término "poner en contacto" significa juntar, ya sea directamente o indirectamente, un compuesto en proximidad física con una molécula de interés. El contacto puede tener lugar, por ejemplo, en cualquier número de tampones, sales, soluciones, o en una célula o extracto celular.

[0073] Como se usa aquí, los términos "modula" o "modifica" significa un aumento o disminución en la cantidad, calidad, o efecto de una actividad particular o proteína. "Moduladores" se refiere a moléculas inhibitoras o cualquier activador identificado utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para, por ejemplo, agonistas, antagonistas, y sus homólogos, incluyendo fragmentos, variantes, y miméticos, tal como se definen en la presente memoria, que ejercen sustancialmente la misma actividad biológica que la molécula. "Inhibidores" o "antagonistas" son compuestos de modulación que reducen, disminuyen, bloquean, previenen o retrasan la activación, inactivan, sensibilizan, o

- sobrerregulan negativamente la actividad biológica o expresión de una molécula o vía de interés. "Inductores", "activadores" o "agonistas" son compuestos de modulación que aumentan, inducen, estimulan, abren, activan, facilitan, o potencian la activación, sensibilizan, o sobrerregulan una molécula o vía de interés. En algunas formas preferidas, el nivel de inhibición o regulación al alza de la expresión o la actividad biológica de una molécula o vía de interés se refiere a una disminución (inhibición o regulación a la baja) o aumento (sobrerregulación) de más de aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. La inhibición o regulación por incremento puede ser directa, es decir, opera en la misma molécula o vía de interés, o indirecta, es decir, opera en una molécula o secuencia que afecta a la molécula o la vía de interés.
- 5
- 10 **[0074]** Un polinucleótido o polipéptido "purificado" o "sustancialmente purificado" está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente a un ácido nucleico o polipéptido nativo (o de tipo salvaje) de otras impurezas (por ejemplo, Gel de agarosa). Un polipéptido purificado o proteína incluirá de aproximadamente un 60% a más del 99% w/w de una muestra, y puede tener una pureza de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 98%. Como se usa aquí, el término "aislado" se refiere a una
- 15 molécula que se ha eliminado de su entorno nativo. Ejemplos de moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector, moléculas de ADN recombinante mantenidas en una célula huésped heteróloga, moléculas de ácidos nucleicos parcial o sustancialmente purificadas y moléculas de ARN o ADN sintético.
- 20 **[0075]** "Aproximadamente" como se utiliza aquí se refiere a un 10%+/- del valor de referencia.
- [0076]** Como se usa en este documento, las secuencias de nucleótidos o aminoácidos "variantes" se refieren a homólogas, incluyendo, por ejemplo, isoformas, variantes de especies, variantes alélicas, y fragmentos de la secuencia de interés. "Secuencia de nucleótidos homóloga" o "secuencia de aminoácidos homóloga", o variaciones del mismo, se refiere a secuencias caracterizadas por una identidad relativa, a nivel de nucleótidos con respecto a una secuencia de referencia, o una homología a nivel de aminoácidos, de al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 81%, al menos aproximadamente un 82%, al menos aproximadamente un 83%, al menos aproximadamente un 84%, al menos aproximadamente un 85%, preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 98%, o de al menos aproximadamente un 99%, y más preferiblemente un 100%, a una secuencia de referencia, o una porción o fragmento de la misma que codifica o que tiene un dominio funcional.
- 25
- 30
- [0077]** "inserciones", "sustituciones" o "supresiones" de aminoácidos son cambios en o dentro de una secuencia de aminoácidos. La variación permitida en una secuencia de aminoácidos particular puede estar determinada experimentalmente mediante la producción del péptido de manera sintética o mediante la realización sistemática de inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico utilizando técnicas de ADN recombinante. Las alteraciones de la secuencia natural de aminoácidos se pueden lograr por cualquiera de una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en el polinucleótido que codifica un polipéptido en lugares particulares mediante procedimientos bien conocidos para un experto en la técnica, como la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos.
- 35
- 40
- [0078]** Una variante química de la presente invención puede presentar sustancialmente la actividad biológica de una forma natural de oleocantal, o contar con una actividad mejorada. "Actividad biológica", como se utiliza aquí, se refiere al nivel de una función particular (por ejemplo, actividad antioxidante, actividad anti-inflamatoria, etc) de una molécula o vía de interés en un sistema biológico. "Actividad biológica de tipo salvaje" se refiere al nivel normal de la función de una molécula o vía de interés. "Actividad biológica reducida" se refiere a una disminución del nivel de función de una molécula o vía de interés en relación con un nivel de referencia de la actividad biológica de la molécula o vía. "Aumento de la actividad biológica" se refiere a un aumento del nivel de la función de una molécula o vía de interés en relación con un nivel de referencia de la actividad biológica de la molécula o vía. Por ejemplo, el aumento de la actividad biológica puede referirse a un mayor nivel de actividad biológica en relación con la actividad biológica de tipo salvaje de una molécula o vía de interés. La referencia a mostrar "de manera sustancial la actividad biológica del oleocantal de origen natural" indica que las variantes dentro del alcance de la invención pueden incluir sustituciones, lo que significa que uno o más restos químicos de oleocantal se sustituyen por restos químicos diferentes y tales compuestos retienen la actividad biológica de oleocantal, tienen sustancialmente las mismas actividades biológicas de oleocantal, o han mejorado la actividad biológica en comparación con el oleocantal de origen natural.
- 45
- 50
- 55
- [0079]** Una secuencia de nucleótidos y / o aminoácidos de una molécula de ácido nucleico o polipéptido identificado por el método de cribado aquí mencionado se puede usar para buscar una banco de datos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para las regiones similares utilizando Gapped BLAST (Altschul, et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25:3389). En pocas palabras, el algoritmo BLAST, que significa Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica, es adecuado para determinar la similitud de secuencia (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). El software o la realización de los análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología. Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencia de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que, o
- 60
- 65

bien corresponden o satisfacen algunos umbrales de puntuación de valor positivo de T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T es el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). Estos resultados iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contienen. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene cuando: (1) la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; (2) la puntuación acumulativa tiende a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o (3) al final de cada secuencia. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915-10919) Alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST (Karlin, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5877) y Gapped BLAST realizan un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos, se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un gen o ADNc si la probabilidad de suma más pequeña comparando el ensayo de ácido nucleico con el de ácido nucleico de referencia es menos de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

[0080] El término "mimético" como se utiliza aquí se refiere a un compuesto que es estéricamente similar a un compuesto de referencia. Los miméticos son equivalentes estructurales y funcionales en los compuestos de referencia.

[0081] Los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente en este documento e incluyen, pero no se limitan a, los anfibios, pájaros, perros, gatos, ganado, caballos, búfalos, llamas, ovejas, cabras, cerdos, roedores, monos, simios, y seres humanos. "Célula huésped" incluye, por ejemplo, células procariotas, tales como células bacterianas, células eucariotas, tales como células de levaduras y células animales, incluyendo, pero sin limitarse a, células de invertebrados (por ejemplo, células de insectos y células de nematodos), células de anfibio (por ejemplo, células de rana), especialmente células de mamíferos (por ejemplo, de humano, roedor, canino, felino, caprino, ovino, bovino, equino, porcino, simio), o células de plantas. Los "roedores" incluyen, por ejemplo, ratas y ratones. Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, pero sin limitarse a, ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), N1E-115 (Liles et al., (1986) J. Biol. Chem. 261:5307-531312), células de carcinoma hepatocelular humano PC (por ejemplo, Hep G2).

[0082] El término "tratamiento" como se usa aquí, se refiere a cualquier indicio de éxito de la prevención, tratamiento, o alivio de una enfermedad o condición. El tratamiento incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo, como pueden ser, pero sin limitarse a, el abatimiento, la remisión, la normalización de la actividad del receptor, la reducción en el número o la gravedad de los síntomas o efectos secundarios, o la desaceleración de la velocidad de degeneración o empeoramiento del paciente. El tratamiento también incluye la prevención de la aparición de los síntomas en un paciente que puede tener un mayor riesgo, o del que se sospecha que tenga una enfermedad o afección pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la misma.

[0083] Como se usa aquí, el término "compuesto" se refiere a cualquier producto químico o molécula identificable, incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula pequeña, péptido, proteína, azúcar, ácido de nucleótidos, o ácidos nucleicos. Tal compuesto puede ser natural o sintético.

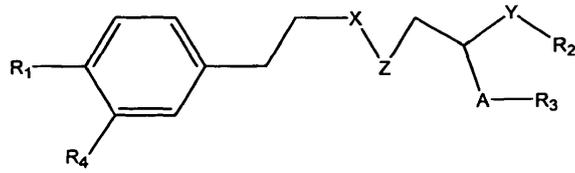
[0084] Como se usa aquí, "amargo" se refiere a un sabor básico caracterizado por soluciones de compuestos tales como quinina, cafeína, y otros alcaloides, que se detecta en los humanos principalmente por las papilas gustativas en la parte posterior de la lengua, y que se percibe como punzante, ácido, picante o áspero.

[0085] Como se usa en la presente memoria, "dulce" se refiere a un sabor básico caracterizado por soluciones de azúcares (por ejemplo, sacarosa y glucosa), alcoholes, glicoles, algunas moléculas pequeñas y algunos aminoácidos, que se detecta en los humanos principalmente por las papilas gustativas en la punta de la lengua, y que se percibe como agradable o placentero.

[0086] En la presente memoria, "ácido" se refiere a un sabor básico caracterizado por las soluciones de vinagre y el jugo de la mayoría de los frutos verdes con sabor ácido, agrio, o cortante.

[0087] Los oleocantales tienen la fórmula general:

5



General Formula

10 en la que:

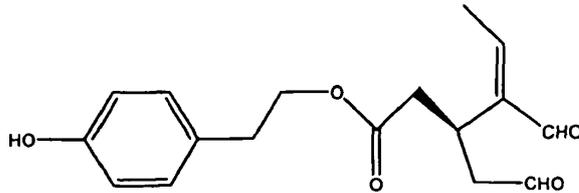
- R₁ y R₄ son independientemente H o O₅
- R₂ y R₃ son, independientemente, CHO, o COOR₅
- R₅ es un H, alquilo C₁-C₅, o un glicósido
- X es O, NH o CH₂
- Y es C=CHCH₃, o CH-COOR₅
- Z es C=O o CH-OR₅
- A es CH₂, o CH-COOR₅

15

20

[0088] "Oleocantal" es específicamente aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica, que existe como un único isómero (enantiómero). El (-)-enantiómero es el producto natural y tiene la siguiente fórmula química:

25



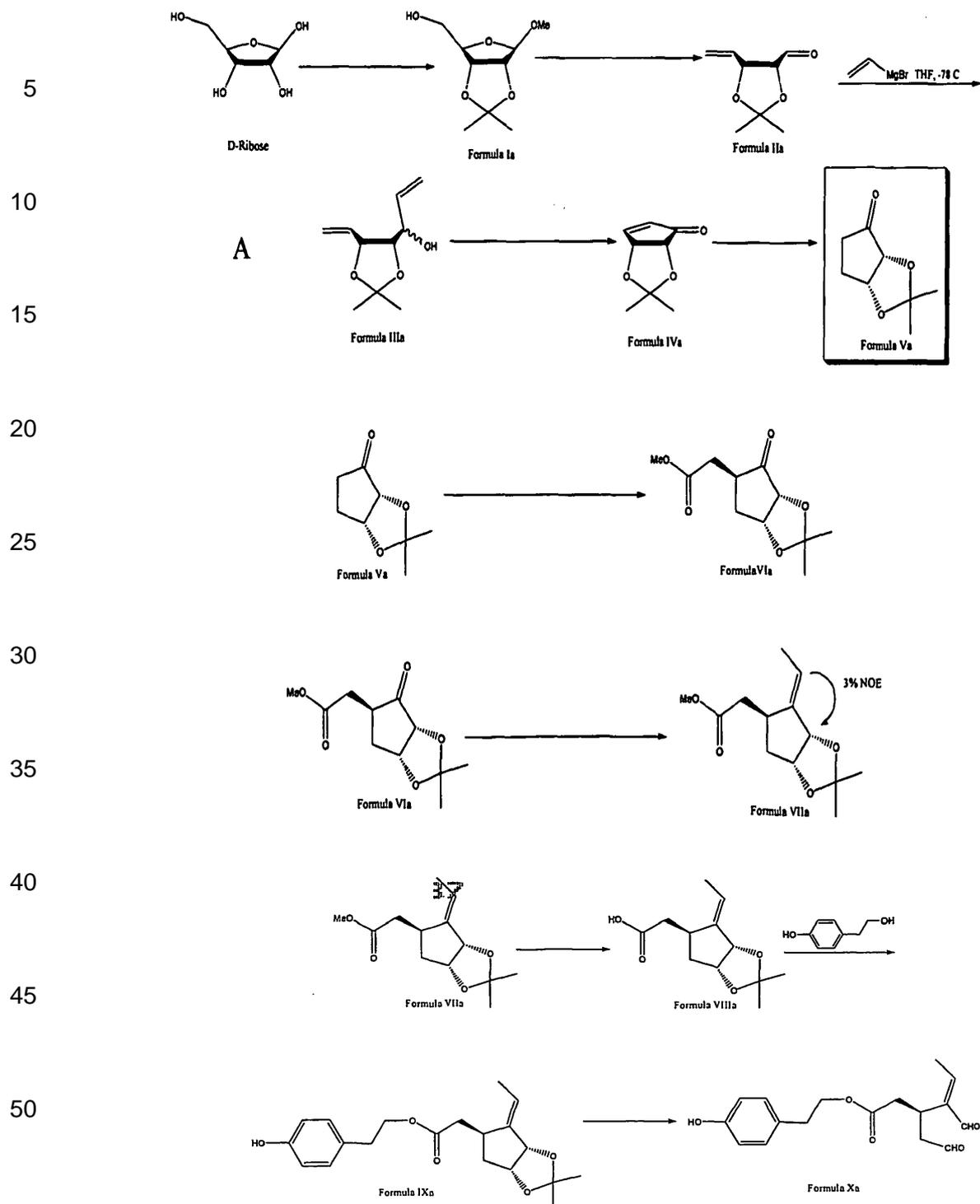
30

[0089] Los enantiómeros de oleocantal se pueden sintetizar y purificar por los métodos siguientes:

(-)-Oleocantal:

35

[0090]

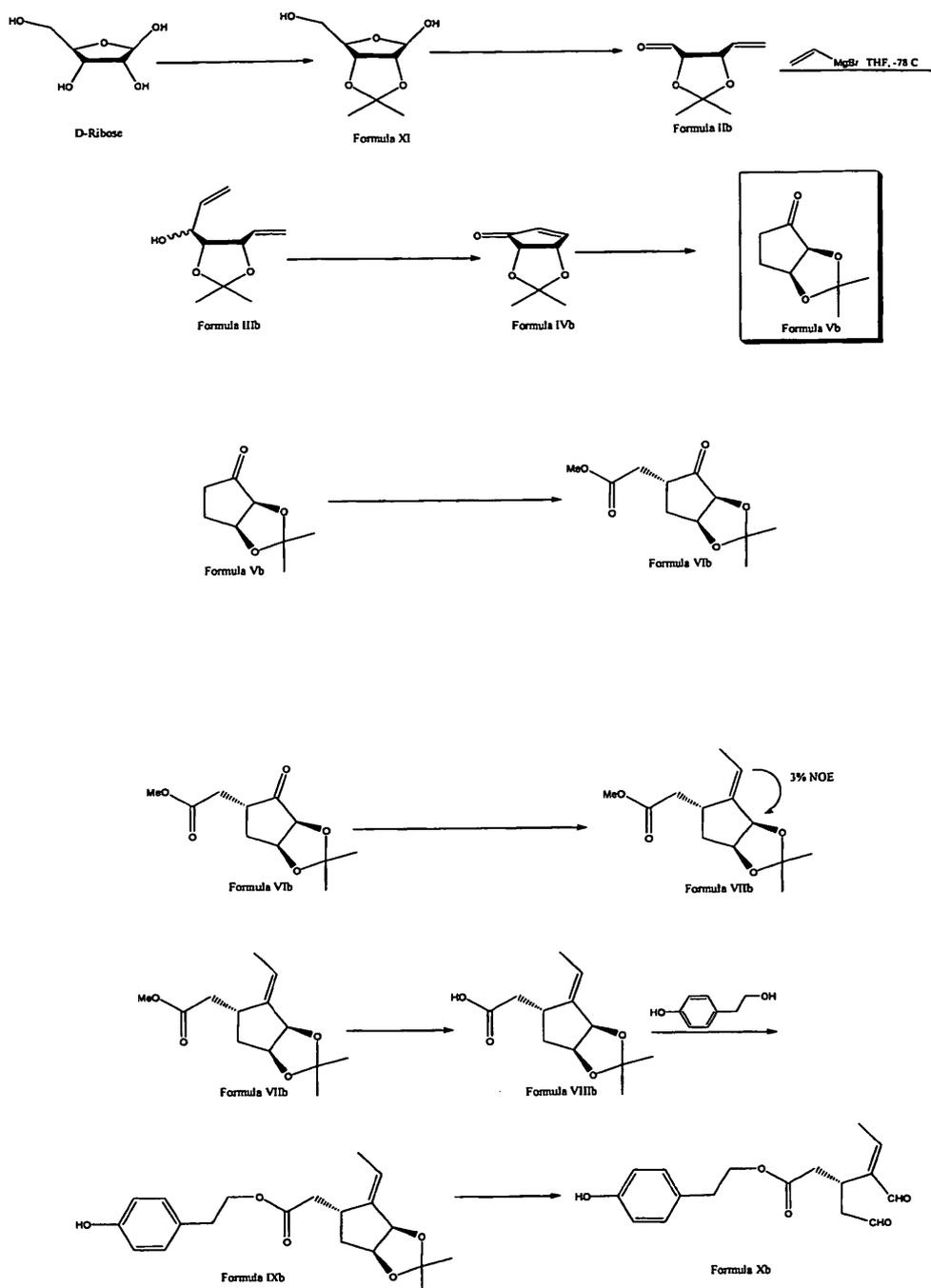


D-ribose se puede convertir en la Fórmula I con un ácido fuerte (por ejemplo, ácido clorhídrico) en acetona y metanol para producir la Fórmula Ia. El compuesto de la Fórmula Ia se puede tratar con un reactivo de halogenación (por ejemplo, yodo), fosfina (PPh₃) imidazol seguido por intercambio de metal halógeno (por ejemplo, BuLi o Zn) apertura inducida del anillo para producir un aldehído de fórmula IIa. A continuación, el compuesto de fórmula IIa puede ponerse en contacto con un CH₂=CH-MgBr en un disolvente adecuado (por ejemplo, Tetrahidrofurano) para dar un compuesto de Fórmula IIIa que se convierte en un compuesto de fórmula IVa por tratamiento con catalizador de Grubbs en un disolvente adecuado (por ejemplo, diclorometano (DCM)), seguido por tratamiento con un reactivo oxidante (por ejemplo, clorocromato de piridinio (PCC)). El compuesto de fórmula IVa se pone en contacto con paladio de hidrógeno en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo (EtOAc)) para dar (-)-ciclopentanona (Fórmula Va). La (-)-ciclopentanona (Fórmula Va) se trata con hexametildisilazida de litio (LiHMDS) seguido de hexametilfosforamida (HMPA), zinc dimetilo y bromoacetato de alquilo (por ejemplo, metilo, etilo o terc-butilo) para

proporcionar (-)-(3,4-dimetoxi-2-oxo-ciclopentil)-éster de ácido acético (Fórmula VIa). El compuesto de fórmula VIa se somete a una etilación Wittig usando bromuro de etiltrifenilfosfina (o yoduro) a temperatura reducida, preferiblemente -40 °C o menos. El éster se hidroliza (Fórmula VIIIa) y el compuesto de fórmula VIIIa se pone en contacto con alcohol 4-hidroxifenil en presencia de fosfina, azodicarboxilato de dialquilo (por ejemplo, dietilo o diisopropilo) (DEAD o DIAD) para dar fórmula IXa. El resto diol vecinal es liberado y la escisión oxidativa produce el (-)-oleocantal (fórmula Xa). Véase también la figura. 3.

(+)-Oleocantal:

[0091]



D-ribose se puede convertir a la Fórmula XI con un ácido fuerte (por ejemplo, ácido clorhídrico) en acetona para dar la Fórmula XI. El compuesto de fórmula XI puede tratarse con bromuro (o yoduro) de metiltrifenilfosfina seguido por escisión oxidativa del diol para producir un compuesto de fórmula IIb. A continuación, el compuesto de fórmula IIb puede ponerse en contacto con un $\text{CH}_2=\text{CH-MgBr}$ en un disolvente adecuado (por ejemplo, tetrahidrofurano) para dar un compuesto de fórmula IIIb que se convierte en un compuesto de fórmula IVb mediante tratamiento con

5 catalizador de Grubbs en un disolvente adecuado (por ejemplo, diclorometano (DCM)), seguido por tratamiento con un reactivo oxidante (por ejemplo, clorocromato de piridinio) (PCC) o MnO_2). El compuesto de fórmula IVb se pone en contacto con catalizador de hidrógeno en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo (EtOAc)) para dar (+)-ciclopentanona (Fórmula Vb). La (+)-ciclopentanona (Fórmula Vb) se trata con hexametildisilazida de litio (LHMDS) seguido de hexametilfosforamida (HMPA), zinc dimetilo y bromoacetato de alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, terc-butilo) para dar (+)-(3,4-dimetoxi-2-oxo-ciclopentil)-éster de ácido acético (Fórmula VIb). El compuesto de fórmula VIb se somete a una etilación Wittig usando bromuro (o yoduro) de etiltrifenilfosfina a temperatura reducida, preferiblemente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos. El éster se hidroliza (Fórmula VIIIb) y el compuesto de fórmula VIIIb se pone en contacto con 4-hidroxifenetil alcohol en presencia de fosfina, azodicarboxilato de dialquilo (por ejemplo, dietilo o diisopropilo) (DEAD o DIAD) para dar la Fórmula IX b. El resto diol vecinal es liberado y la escisión oxidativa produce el (+)-oleocantal (fórmula Xb). Véase también **la figura 4**.

15 **[0092]** La invención contempla compuestos miméticos de oleocantal que tienen la fórmula general mostrada anteriormente. Los miméticos o miméticos de oleocantal (compuestos estéricamente similares formulados para imitar las partes clave de la estructura) están diseñados para uso farmacéutico. Los miméticos pueden utilizarse de la misma manera que el oleocantal, y por lo tanto son equivalentes funcionales. La generación de un equivalente funcional estructural se puede lograr mediante las técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Se entenderá que todos los constructos estéricamente similares están dentro del alcance de la presente invención.

20 **[0093]** El diseño de miméticos de un compuesto farmacéuticamente activo conocido es una aproximación conocida para el desarrollo de fármacos basado en un compuesto "principal". Esto es conveniente cuando, por ejemplo, el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar, o cuando no es adecuado para un método particular de administración, por ejemplo, algunos péptidos pueden no ser agentes activos adecuados para composiciones orales ya que tienden a degradarse rápidamente por parte de las proteasas en el canal alimentario.

25 **[0094]** Hay varios pasos adoptados comúnmente en el diseño de un mimético. En primer lugar, se determinan las partes particulares del compuesto que son críticas y/o importantes en la determinación de sus propiedades organolépticas. En el caso de oleocantal, esto se puede hacer, por ejemplo, variando sistemáticamente los grupos R de la fórmula general y las pruebas de actividad anti-inflamatoria, como, por ejemplo, en los ensayos descritos por los Ejemplos.

30 **[0095]** Cuando la región activa del compuesto se ha identificado, su estructura se modela de acuerdo con sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, unión, tamaño y/o carga, usando datos de una serie de fuentes, tales como, pero sin limitarse a, técnicas espectroscópicas, datos de rayos X de difracción, y RMN. El análisis computacional, el mapeo de similitud (que modela la carga y/o volumen de la región activa, en lugar de la unión entre átomos), y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica se pueden utilizar en este proceso de modelado. En una variante de este enfoque, se modela la estructura tridimensional del compuesto.

35 **[0096]** Una fórmula general candidata se selecciona sobre la que se pueden injertar los grupos químicos que imitan el oleocantal. La fórmula general y los grupos químicos injertados sobre ella pueden seleccionarse convenientemente de manera que el mimético sea fácil de sintetizar, farmacológicamente aceptable, y no se degradae *in vivo*, al mismo tiempo que conserva la actividad biológica del oleocantal. Una mayor optimización o modificación se puede llevar a cabo llegar así a uno o más miméticos finales para pruebas clínicas o *in vivo*.

40 Usos de Oleocantales

45 A. Como aditivo alimentario:

50 **[0097]** Los oleocantales dan la sensación de irritación característica que se encuentra en los aceites de oliva de primera calidad. Los oleocantales se pueden añadir a aceites de menor calidad y proporcionar así un aceite con sabor a aceite de oliva virgen extra de primera calidad. Como tales, los oleocantales actúan como un saborizante o potenciador del sabor. Los oleocantales y las formulaciones también se pueden añadir a otros alimentos para mejorar el sabor o la comida al proporcionar una sensación agradable de irritación de aceite de oliva.

55 **[0098]** Los oleocantales se pueden añadir a los alimentos y preparaciones farmacéuticas orales y productos de higiene oral tales como pasta de dientes, enjuague bucal, refrescantes de aliento, recubrimientos, caramelos y pastillas para proporcionar una experiencia de sensación de irritación oral.

60 **[0099]** Los oleocantales también pueden proporcionar inhibición del dulzor, o permitir el diseño estructural de otros inhibidores del dulzor. Tales inhibidores del dulzor son útiles cuando los carbohidratos se añaden para dar volumen y alterar el cuerpo y textura del alimento.

65 **[0100]** Finalmente, los oleocantales se pueden utilizar para añadir un irritante a la alimentación y mejorar el sabor y la experiencia gastronómica de una manera similar a otras especias como chiles, mostazas, cebollas, pimienta de Sichuan y jengibre, por ejemplo.

B. Conservante:

5 [0101] El oleocantal y las formulaciones se pueden añadir directamente a los productos alimenticios para actuar como conservante. Los productos alimenticios pueden ser para el consumo humano o animal. Los alimentos especialmente preferidos para el método de conservación son elementos que son habitualmente almacenados en aceite. En este método, una cantidad adecuada y eficaz de oleocantal o una formulación del mismo se añaden directamente al alimento o aceite en el que se almacena el alimento.

10 [0102] El oleocantal o formulación del mismo puede usarse para recubrir el producto alimenticio antes del envasado. La formulación puede rociarse sobre el alimento o éste también puede sumergirse en la formulación. El oleocantal o su formulación se puede aplicar a la superficie interior del material de envase que está en contacto con el alimento para evitar su deterioro. El revestimiento puede ser una película delgada pulverizada sobre la superficie interior o laminada sobre la superficie interna, por ejemplo. El material de embalaje utilizado para almacenar el alimento puede estar impregnado con oleocantal o una formulación del mismo. Todos los métodos anteriores para incorporar un conservante en los materiales de embalaje o para la incorporación de conservantes en alimentos son bien conocidos en la técnica, y se puede emplear cualquier medio apropiado. Sin la intención de estar ligado a ninguna teoría particular de operación, las formulaciones conservantes y oleocantales poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas que les permiten actuar como conservantes.

20 C. Formulaciones farmacéuticas

25 [0103] Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los oleocantales se administran normalmente en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos se pueden administrar por una variedad de vías incluyendo oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal. Estos compuestos son eficaces como composiciones inyectables y orales. Tales composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica e incluyen al menos un compuesto activo.

30 [0104] Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen otros ingredientes activos además de los compuestos de oleocantal con vehículos farmacéuticamente aceptables. Al preparar las composiciones de esta invención, el ingrediente activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de dicho vehículo que puede estar en forma de cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido, que actúa como un vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Así, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, 1-10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones estériles inyectables, y polvos estériles envasados.

40 [0105] Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral, agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos, agentes edulcorantes y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

50 [0106] Las composiciones se formulan preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1g, más habitualmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg, del ingrediente activo. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. De manera preferible, el compuesto de fórmula I anterior se emplea a aproximadamente un 20 por ciento o menos en peso de la composición farmacéutica, más preferiblemente aproximadamente un 15 por ciento en peso o menos, siendo el resto vehículo farmacéuticamente inerte.

60 [0107] El compuesto activo es eficaz en un amplio intervalo de dosificación y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto administrado y su actividad real relativa, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

65 [0108] Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea del compuesto. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como

homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide a continuación en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, 0,1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo.

[0109] Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden estar recubiertos o compuestos de otra forma para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede incluir una dosificación interna y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Pueden utilizarse varios materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

[0110] Naturalmente, de manera adicional, las composiciones de la presente invención se pueden formular en forma de liberación sostenida para proporcionar la liberación de velocidad controlada de uno cualquiera o más de los componentes y así optimizar los efectos terapéuticos y reducir al mínimo los efectos secundarios indeseables. Las formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos estratificados que contienen capas de velocidades de disgregación variables o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los componentes activos y dispuestas en forma de comprimidos o cápsulas que contienen tales matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

[0111] Las formas líquidas en las que las nuevas composiciones de la presente invención pueden incorporarse para administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

[0112] Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener materiales portadores adecuados farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes preferiblemente y farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente desde el dispositivo nebulizador o éste puede estar unido a una mascarilla facial, o máquina intermitente de respiración de presión positiva. Las composiciones en solución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

(1) Alivio de los síntomas del resfriado:

[0113] Los oleocantales se puede utilizar en un método para tratar los síntomas del resfriado o la gripe. Las formulaciones se pueden preparar incluyendo oleocantales como ingrediente activo, o en combinación con otros ingredientes activos que se toman por vía oral, rectal, intranasal o como un inhalante, por ejemplo.

[0114] Cuando se toma oralmente, la formulación de oleocantal puede estar en forma de piruleta, película de disolución rápida, comprimido, jarabe líquido, liqui-gel, cápsula, o similares.

[0115] La cantidad de oleocantales en la preparación puede ajustarla un médico con experiencia en la técnica para dosificaciones adecuadas para adultos o para uso pediátrico, o un veterinario experto en la técnica para uso en diversos animales. La dosis de fármaco puede determinarse basándose en el peso del sujeto o en la superficie. Cualquier método de determinación de dosis adecuadas es aceptable.

[0116] Los oleocantales se formulan preferiblemente con un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo (denominados colectivamente aquí como materiales "vehículo") como se describe anteriormente.

(2) Contrairritante para el dolor de garganta:

[0117] Los oleocantales son útiles como contra-irritantes para el dolor de garganta que puede acompañar a un resfriado o una gripe, por ejemplo. El oleocantal se puede aplicar en combinación con otros ingredientes para el alivio del dolor de garganta o se puede proporcionar como el único ingrediente activo. Las formulaciones basadas en oleocantal para el dolor de garganta pueden estar en forma de comprimido, pastilla, piruleta, goma de mascar, o aerosol para la garganta. La formulación se puede preparar y envasar por cualquier medio conocido en la técnica.

[0118] Por ejemplo, las formas sólidas de dosificación pueden contener otros ingredientes conocidos en dichas formas de dosificación, tales como reguladores de la acidez, opacificantes, agentes estabilizantes, agentes tampón, saborizantes, edulcorantes, agentes colorantes y conservantes. Por ejemplo, una pastilla se puede preparar por

calentamiento de la base de las pastillas (por ejemplo, una mezcla de azúcar y glucosa líquida) al vacío para eliminar el exceso de agua y los componentes restantes se mezclan en la mezcla. La mezcla resultante se extrae en la forma deseada. Las pastillas se enfrían, y se envasan en envases adecuados. Las pastillas serán chupadas normalmente por el paciente para liberar el oleocantal. Las formulaciones masticables de dosis sólidas se pueden hacer por los métodos usados para preparar caramelos masticables o gomas de mascar. Por ejemplo, una forma de dosificación sólida masticable puede prepararse a partir de una mezcla extruída de jarabe de azúcar y glucosa a la que el oleocantal se ha añadido con adición opcional de agentes de batido, humectantes, lubricantes, saborizantes y colorantes. (Ver Formas de Dosificación Farmacéutica: Comprimidos, volumen 1, segunda edición editada por HA Lieberman, L Lachman y JB Schwartz publicada en 1989).

[0119] Formulaciones de pulverización pueden prepararse por disolución o suspensión del oleocantal en un medio líquido que puede contener también otros ingredientes tales como agentes estabilizadores, agentes tampón, saborizantes, edulcorantes, agentes colorantes y conservantes. Por ejemplo, un aerosol pueden prepararse mediante la disolución de componentes solubles en agua en los ingredientes solubles en agua e ingredientes solubles en materiales distintos al agua en un co-disolvente (por ejemplo, Alcohol). Las dos fases se mezclan a continuación y la mezcla resultante se filtra y se coloca en recipientes de dispensación. Los recipientes de dispensación puede estar provistos de un mecanismo de medida, pulverización de accionamiento manual o el distribuidor puede contener un propulsor presurizado y estar provisto de una válvula de dispensación adecuada.

(3) Descongestionante nasal:

[0120] Los oleocantales son útiles como descongestionante nasal. El oleocantal se puede aplicar en combinación con otros descongestionantes nasales o se puede proporcionar como el único ingrediente activo. Las formulaciones nasales basadas en oleocantal pueden estar en la forma de un lavado o espay nasal. La formulación se puede preparar y envasar por cualquier medio conocido en la técnica para los lavados y espays nasales.

(4) Antioxidante:

[0121] Se cree que los oleocantales tienen actividad anti-oxidante y como tales se puede usar para tratar o prevenir varias enfermedades, como el cáncer. Los oleocantales también pueden ser utilizados para promover la curación de heridas, ya sea por aplicación directa sobre heridas, o como un revestimiento o en impregnación de vendajes, suturas y similares.

[0122] Los efectos antioxidantes de los oleocantales también puede ser utilizados en la formulación de cosméticos. Las composiciones pueden proteger la piel o el cabello como composición antisolar. El compuesto de fórmula (I), y preferiblemente oleocantal está generalmente presente en una cantidad que varía desde 1 a 1.000 mg. Oleocantal o un derivado de oleocantal puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5 a 800 mg. Oleocantal o un derivado oleocantal puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 10 a 750 mg. Oleocantal o un derivado oleocantal puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 25 a 600 mg. Oleocantal o un derivado oleocantal puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 50 a 500 mg. El oleocantal o un derivado del mismo puede estar presente en 1, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1.000 mg.

[0123] En las composiciones, el compuesto de fórmula (I) actúa como un agente antioxidante. Estas composiciones pueden ser composiciones capilares tales como lacas para el cabello, lociones para la fijación del cabello o el tratamiento del cabello o lociones de aclarado, champús, champús colorantes, composiciones de tinte para el cabello, productos de maquillaje tales como esmaltes de uñas, cremas y aceites de tratamiento de la piel, bases, barras de labios, composiciones para el cuidado de la piel, tales como aceites de baño o cremas, así como cualquier otra composición cosmética capaz de mostrar, por causa de sus componentes, problemas de estabilidad a la oxidación durante el almacenamiento.

(5) Alivio del dolor:

[0124] Los oleocantales pueden utilizarse para tratar y prevenir el dolor. Los compuestos son útiles para el alivio del dolor asociado con una variedad de condiciones incluyendo, pero sin limitarse a, la gripe u otras infecciones virales, resfriado común, dolor lumbar y del cuello, dismenorrea, dolor de cabeza, dolor de muelas, esguinces y torceduras, miositis, neuralgia, sinovitis, artritis, incluyendo artritis reumatoide, enfermedades degenerativas de las articulaciones (osteoartritis), gota y espondilitis anquilosante, bursitis, quemaduras, lesiones, cáncer y para el dolor asociado con procedimientos quirúrgicos y dentales.

(6) Anti-inflamatorio:

[0125] Los oleocantales se utilizan como agentes anti-inflamatorios. Los oleocantales se pueden utilizar en un método para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por inflamación, incluyendo pero sin limitarse a, la psoriasis, el cáncer, el asma, la rinitis alérgica, el síndrome de dificultad respiratoria, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, migraña, periarteritis

nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, esclerodermia, diabetes tipo I, miastenia gravis, esclerosis múltiple, sorcoidosis, enfermedad renal isquémica, síndrome nefrótico, síndrome de Bechet, polimiositis, gingivitis, conjuntivitis, enfermedad miocárdica vascular isquémica, enfermedad del corazón, accidente cerebrovascular e hipertensión.

5

(7) Inhibidor de Micro-proteína G y Quinasa Asociada:

[0126] Los oleocantales se pueden formular también para el tratamiento o la prevención de la formación de placas A β 42 asociadas con Alzheimer y ovillos en una manera similar a la encontrada para fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno. Sin la intención de estar ligado a ninguna teoría particular de operación, se cree que el ibuprofeno y el oleocantal inhiben micro-proteínas G y quinasas asociadas, por ejemplo, Ras y Rock, que se han asociado con el desarrollo de placas y ovillos neurofibrilares asociados A β 42 en el cerebro de pacientes de Alzheimer. Los oleocantales también actúan para inhibir la γ -secretasas y alterar conformaciones de presenilina de las que ambas actividades están asociadas con la reducción de placas y ovillos A β 42 asociados con el Alzheimer.

15

[0127] Se cree que algunos fármacos anti-inflamatorios no esteroideos inhiben las γ -secretasas sin alterar significativamente otras actividades en el vía de procesamiento de la proteína precursora amiloide A β (APP). En pacientes con ciertas mutaciones en APP y todas las mutaciones conocidas para la presenilina, APP se procesa de tal manera que hay un gran aumento en la cantidad de un fragmento proteolítico de los residuos 40-42 (A β 42) (Weggen et al. (2001) Nature 414 (8): 212). Ciertos AINE parecen tener un efecto reductor de la producción de A β 42 por un mecanismo que es independiente de la actividad de la ciclooxigenasa asociado con la actividad anti-inflamatoria de los AINE. Se ha demostrado que para muchos AINE que se administran en forma de mezclas racémicas de los compuestos activos, un enantiómero específico (el S- Enantiómero) parece ser responsable de la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa, y por lo tanto del efecto anti-inflamatorio (Weggen et al. (2001) Nature 414 (8): 212). También se ha demostrado que el R-Enantiómero de los AINE puede mediar en la reducción de la producción de A β 42 y puede ser responsable de la disminución del riesgo en la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo observado con el uso a largo plazo de los AINE (Moriyama et al. (2002) J. Neurochem. 83:1009-1012).

[0128] La llamada dieta mediterránea también se correlaciona con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo, que tiene un alto consumo de, entre otras cosas, el aceite de oliva. Por lo tanto, la observación hecha en este documento de la asociación con las propiedades organolépticas de oleocantal y la similitud de ibuprofeno y las observaciones asociadas con el uso a largo plazo de AINE y la ingesta diaria de aceite de oliva sugieren que el oleocantal se puede utilizar para el tratamiento y prevención de trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, Alzheimer y otros deterioros cognitivos asociados a las placas y ovillos amiloides). El tratamiento y la prevención de tales trastornos neurodegenerativos se puede realizar usando una mezcla racémica de oleocantal, o usando uno de los enantiómeros purificados de oleocantal.

(8) Para cirugía oral y el tratamiento de irradiación oral del cáncer:

40

[0129] Los oleocantales son también útiles como tratamientos para su uso en conjunción con cirugía oral y tratamiento de irradiación oral del cáncer. Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría particular de operación, se cree que los oleocantales, con su operadora actividad anti-inflamatoria, actúan para inhibir la inflamación que se produce en la cavidad oral, como consecuencia de la cirugía o irradiación oral. Los oleocantales pueden estar formados como un enjuague oral que puede administrarse antes del procedimiento, después del procedimiento, o durante el procedimiento, o en una combinación de estos regímenes de tratamiento. La cantidad de oleocantal en el aclarado es una cantidad terapéuticamente eficaz que determina fácilmente un experto en la técnica.

D. Repelente animal:

50

[0130] Se cree que oleocantales, con sus cualidades organolépticas, son útiles como repelentes de animales. Los compuestos se pueden utilizar para repeler animales carnívoros y omnívoros, y aves, incluyendo gatos domésticos, roedores, mapaches, perros, u otros cánidos como coyotes.

55

[0131] Un método incluye aplicar una cantidad eficaz repelente de los oleocantales, sola o en combinación con un vehículo adecuado, para el locus de la que los animales deben ser repelidos. Los vehículos adecuados incluyen diluyentes líquidos tales como agua, hidrocarburos, alcoholes, emulsionantes y otros líquidos que generalmente se encuentran en las formulaciones de pulverización de hogares o preparaciones farmacéuticas con el fin de ser aceptables desde el punto de vista de la seguridad humana. Los vehículos sólidos inertes tales como almidones también pueden usarse, y puede ser conveniente incorporar los compuestos en una formulación de liberación controlada.

60

[0132] Puede ser conveniente aplicar oleocantales a recipientes para desperdicios comestibles descartados, tales como botes metálicos o de plástico para la basura, bolsas de plástico, cajas de papel y cartón y similares. Además, los compuestos repelentes descritos en este documento pueden ser incorporados en diversas composiciones

65

potencialmente comestibles que, si se consumen, podrían herir o matar a un animal. Un ejemplo de tal composición sería el anticongelante líquido.

5 [0133] Se proporcionan los métodos para repeler a las aves del consumo o la utilización de un material de otro modo susceptibles al consumo o utilización por las aves, que incluye proporcionar al material una cantidad aviar repelente de al menos un oleocantal.

10 [0134] Los vehículos líquidos se pueden emplear y el repelente se puede pulverizar sobre el material. Véase, por ejemplo, U.S. Pat. No. 2.967.128. El compuesto puede dispersarse en el líquido del cual las aves van a ser repelidas. El repelente puede estar al menos parcialmente atrapado en un vehículo sólido para mejorar su persistencia tal como se describe en U.S. Pat. No. 4.790.990. El vehículo puede ser un almidón modificado, aceite o polímero que encapsula al menos parcialmente, emulsiona o dispersa sustancialmente y uniformemente el agente aversivo. El compuesto repelente y vehículo pueden dispersarse a través de sólidos consumidos por las especies de aves para reducir la probabilidad de que se coman el comestible tratado.

15 [0135] Se facilitan los métodos para repeler a las aves del consumo o utilización de líquidos no potables como aguas residuales industriales o agrícolas, balsas de residuos mineras y agua independiente en superficies artificiales como pistas de aeropuertos y estacionamientos. "No potable" se refiere a los líquidos o hábitats acuáticos en el que dicho líquido puede ser consumido o utilizado por las aves en detrimento del hombre o de las aves.

20 E. Descubrimiento

25 [0136] El conocimiento de la estructura absoluta del oleocantal permite la identificación del receptor oleocantal y los genes relacionados. Los ensayos de cribado para los receptores, bien conocidos en la técnica, pueden emplearse para determinar el receptor oleocantal. El tejido de la parte posterior de la garganta, que interactúa con el oleocantal, puede aislarse y someterse a diversos ensayos para determinar la unión de oleocantal a las células y la vía de señalización molecular de oleocantales.

30 [0137] El marcado de oleocantal se puede usar en estudios de tejidos de unión para determinar los tipos de células que contienen un presunto receptor oleocantal. Las células que tienen unión marcada al oleocantal pueden visualizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el oleocantal puede estar marcado con un marcador radiactivo (*por ejemplo*, ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^3H), un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador enzimático, o un marcador inmunogénico. Las moléculas luminiscentes o fluorescentes pueden conjugarse con la molécula oleocantal. Se puede permitir que el oleocantal marcado se una a las células *in situ* y se visualicen bajo un microscopio. Alternativamente, las células en suspensión pueden estar marcadas con el marcador oleocantal y las células marcadas pueden estar separadas de las células no marcadas por citometría de flujo o usando un clasificador, como un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células marcadas se pueden recoger, por ejemplo, para el análisis genético posterior.

40 [0138] Una molécula se conjuga a oleocantal lo que permite que el oleocantal conjugado a estar enlazadas de manera cruzada a su receptor tras la unión. Esto puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica. A continuación, el receptor de enlace cruzado puede aislarse de las células, purificarse y someterse a secuenciación N-terminal de aminoácidos. Con la identidad de los aminoácidos N-terminales, los oligonucleótidos degenerados puede sintetizarse basándose en las posibles combinaciones de oligonucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos y los oligonucleótidos pueden utilizarse de varias maneras para identificar el gen que codifica el receptor oleocantal. Los oligonucleótidos degenerados pueden utilizarse para explorar bibliotecas de genes. La biblioteca de genes puede ser una biblioteca formada a partir de las células animales, particularmente células humanas, o puede ser una biblioteca de un tipo de células animales específicas que se sabe que responden al oleocantal. La biblioteca puede ser un banco sustractivo formado por la eliminación de genes comúnmente expresados a partir de células que responden y que no responden al oleocantal, de modo que la biblioteca consta de un subconjunto de genes que reflejan secuencias únicas de las células que responden al oleocantal. Los oligonucleótidos degenerados pueden emparejarse con un segundo conjunto de oligonucleótidos para permitir la amplificación RT-PCR de polinucleótidos que contienen las secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos del receptor de oleocantal. Ese conjunto de segundos oligonucleótidos pueden incluir, por ejemplo, oligo-dT que se hibrida a las extensiones de poli-adenosina de ARNm. La reacción de RT-PCT se puede realizar en el ARN extraído a partir de células que responden al oleocantal. Los métodos y técnicas para el análisis genético son bien conocidas en la técnica y se pueden encontrar en las referencias y textos mencionados aquí.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento de aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica "oleocantal"

A. Síntesis de oleocantal

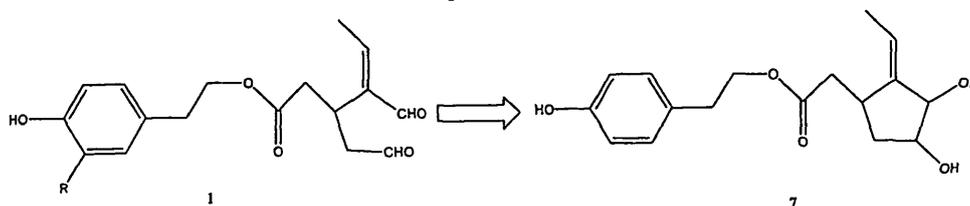
65 [0139] De manera retrosintética, hemos previsto dos enantiómeros de (1) para derivar a partir de las formas enantiómeras de ciclopentanodiolos (7) a través de la escisión oxidativa del resto diol (Esquema 1). Los

ciclopentanodioles necesarios (**7**) a su vez se preparan a partir de ciclopentanonas (+) - y (-) - (**10**), por medio de alquilación estereoselectiva para introducir la cadena lateral de la cara convexa, seguido por etilación estereoselectiva de Wittig y la separación del resto acetónido (Esquema 1).

5

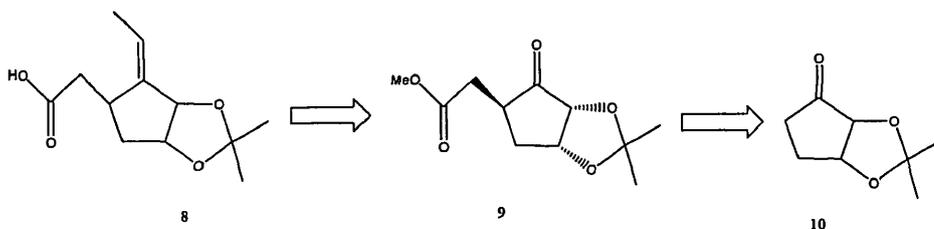
Esquema 1

10



15

20



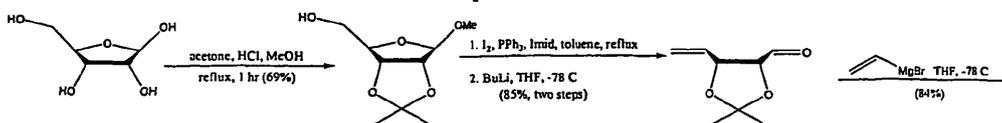
25

(5) Al principio (+)- y (-)-ciclopentanonas (**10**) se prepararon a través de la sulfoximina y / o protocolos enzimáticas introducidas y desarrollado por Johnson (Johnson, CR y T. Penning (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4726-4735; Johnson, CR (1998) Acc. Chem. Res. 31:333-341). Aunque es eficaz en escala modesta (10-100mg), el requisito de cantidades en gramos de los oleocantales exigía la obtención de más rutas escalables a (**10**). Con este fin, hemos optimizado un híbrido de los enfoques sintéticos (Moon, H. et al. (2002) Tetrahedron: Asym. 13 (11) :1189-1193; Jin, Y. et al. (2003) J. Org. Chem. 68 (23) :9012-9018; Yang, M. (2004) J. Org. Chem. 69 (11) :3993-3996; Palmer, A. et al. (2001) Eur. J. Org. Chem. 66 (7) :1293-1308; Paquette, L. y S. Bailey (1995) J. Org. Chem. 60:7849-7856) Como se esboza en el Esquema 2. Es importante destacar que los dos enantiómeros de (**10**) se podrían preparar en cantidades multi-gramo en 7 pasos, con un rendimiento global del 40% a partir de D-(-)-ribosa barata. Los elementos clave de ambas secuencias implicaba la adición de vinilo Grignard a los enantiómeros de aldehído (**12**), seguido a su vez por metátesis de cierre de anillo (RCM), oxidación PCC e hidrogenación (Esquema 2).

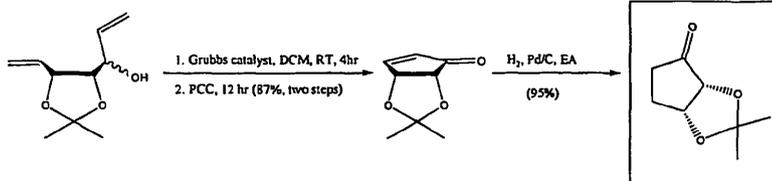
40

Esquema 2

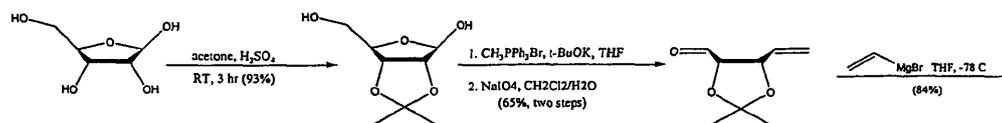
45



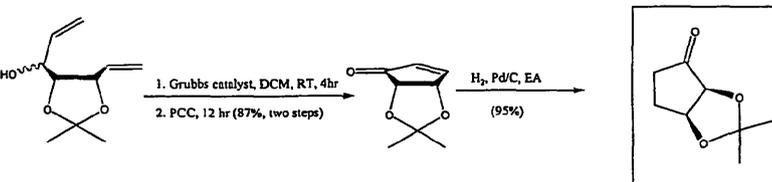
50



55



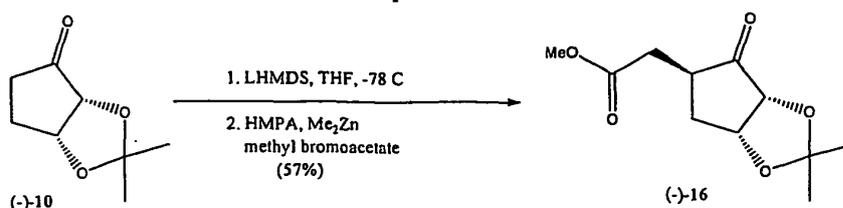
60



65

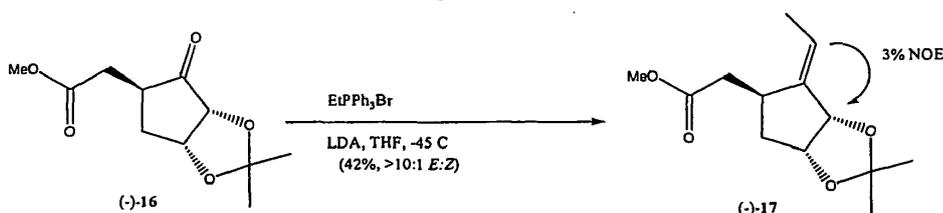
[0140] La alquilación de (+)- y (-)- ciclopentanona (**10**) con bromoacetato de metilo se anticipó para proceder a partir de la cara convexa menos impedida del esqueleto bicíclico para instalar la cadena lateral de una forma estereoselectiva. Los intentos iniciales sin embargo para alquilar la (-)- (**8**) con bromoacetato de metilo empleando LDA en presencia de HMPA suministró sólo una mezcla compleja que contenía sólo cantidades en traza de (-)- (**16**). Ni la adición de Cu(I) (Johnson, CR y T. Penning (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4726-4735) según se informa para suprimir reacciones secundarias, ni el uso del correspondiente enolato de estaño [generado por tratamiento de (-)- (**10**) en THF con LDA, seguido por HMPA y cloruro de tributilestano (Suzuki, M. et al. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107:3348; Nishiyama, H. et al. (1984) Tetrahedron Lett. 25:223)] mejoró la situación. La alquilación del enolato de zinc de (-)- (**10**) [generado por tratamiento de (-)- (**10**) en THF con 1,1 eq. LHMDs, seguido a su vez por HMPA (3,0 eq.) y zinc dimetilo (Morita, Y. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:1787-1788) (1.0 eq.)] con bromoacetato de metilo, sin embargo consistentemente suministrado (-) - (**16**) en 55-60% de rendimiento como un solo diastereoisómero (esta reacción fue bastante limpia, excepto algunos materiales de referencia. El uso de bromoacetato t-butílico en lugar de bromoacetato de metilo no mejoró el rendimiento) (Esquema 3).

Esquema 3



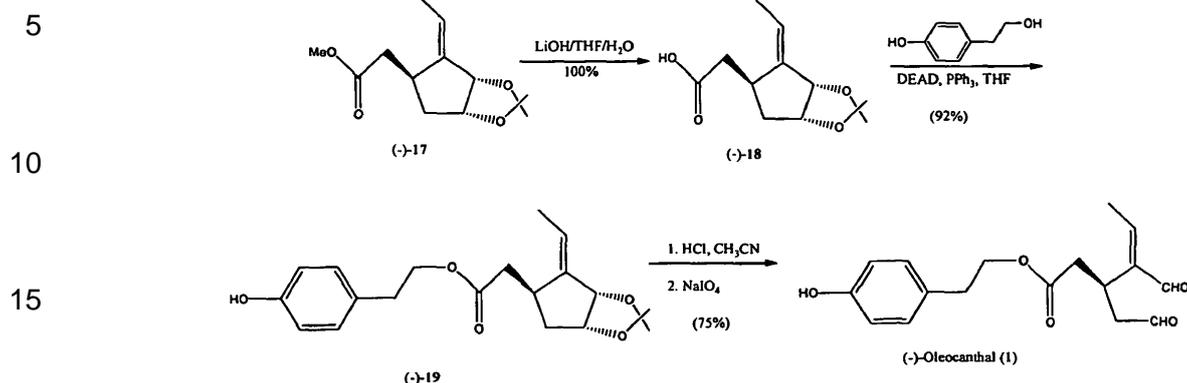
[0141] La etilación de Wittig (-)- (**16**) se logró con bromuro de etiltrifenilfosfina a continuación. Los mejores resultados se obtuvieron empleando LDA como base a -45 °C. Aunque se consiguió una estereoselectividad excelente (aproximadamente, 10:1 *E:Z*) a favor del *E*-Isómero (-)- (**17**), el rendimiento sólo fue modesto (42%), presumiblemente debido a la facilidad de enolización de (-)- (**16**) (Edmunds, M. "La Reacción de Wittig" En OLEFINACIÓN DE CARBONIL MODERNO, Takeda, Ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 2004). Curiosamente, la estereoselectividad varió dramáticamente con la temperatura de reacción. A 0 °C, la *E:Z* selectividad fue 3.3:1, mientras que a temperatura ambiente la selectividad fue 1.6:1. La asignación de la geometría *E* de la olefina se basó en el análisis RMN NOE (Esquema 4).

Esquema 4



[0142] La hidrólisis del éster (-)- (**17**) (LiOH /THF/H₂O) del siguiente ácido al alcance (-)- (**18**), que se sometió a esterificación de Mitsunobu (Mitsunobu, O. (1981) Síntesis 1-28) con alcohol 4-hidroxifenetil para proporcionar fenol (-)- (**19**) con un rendimiento del 92%. Como era de esperar, la reacción de Mitsunobu procedió con quimiselectividad completa en el hidroxilo primario (Appendino, G. et al. (2002) Org. Lett. 4:3839-3841). La terminación de la síntesis de (-)-oleocantal (**1**) se logró entonces a través de la liberación de la fracción de diol vecinal (HCl 4 N / acetonitrilo), seguido de la escisión oxidante (NaIO₄); (-)-Oleocantal (**1**) era idéntico en todos los aspectos (por ejemplo, ¹H y ¹³C RMN, IR y HRMS) con una muestra auténtica aislada de aceite de oliva virgen, este último posee datos espectrales idénticos a los reportados en la obras (Montedoro, G. et al. (1993) J. Agric. Food Chem. 41:2228-2234). La asignación estructural de (**1**) también se confirmó por análisis de RMN COSY. La sintética (-)- (**1**) mostró una pequeña rotación óptica negativa ([α]_D²⁵ -0,78, c = 0,9, CHCl₃) idéntica a la obtenida a partir de una muestra aislada de aceite de oliva virgen ([α]_D²⁵ -0,9; c = 2,0, CHCl₃). Así, la estereoquímica de (-)-oleocantal (**1**) es 3*S*, 4*E*. El enantiómero del producto natural (+)- (**1**) se preparó a través de una secuencia de reacción similar comenzando con (+)- (**10**) para proporcionar (+)- (**1**) ([α]_D²⁵ 0,73, c = 0,55, CHCl₃) (Esquema 5).

Esquema 5



[0143] En resumen, se ha alcanzado, una síntesis eficaz y escalable de los dos enantiómeros de oleocantal (1) cada uno en 13 pasos (7% de rendimiento global) de (D)-(-)-ribosa de bajo costo, que requiere sólo 6 separaciones cromatográficas. La similitud estructural de oleocantal a una serie de productos naturales relacionados (Somanadhan, B. et al. (1998) *Planta Medica* 64:246-50; Takenaka, Y. et al. (2002) *Chem. Y Pharm. Bull.* 50 (3) :384-389; Takenaka, Y. et al. (2002) *Fitoquímica* 59 (7) :779-787) sugiere que el enfoque sintético que se presenta aquí también debe ser aplicable a su construcción.

B. Estudios funcionales de oleocantal

[0144] Esta irritación de garganta restringida de oleocantal es notablemente similar a la provocada por el ibuprofeno. Debido a la similitud organoléptica observada, hemos aislado y luego sintetizado oleocantal de aceite de oliva. La evaluación sensorial y química de 10 aceites de oliva comercializados reveló una fuerte relación positiva entre la intensidad de irritación de la garganta y la concentración de oleocantal. Los ensayos de ciclooxigenasa y lipoxigenasa con oleocantal sintetizado demostraron que es un AINE con un perfil antiinflamatorio sorprendentemente similar al del ibuprofeno, de acuerdo con sus propiedades sensoriales. El oleocantal puede jugar un papel significativo en los beneficios para la salud bien conocidos y asociados con una dieta alta en aceite de oliva. Además, la identificación de otros compuestos farmacológicamente importantes se facilita aquí por la atención a la similitud de las propiedades sensoriales.

[0145] Estudios recientes realizados en nuestros laboratorios han demostrado que el ibuprofeno, así como algunos otros anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), tienen la inusual propiedad sensorial de escozor casi exclusivamente en la garganta, a diferencia de, por ejemplo, la capsaicina y la piperina que también irritan en la boca y los labios. Durante la degustación del aceite de oliva recién prensado de Sicilia, se observó que la sensación de garganta irritada parecía idéntica a la del ibuprofeno. De hecho, los aceites de oliva virgen extra de calidad a menudo se caracterizan por una sensación de escozor o ardor parecido al que se siente al tragar ibuprofeno. Con aceite de oliva, esta sensación a menudo provoca una pequeña tos o carraspera, cuando el aceite de oliva se traga solo. Los entusiastas del aceite de oliva clasifican los aceites como aceites tos 0, 1, 2 o 3 con los números más altos para los superiores. La entidad responsable de esta propiedad sensorial, como recientemente se ha informado, se trata de aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica, uno de los muchos polifenoles encontrados en el aceite de oliva.

[0146] En base a sus similares propiedades oro-sensoriales, llegamos a la conclusión de que el oleocantal también puede compartir propiedades farmacológicas con el ibuprofeno. Para probar esta tesis, lo primero que teníamos que verificar y probar definitivamente la identidad del oleocantal. Este desarrollo requiere un método eficaz de análisis para aislarlo y cuantificarlo. Se tomaron dos enfoques para verificar la identidad del compuesto y sus propiedades. En primer lugar, se realizaron experimentos psicofísicos con oleocantal, correlacionando la cantidad de compuesto identificado con el grado de irritación en los aceites de oliva comerciales. En segundo lugar, hemos sintetizado el oleocantal y probado las propiedades psicofísicas del material sintetizado. Finalmente, para examinar el oleocantal para la actividad farmacológica que podría imitar al ibuprofeno, se llevaron a cabo ensayos con ciclooxigenasa, lipoxigenasa y de peroxidación de lípidos con material sintético.

[0147] Para aislar y purificar oleocantal, se empleó un enfoque sistemático sensorial dirigido. Es decir, se utilizó el análisis del sabor como una herramienta para monitorizar la presencia del compuesto de irritación de garganta en cada paso de un procedimiento de aislamiento y purificación similar al utilizado por Andrewes *et al.* Brevemente, el agente irritante se extrajo primero con aceite de oliva con metanol/agua (80/20, v / v). El extracto fenólico se separó en fracciones de 15, sólo uno de los cuales era irritante, usando un método de HPLC de fase inversa. Para obtener material puro, fraccionamos previamente el extracto fenólico del aceite de oliva en un cartucho de extracción en fase sólida C18. La información sobre la retención del principal irritante de garganta a partir del método HPLC nos

5 permitió separarlo de la mayoría de los otros compuestos fenólicos coextraídos utilizando mezclas de metanol y mezclas de agua disolvente a tres diferentes proporciones de disolventes de elución. El análisis por HPLC de la fracción irritante de garganta reveló la presencia de varios compuestos no resueltos. Un nuevo HPLC gradiente se desarrolló así y sólo un pico bien resuelto era irritante de garganta. Un análisis de RMN detallada (1D y 2D) se llevó a cabo con este material. Aunque los espectros ¹H-RMN indicaron la presencia de impurezas menores, las estructuras de los compuestos principales se identificaron fácilmente como 2-(4-hidroxifenil) etilo, 4-formil-3-(2-oxoetil)-4-éster de ácido hexenoico, la aglicona ligustrósido deacetoxialdehídica, como se identificó por primera vez en el aceite de oliva por Montedoro y revelado recientemente como irritante de garganta. Las mediciones de rotación óptica de oleocantal revelaron que el enantiómero natural era levógiro.

10 **[0148]** Los aceites de oliva difieren notablemente en su capacidad para provocar irritación en la garganta. Si el oleocantal es principalmente responsable de esta propiedad sensorial debe haber una relación positiva entre la concentración del compuesto y el grado de irritación de la garganta. Para probar esta hipótesis, se adquirieron 10 aceites de oliva diferentes con diversos grados de irritación de la garganta basados en la evaluación informal. La cantidad de oleocantal en cada uno se cuantificó posteriormente. El compuesto fue extraído a partir de pequeñas cantidades de cada uno de los 10 aceites (1g) por extracción de hexano-acetonitrilo (líquido-líquido). El extracto del disolvente se analizó mediante HPLC de fase inversa con detección UV a 278 nm. El oleocantal se separó cromatográficamente a partir de los otros compuestos extraídos con un gradiente de elución de acetonitrilo y agua. Todos los análisis se realizaron por duplicado utilizando soluciones de oleocantal puro y aislado como patrón externo. Cuando el compuesto se sintetizó más tarde, este también fue utilizado como un estándar para confirmar estos métodos. En general, la reproducibilidad fue alta (RSD = 4,7%), la recuperación fue buena (95%), la curva de calibración fue lineal ($r^2 = 0,9999$) y el límite de cuantificación fue de <1 ppm.

25 **[0149]** El grado de irritación de la garganta de estos 10 aceites fue cuantificado por 17 voluntarios. Cada sujeto probó solamente 2 veces al día dos muestras diferentes de aceites de oliva con 1-2 horas de separación entre cada prueba, puesto que la irritación puede ser sensible a cortos intervalos entre los ensayos. Los sujetos utilizaron pinzas nasales para eliminar señales olfativas. La degustación consistió en colocar aproximadamente 3,5 ml de aceite de oliva en la boca, mantenerlo durante 3 segundos y luego tragarlo en dos partes alícuotas a fin de asegurar la estimulación de la garganta. Después de 45 segundos, a los sujetos se les pidió que calificaran el pico de sensibilidad de irritación de la garganta utilizando la escala general marcada de magnitud, una escala sensorial desarrollada para generar una estimación de magnitud similar a la calidad de los datos. Cada sujeto probó dos veces con los diez aceites.

35 **[0150]** Las concentraciones de oleocantal en los 10 aceites de oliva y su grado de irritación en la garganta resultó estadísticamente significativo ($r = 0,90$; Fig. 2) proporcionando pruebas adicionales de que el oleocantal es responsable de la mayor parte de la irritación de la garganta en los aceites de oliva probados.

40 **[0151]** Estos estudios implican fuertemente al oleocantal como el compuesto irritante de garganta importante en el aceite de oliva. Sin embargo, como se indicó por Andrewes *et al.*, la co-elución de un componente de menor importancia o mezcla de componentes que causan la sensación de ardor no puede eliminarse como una posible fuente de irritación sin completar una síntesis total *de novo* seguida de un análisis organoléptico. Puesto que la estructura de oleocantal posee un centro estereoespecífico, sintetizamos ambos enantiómeros a partir de D-ribosa fácilmente disponible. La síntesis tanto de (+) como de (-)-oleocantal requiere 13 pasos como se indica para la recuperación del (-)-enantiómero levógiro en las figuras 3 y 4. Ambas síntesis se mostraron como escalables, procediendo en 7% del rendimiento global y proporcionando de este modo un amplio material para la evaluación sensorial y farmacológica. El (-)-enantiómero levógiro del sintético oleocantal muestra el mismo signo y la magnitud de la rotación óptica como el material natural. Así, el estereodirección absoluta de la variante (1) es como se representa en la Figura 2.

50 **[0152]** Tres individuos con experiencia en degustación de aceites de oliva e ibuprofeno, utilizando un método estándar de 2 alternativas de elección forzada, evaluaron el compuesto sintético (el natural (-)-isómero único) dispersado en aceite de maíz no irritante a aproximadamente dos veces la concentración encontrada en el aceite de oliva Falconaro, el aceite de oliva más potente que hemos evaluado (Fig. 1).

55 **[0153]** La prueba fue doble ciego y cada uno fue expuesto a tres conjuntos de dos muestras, a una de las cuales se añadió oleocantal sintetizado y el otro servido como el control en blanco. La tarea fue par indicar cuál de los dos era más irritante. Cada uno de los tres evaluadores identificaron correctamente la muestra en cada una de los tres presentaciones (9 de 9 correctas, <0,01) y los tres identificaron la distinta irritación de la parte posterior de la garganta con la sensación inductora de tos característica tanto del aceite de oliva como del ibuprofeno. Como se predijo, la irritación de la garganta del (-)-oleocantal sintético era idéntica al oleocantal aislado del aceite de oliva de alta calidad. Es importante destacar que el efecto fue dependiente de la dosis (Figura 2 triángulos vacíos, línea discontinua). Diez sujetos probaron aceites de maíz comerciales no irritantes presentados solos y mezclados con cualquiera de los dos (-)-oleocantal sintetizado o el agente amargo octaacetato de sacarosa (SOA) (Sigma-Aldrich). La adición de SOA habilitó los ensayos de elección forzada que se realizaron con los sujetos sin revelar la identidad de las muestras irritantes debido a la amargura u otras señales no irritantes. Se probó (-)-Oleocantal a la concentración más alta identificada en los diez aceites nominales, 200 g/ml, y en un medio de registro y pasos

enteros más diluida 63,25 y 20 ug/ml. Se añadió SOA al aceite de maíz (4×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} M) a la intensidad de acuerdo con la irritación de los tres niveles de (-)-oleocantal. Los sujetos participaron en dos ensayos alternativos de elección forzada (2AFC) (cuatro ensayos en cada concentración para cada sujeto) y en las sesiones de calificación de intensidad (cuatro calificaciones por cada aceite). Para los ensayos 2AFC los sujetos presentan dos ejemplos de 3,0 ml de aceite de maíz con intensidades coincidentes de SOA y (-)-oleocantal en orden ascendente, y se les pidió probar los aceites como se describe anteriormente. Aunque ciegos a la posición de estímulo, los sujetos se les hicieron dos preguntas sobre cada ensayo, "¿Cuál de los dos aceites fue más irritante en la garganta?" y "¿Cuál es más amargo?" Al nivel 20 mcg/ml y 5×10^{-5} M la mayoría de los sujetos informó en algunos ensayos que el mismo aceite era a la vez el más irritante y el más amargo de los dos. Esto demuestra que los participantes estaban dispuestos a seleccionar el aceite uno como más fuerte en ambos caracteres dentro de un ensayo. Los sujetos realizaron al azar la selección entre dos aceites de maíz sin adulterar, cuando la elección correcta se asignó al azar antes de la prueba. A 20 g/ml los sujetos tenían razón en 24 de 40 ensayos, lo que indica que esta concentración está cerca de los niveles del umbral de detección en aceite de maíz. Las otros dos concentraciones eran correctas en 39/40 y 40/40 ensayos. Para los ensayos de calificación de intensidad a los sujetos se les presentaron los ocho aceites en orden ascendente, contrarrestado por el orden de estímulo y se les pidió que calificaran la irritación de la garganta y la amargura de cada aceite en una escala de magnitud general de marcado.

[0154] Suponiendo que la calidad y el locus de irritación proporciona una señal de actividad farmacológica, entonces el oleocantal debe imitar al menos algunas de las propiedades farmacológicas del ibuprofeno, un potente modulador de la inflamación. Para probar esto se optó por evaluar la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y de la lipoxigenasa (LO), dos enzimas centrales para el proceso inflamatorio. El ibuprofeno es un potente inhibidor COX-1 y COX-2, pero no inhibe la lipoxigenasa. La dependencia de la concentración de oleocantal para la inhibición de actividades de COX-1 ovina, COX-2 humano recombinante y 15-lipoxigenasa de soja se midió utilizando kits disponibles comercialmente (Cayman Chemicals). La indometacina se utiliza como un valor positivo (inhibidor) de control en los ensayos de la ciclooxigenasa y el ácido nordihidroguaracético (NDGA) y el ácido cafeico se utilizaron valores positivos (inhibidores) de control en los ensayos de la lipoxigenasa. Ambos enantiómeros de oleocantal, exhibieron una inhibición dependiente de la dosis de las actividades COX-1 y COX-2, sin efecto sobre la actividad de la lipoxigenasa, tanto como se observa con ibuprofeno (Tabla 1). El IC calculado₅₀ (Análisis de mínimos cuadrados de regresión de inhibición frente a la concentración) para oleocantal (-) fue de 21,4 micras y 29,4 micras para COX-1 y COX-2, respectivamente. El IC₅₀ para oleocantal (+) fue de 27,9 micras y 40,5 micras para COX-1 y COX-2, respectivamente. En estos experimentos, los dos enantiómeros de oleocantal fueron más potentes en concentraciones equimolares que el ibuprofeno en la inhibición de COX-1 y COX-2. Ambos enantiómeros de oleocantal inhiben la peroxidación de lípidos en suero inducida por iones metálicos *in vitro* a un grado similar como equimolares de alfa-tocoferol (datos no mostrados). Así, el oleocantal exhibe una actividad antioxidante comparable al alfa-tocoferol y tiene un perfil de ácido araquidónico inhibidor (inhibición de la ciclooxigenasa sin inhibición de lipoxigenasa), indicando que ambos enantiómeros de oleocantal son los AINE clásicos, con una potencia superior a la de ibuprofeno.

[0155] En conjunto, estos datos son consistentes con nuestra hipótesis de que el compuesto irritante de garganta en el aceite de oliva es un agente anti-inflamatorio como ibuprofeno. Es importante destacar que los resultados del oleocantal proporcionan un ejemplo de cómo las sensaciones de la boca pueden servir como un ensayo farmacológico *in vivo*. Estos resultados sugieren además una base adicional para los beneficios para la salud del consumo de aceite de oliva atribuido a una combinación del perfil de lípidos, la actividad antioxidante de muchos de los polifenoles presentes y los agentes antiinflamatorios que inhiben la lipoxigenasa. Sugerimos aquí un beneficio adicional: el consumo a largo plazo de oleocantal, con anti-inflamatorios como el ibuprofeno pueden mejorar la salud y el bienestar. Suponiendo que un consumidor de aceite de oliva en el rango normal de alta ingestión de aproximadamente 50 g de aceite de oliva por día y que este aceite contenga hasta 200 mg/ml de oleocantal, entonces la persona consumiría aproximadamente 10 mg / día. Aunque esta dosis es relativamente baja (-10% de la dosis recomendada de ibuprofeno para el alivio del dolor adulto), se sabe que las bajas dosis crónicas de otros inhibidores de la COX (por ejemplo, aspirina) tienen importantes beneficios de salud, principalmente la reducción de riesgo de ataque cardíaco y en dosis ligeramente más altas una reducción de un ataque al corazón y del riesgo de accidente cerebrovascular.

[0156] Además de la actividad anti-inflamatoria, se ha demostrado recientemente que el ibuprofeno tiene una capacidad de COX independiente para disminuir el péptido altamente amiloidogénico Ab42, tal vez representando evidencia epidemiológica de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, sería importante determinar si el oleocantal tiene una actividad similar.

[0157] La hipótesis inicial de que el compuesto irritante de garganta en el aceite de oliva podría tener actividad farmacológica se basa en las similitudes oro-sensoriales del ibuprofeno y el aceite de oliva. Esto implica un mecanismo sensorial similar, pero la forma exacta casi exclusiva en que el ibuprofeno (o oleocantal) produce irritación en la garganta sigue siendo difícil de alcanzar. Una posible explicación es que hay un sistema receptor desconocido en la actualidad que es responsable del ibuprofeno y el aceite de oliva. Alternativamente, o adicionalmente, ambos compuestos pueden tener acceso particularmente sencillo a terminaciones nerviosas libres en la garganta, pero el motivo por el que se producen preferentemente en la garganta es desconocido. Tampoco

está claro por qué otros irritantes lipofílicos, como el ácido láctico o capsaicina no estimularía la garganta de esta manera exclusiva, si el mecanismo era simplemente uno de fácil acceso a las terminaciones nerviosas libres. La elucidación del mecanismo sensorial puede ayudar a determinar la vía común para las actividades anti-inflamatorias de estas moléculas, o *viceversa*. Las propiedades sensoriales de los alimentos, las especias y los sabores pueden proporcionar pistas sobre la actividad farmacológica y por lo tanto no sólo sirven para proporcionar placer, sino también para mejorar la salud.

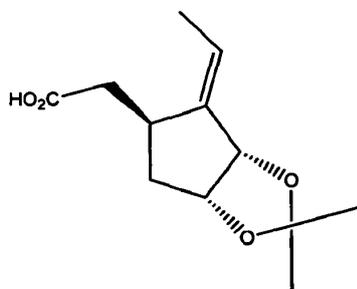
Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la COX-1, COX-2 y 15 LO-por oleocantal (-), (+)

Agente	Concentración (uM)	COX-1	COX-2	15-LO
Oleocantal (-)	100	83,5 ± 3,5	70,9 ± 8,6	0,4 ± 0,8
	25	56,1 ± 3,2	56,6 ± 9,5	0,0 ± 0,0
	7	24,6 ± 7,3	14,5 ± 2,3	0,0 ± 0,0
Oleocantal (+)	100	68,0 ± 15,2	69,6 ± 3,9	3,5 ± 5,5
	25	54,5 ± 4,6	41,3 ± 15,9	0,7 ± 1,0
	7	24,6 ± 7,5	6,1 ± 4,2	0,0 ± 0,0
Ibuprofeno	25	17,8 ± 2,3	12,7 ± 3,6	0,2 ± 0,3
	7	0,0	1,3	nd
La indometacina	25	45,8 ± 4,4	77,6 ± 10,2	0,1 ± 0,9
	7	33,0 ± 6,1	71,6 ± 7,3	0,5 ± 0,1
NDGA	25	nd	nd	63,1 ± 0,8
	7	nd	nd	52,5 ± 1,1
Ácido cafeico	25	nd	nd	25,2 ± 2,2
	7	nd	nd	19,8 ± 1,3

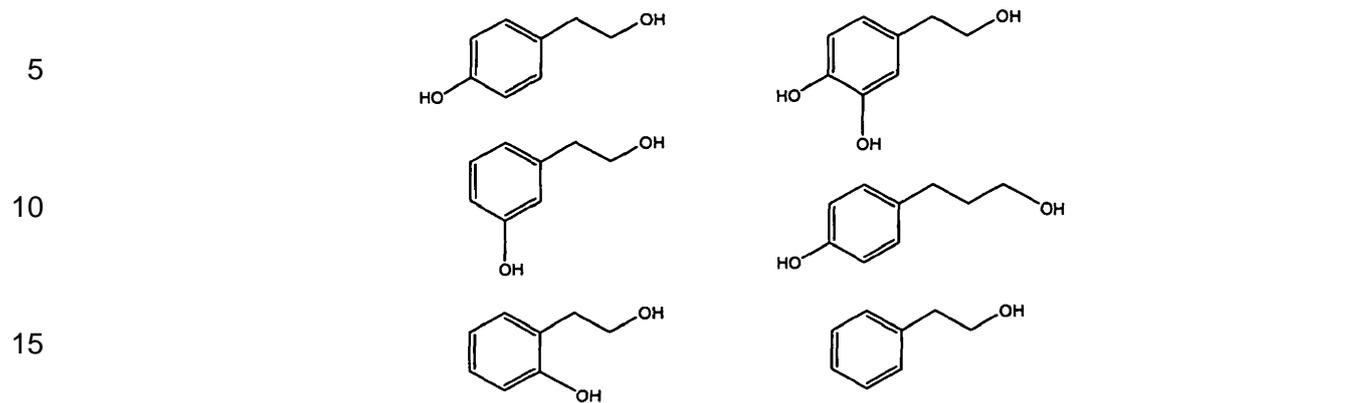
* Los datos se presentan como % de inhibición media ± SEM de tres experimentos independientes. Nd = no determinado.

Ejemplo 2: Estudio de Relación Actividad-Estructura (SAR)

[0158] Se puede llevar a cabo un Estudio de Relación Estructura Actividad (SAR) para determinar las actividades funcionales relativas a los derivados de oleocantal. Como se muestra en **la figura. 5**, un compuesto que tiene la estructura:



se lleva a reacción con un compuesto seleccionado de los siguientes:



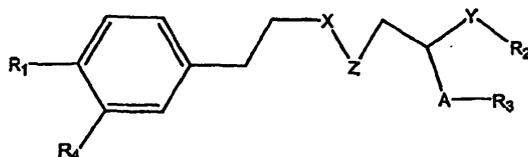
20 para producir derivados de oleocantal. Estos compuestos se ensayan a continuación para la actividad como se describió anteriormente. Las eficacias relativas y las potencias de los derivados de oleocantal puede asignarse a cada compuesto y la información estructural-funcional puede derivarse para el diseño racional de fármacos oleocantales.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

5

10



en la que:

15

R₁ y R₄ son independientemente H o O₅
 R₂ y R₃ son, independientemente, CHO, o COOR₅
 R₅ es un H, alquiloC₁-C₅, o un glicósido
 X es O, NH o CH
 Y es C = CHCH₃, o CH-COOR₅
 Z es C = O o CH-OR₅
 A es CH₂, o CH-COOR₅;

20

25

para uso en un método de tratamiento de un paciente con un trastorno inflamatorio que incluye administrar a un paciente con un trastorno inflamatorio una cantidad eficaz de una composición que incluye el compuesto en el que dicha composición alivia la inflamación en dicho paciente.

30

2. El compuesto para uso como se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicho trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, cáncer, asma, alergia síndrome de rinitis, insuficiencia respiratoria, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, migraña, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, escleroderma, diabetes tipo I, miastenia gravis, esclerosis múltiple, sorcoidosis, enfermedad renal isquémica, síndrome nefrótico, síndrome de Bechet, polimiositis, gingivitis, conjuntivitis, enfermedad miocárdica vascular isquémica, enfermedad cardíaca, y apoplejía.

35

3. El compuesto para uso como se reivindica en la reivindicación 1 en el que dicho compuesto es oleocantal.

4. El compuesto para uso como se reivindica en la reivindicación 3 en el que dicho oleocantal es el (-)-enantiómero.

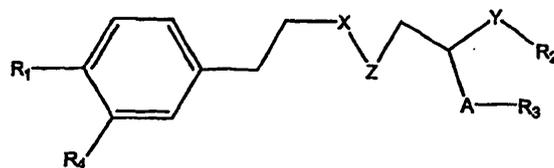
40

5. El compuesto para uso como se reivindica en la reivindicación 3 en el que dicho oleocantal es el (+)-enantiómero.

45

6. El uso de un compuesto de la fórmula:

50



55

en la que:

60

R₁ y R₄ son independientemente. H u OR₅
 R₂ y R₃ son, independientemente, CHO, o COOR₅
 R₅ es un H, alquiloC₁-C₅, o un glicósido
 X es O, NH o CH₂
 Y es C = CHCH₃, o CH-COOR₅
 Z es C = O o CH-OR₅
 A es CH₂, o CH-COOR₅;

65

para la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente con un trastorno inflamatorio.

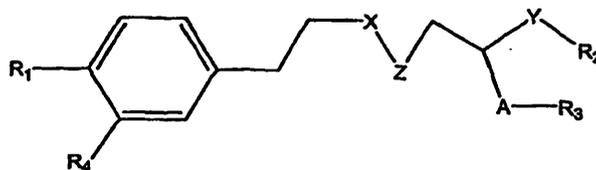
70

7. El uso de la reivindicación 6 en el que dicho trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, cáncer, asma, alergia síndrome de rinitis, insuficiencia respiratoria, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, gastritis, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, migraña, periarteritis nodosa, tiroiditis, anemia aplásica, enfermedad de Hodgkin, escleroderma, diabetes tipo I, miastenia gravis, esclerosis

múltiple, sorcoidosis, enfermedad renal isquémica, síndrome nefrótico, síndrome de Bechet, polimiositis, gingivitis, conjuntivitis, enfermedad miocárdica vascular isquémica, enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular.

- 5 8. El uso de la reivindicación 6 en el que dicho compuesto es oleocantal.
9. El uso de la reivindicación 8 en el que dicho oleocantal es el (-)-enantiómero.
10. El uso de la reivindicación 8 en el que dicho oleocantal es el (+)-enantiómero.
- 10 11. Una composición anti-inflamatoria que incluya una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene la fórmula:

15



20

en la que:

- 25 R₁ y R₄ son independientemente H o O₅
 R₂ y R₃ son, independientemente, CHO, o COOR₅
 R₅ es un H, alquilo C₁-C₅, o un glicósido
 X es O, NH o CH₂
 Y es C = CHCH₃, o CH-COOR₅
 Z es C = O o CH-OR₅
 30 A es CH₂, o CH-COOR₅.;
- y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición está en forma de comprimido, píldora, polvo, pastilla, bolsita, sello, elixir, suspensión, emulsión, solución, jarabe, aerosol, ungüento, cápsula de gelatina blanda o dura, supositorio, solución estéril inyectable, o en polvo estéril envasado.

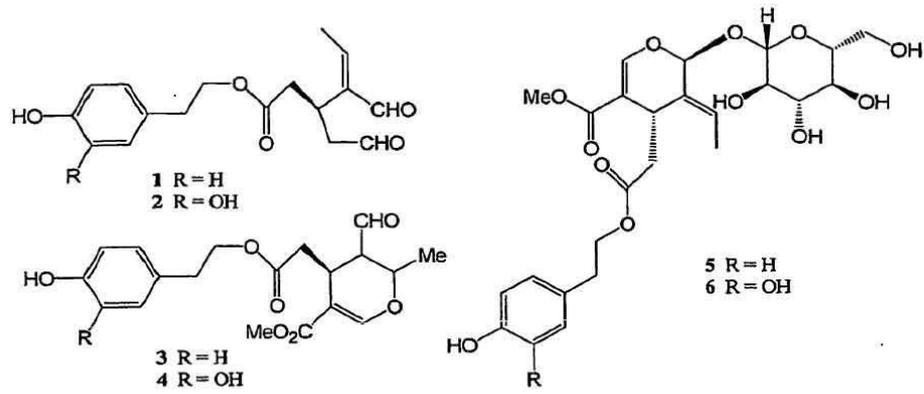
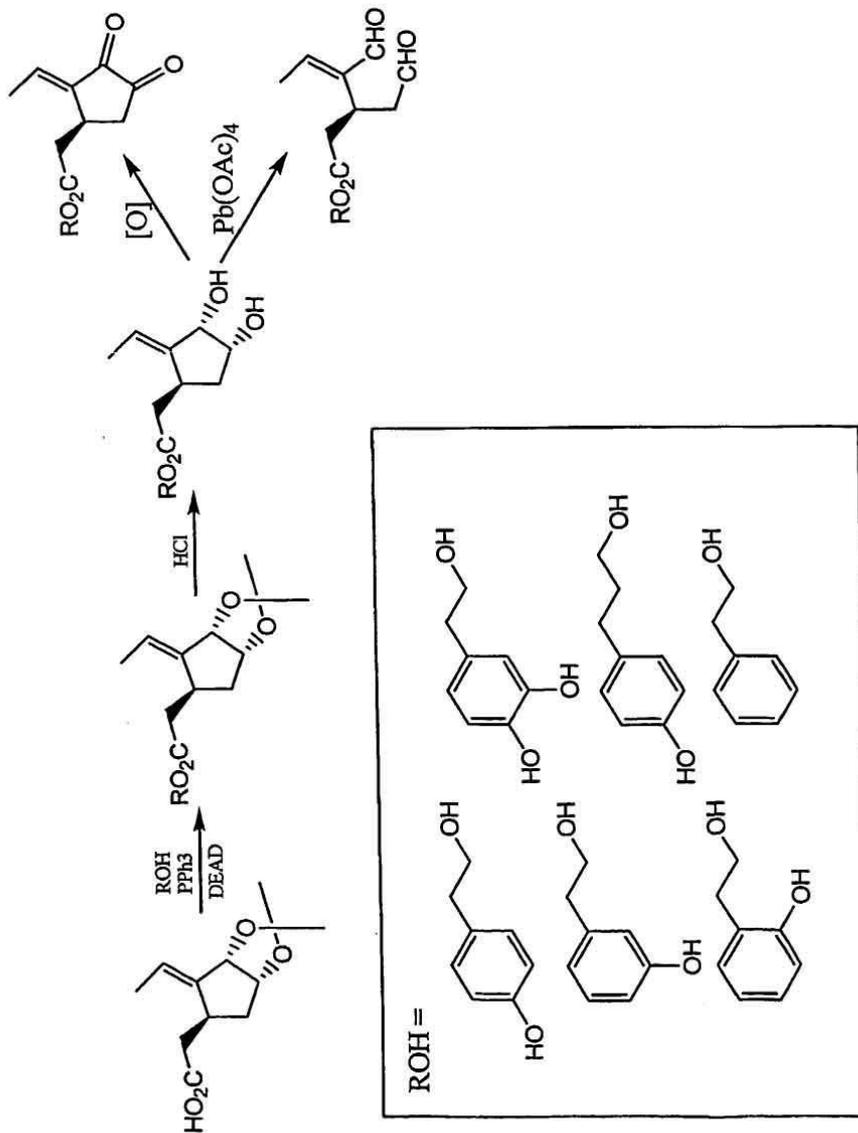


Fig. 1



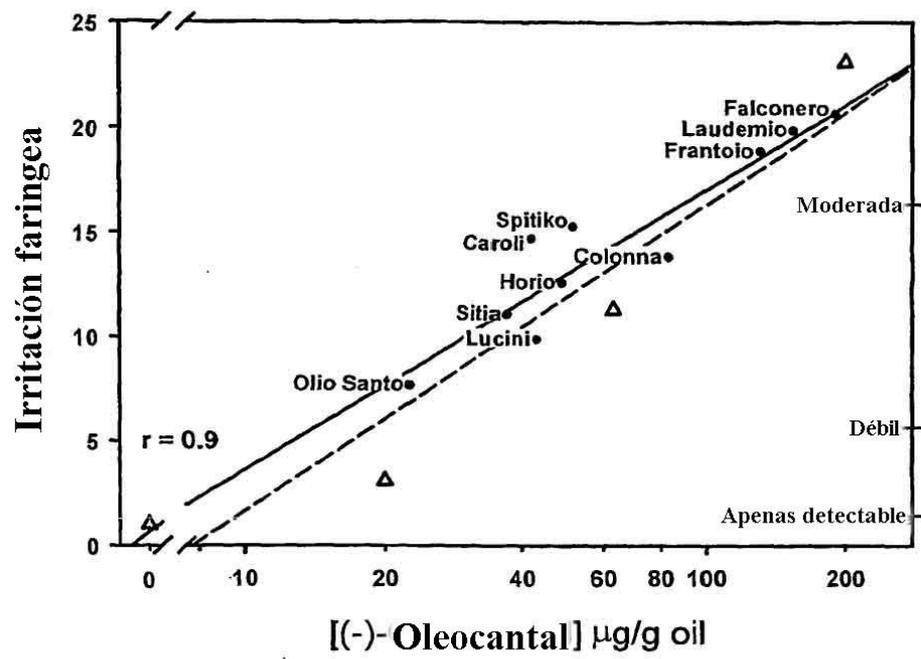


Fig. 2

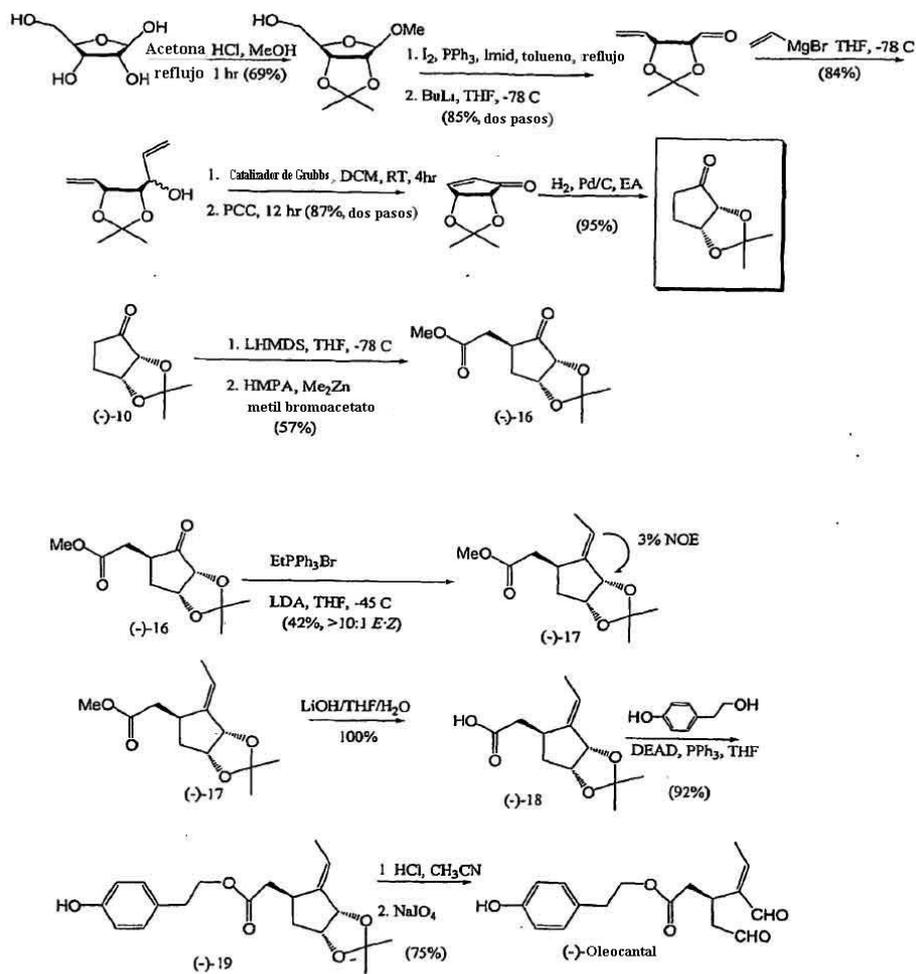


Fig. 3

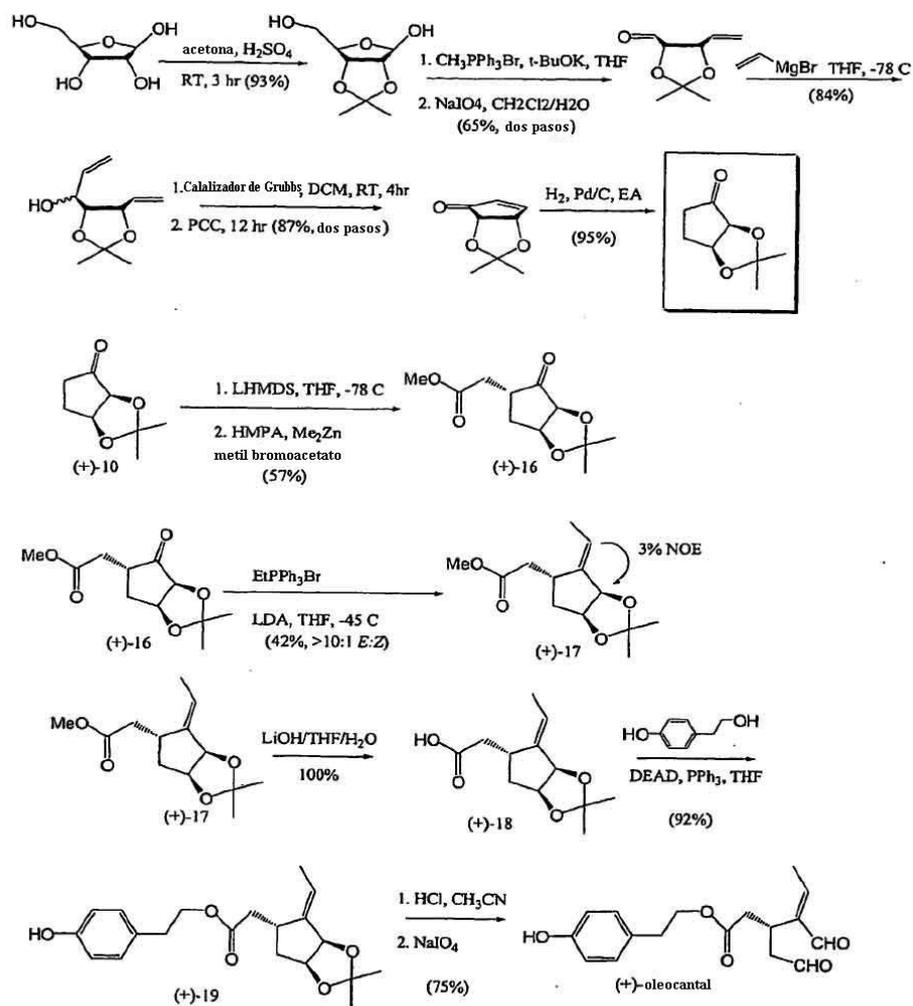


Fig. 4