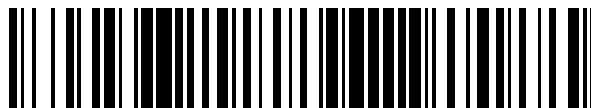


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 507**

21 Número de solicitud: 201131601

51 Int. Cl.:

C07C 49/727 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.06.2013

71 Solicitantes:

VIVACELL BIOTECHNOLOGY ESPAÑA, S.L
(100.0%)
Avda. Conde de Vallellano 15
14004 Córdoba ES

72 Inventor/es:

BELLIDO CABELLO DE ALBA, María Luz;
APPENDINO, Giovanni;
PAGANI, Alberto y
MUÑOZ BLANCO, Eduardo

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **MÉTODO DE AISLAMIENTO DE INGENOL.**

57 Resumen:

Método de aislamiento de Ingenol. La presente invención detalla un nuevo método para aislar Ingenol ($C_{20}H_{28}O_5$), en un único paso, a partir de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol. El Ingenol aislado mediante este método puede ser usado como precursor para la síntesis de derivados de ingenol biológicamente activos, como el Ingenol 3-Angelato y el Ingenol 3-Tigliato.

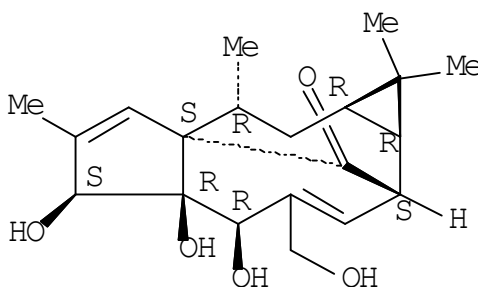
ES 2 408 507 A1

DESCRIPCIÓN**MÉTODO DE AISLAMIENTO DE INGENOL****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se engloba dentro del campo de la biología, la farmacia y la medicina. Más específicamente la presente invención se refiere a un método de aislamiento de ingenol a partir de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol, más en particular cuando dichas mezclas provienen de plantas, específicamente, a partir de semillas del género *Euphorbia* y, más en concreto, a partir de semillas de la especie *E. lathyris*.

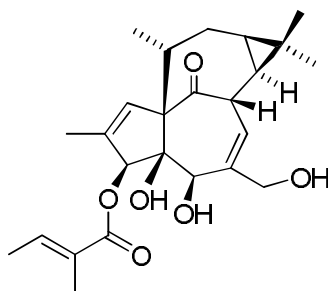
ESTADO DE LA TÉCNICA

Los ingenoles son compuestos que, aunque pueden obtenerse por síntesis química, están también presentes fundamentalmente en plantas de la familia Euphorbiaceae, especialmente en aquellas variedades con actividad purgante [Evans FJ y Kinghorn ADJ. Linn. Soc. Bot. (London) 1977;74:23-35; Evans FJ y Taylor SE. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Herz W, Grisebach H, Kirby GW, Eds.; Springer: New York, 1983; 44:1-99]. En concreto el ingenol ($C_{20}H_{28}O_5$) (número de registro CAS 30220-46-3) (Fórmula I) se ha aislado de las semillas de plantas de la especie *Euphorbia lathyris* L., comúnmente conocida como tártago. El aceite de semilla de tártago se comercializa en diferentes países del mundo y es una importante materia prima para la industria química ya que se usa en la composición de numerosos productos como pinturas, barnices, cosméticos, lubricantes, plásticos, biodiesel, etc.

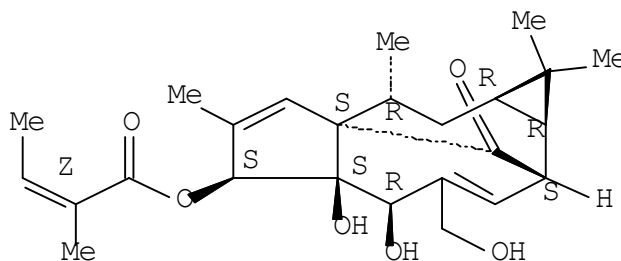
**Ingenol (Formula I)**

Me: CH_3 todo a lo largo de la presente memoria

Durante los últimos años se ha generado un gran interés en el compuesto ingenol y sus derivados, debido a sus importantes actividades biológicas. Ciertos ingenoles y en especial los derivados esterificados en la posición 3', ya sean naturales u obtenidos por semisíntesis, presentan una potente actividad anticancerígena y antiviral [Ogbourne SM et al. Cancer Res 2004;64:2833-9; Benhadji KA et al. Br J Cancer. 2008;99(11):1808-15; Kedei N et al. Cancer Res. 2004;64(9):3243-55; Warrilow D et al., AIDS Res Hum Retroviruses. 2006;22(9):854-64; Fujiwara M et al., Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(1):271-3]. Por semisíntesis se entiende el aislamiento de ingenol a partir de plantas que lo contengan y la sustitución en su estructura molecular, por reacciones químicas apropiadas en cada caso, de grupos que den origen a los diferentes derivados de interés. Dichos derivados esterificados en posición 3' que presentan actividad biológica y que pueden ser utilizados en clínica son preferentemente el Ingenol 3-Tigliato (Fórmula II) y el Ingenol 3-Angelato (Fórmula III).



Ingenol-3-Tigliato
(Fórmula II)



Ingenol 3-Angelato
(Fórmula III)

El ingenol está presente en forma de ésteres, en mezclas con ésteres diterpenoides, en plantas y en extractos vegetales. Sin embargo, las semillas de tártago son la única fuente comercial para el aislamiento de ingenol, a partir del cual, es posible obtener, mediante diferentes métodos químicos, los derivados de ingenol biológicamente activos utilizados en clínica. Dichas semillas

5 presentan una compleja matriz que contiene, además de grasas (40-47%) y proteínas (15%) [Duke, J. D. Handbook of Energy Crops <http://www.hort.purdue.edu/newcrop>], una serie de ésteres diterpenoides conocidos como Factores Euphorbia L₁-L₉, que comprenden una pequeña cantidad, pero relativamente constante, de monoésteres de ingenol (L₄, L₅, and L₆) [Adolf W y Hecker EZ. Krebsforsch. 1975, 84, 325-344], siendo la fracción que contiene el ingenol minoritaria en

10 comparación con la fracción que contiene los otros tipos de diterpenoides. Los ésteres de ingenol son altamente tóxicos, constituyendo un aceite muy irritante y, aunque el ingenol por si solo, aislado en forma libre, es inofensivo, el aislamiento de ingenol a partir de dichos ésteres es técnicamente complejo y no exento de riesgo para la salud humana de los operarios que intervengan en dichas operaciones de aislamiento, debido a la susodicha toxicidad de la fracción de

15 ésteres de ingenol.

En 1991 fue publicado un método para el aislamiento de ingenol a partir de semillas de *E. lathyris* [Bagavathi R. et al., Naturforsch. 1991;46b:1425-1433]. Dicho método consistía en separar la fracción que contiene los ésteres de ingenol mediante una serie de extracciones con solventes,

20 tales como metanol, éter de petróleo y cloroformo, seguida de una adsorción selectiva en geles de sílica. A continuación la fracción que contenía los ésteres de ingenol se sometía a hidrólisis y finalmente el ingenol obtenido se purificaba mediante técnicas de cromatografía en columna. Dicho método de aislamiento de ingenol requería mucho tiempo y trabajo, debido al elevado número de pasos o etapas, siendo, por lo tanto, su rendimiento, bajo y dificultando así el desarrollo de nuevos

25 derivados semisintéticos potencialmente utilizables como fármacos.

Para resolver el problema de la baja eficiencia y el bajo rendimiento del método descrito previamente en el estado de la técnica, para el aislamiento de ingenol, Appendino y cols. [Appendino G et al., J Nat Prod. 1999;62(1):76-9], desarrollaron un protocolo de extracción y

30 aislamiento de ingenol más corto y menos tóxico, ya que el tiempo de contacto con el aceite irritante extraído de semillas de *E. lathyris* conteniendo los ésteres de ingenol y que también contiene los compuestos diterpenoides macrocíclicos, era menor que el descrito anteriormente. En dicho método, el aislamiento del ingenol a partir del aceite de semillas de *E. lathyris* se llevaba a cabo en tres pasos básicos. Brevemente, (1) la separación de una fracción cruda de diterpenoides,

35 (2) la hidrólisis de los factores Euphorbia-L₁-L₉, y (3) la separación del ingenol a partir de los

polioles resultantes de la hidrólisis de los ésteres diterpenoides macrocíclicos (latirol, epoxilatirol, 7-hidroxi latirol, isolatirol, jolkinol, etc...). Ambas separaciones conllevan la purificación de una pequeña concentración de ingenol a partir de una mezcla compleja de compuestos naturales que tienen una polaridad similar, lo que se traduce en la obtención de un ingenol que, debido a la complejidad de la muestra en la que se encuentra embebido y a dicha similitud en la polaridad de los compuestos que forman la susodicha muestra, puede presentar impurezas, al estar contaminado con otras sustancias presentes en la mencionada mezcla, principalmente ésteres de ingenol sin hidrolizar o ésteres de otros diterpenoides macrocíclicos.

El problema técnico resuelto por la presente invención es un método, alternativo a los descritos en el estado de la técnica, de aislamiento de ingenol a partir de mezclas de ésteres de diterpenoides y de ésteres de ingenol. Estas mezclas pueden tener cualquier origen, bien natural (a partir de plantas) u originarse en un procedimiento de síntesis química. Preferentemente la invención aísla ingenol a partir de plantas del género *Euphorbia* y, más en concreto, a partir de semillas de *E. lathyris*.

Para resolver los problemas expuestos, existentes en el estado de la técnica, para el aislamiento de ingenol, la presente invención describe un método de aislamiento de dicho compuesto a partir de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol, preferentemente producidas al procesar semillas de *E. lathyris*, con mayor rendimiento que los conocidos en el estado de la técnica, al simplificar el número de pasos necesario para dicho aislamiento, reduciéndolo a un único paso (con un paso adicional opcional de purificación) y obtener un ingenol con menor número de impurezas (pureza > 99%).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

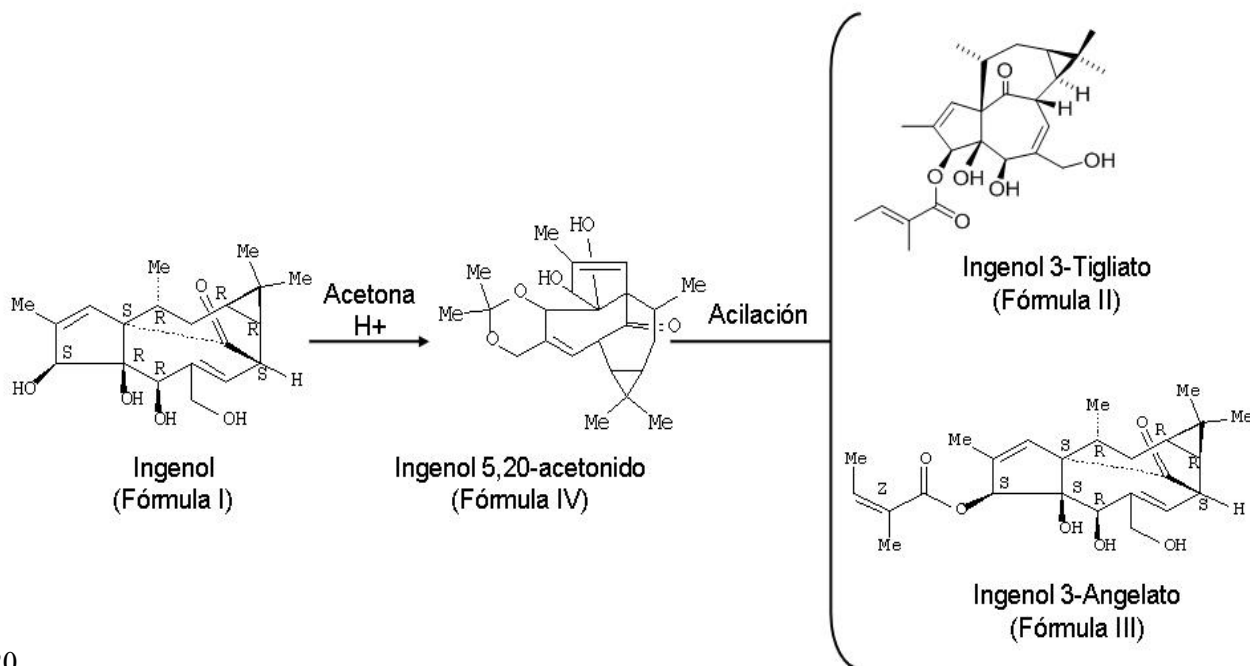
Breve descripción de la invención

El método descrito en la presente invención, combina en un único paso la hidrólisis del ingenol presente en la mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol y la separación de dicho ingenol de dicha mezcla. Para ello se lleva a cabo un tratamiento de dicha mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol con una solución de un disolvente orgánico, preferentemente tetrahidrofurano (THF) y agua acidificada, más preferentemente una salmuera (agua + sal) acidificada. El método descrito en la presente invención evita el aislamiento de intermedios tóxicos o irritantes, como la fracción de ésteres de ingenol, simplifica el proceso y los tiempos de

purificación del ingenol y además, el rendimiento de obtención de dicho compuesto es muy superior a los conocidos hasta el momento en el estado de la técnica. Además, se obtiene un ingenol con menor concentración de impurezas, lo que hace al ingenol así aislado, más apropiado para ser el compuesto de partida en procesos para obtener derivados del mismo, con mayor rendimiento y pureza, utilizables como fármacos.

El ingenol obtenido mediante el método descrito en la presente invención, puede utilizarse para la obtención de derivados esterificados de dicho ingenol, que son biológicamente activos, como por ejemplo el ingenol-3-tigliato (Fórmula II) y el ingenol-3-angelato (Fórmula III). El método de obtención de dichos derivados biológicamente activos, incluye un paso intermedio de síntesis del compuesto ingenol 5,20-acetonido (Fórmula IV) y posteriormente su esterificación (Esquema 1), para dar lugar a los compuestos biológicamente activos mencionados anteriormente, según técnicas conocidas en el estado de la técnica, para dicho fin.

Esquema 1. Método de obtención de derivados de ingenol biológicamente activos mediante métodos conocidos en el estado de la técnica a partir del ingenol obtenido según el método descrito en la presente invención.



Los derivados biológicamente activos obtenidos a partir del ingenol mediante el método descrito en la presente invención, presentaron una pureza mayor al 99%. Para el caso particular de la obtención de ingenol 3-angelato, a partir del ingenol obtenido mediante el método descrito en la presente invención, el rendimiento de obtención del mismo mejora significativamente el rendimiento por Kg de materia cruda, y es mucho más eficiente y escalable industrialmente, que los métodos descritos, en el estado de la técnica, para la obtención de dicho producto (Hohmann, J. et al., Planta Med. 2000, 66: 291-294). Así, el rendimiento de la producción de ingenol 3-angelato a partir de *Euphorbia peplus*, conocido en el estado de la técnica, es de 1.1 mg por cada Kg de planta, mientras que con el método de la presente invención, combinando la extracción de ingenol de semillas en polvo de *Euphorbia Lathyris*, seguida de un proceso de semisíntesis química del derivado ingenol 3-angelato, se pueden obtener hasta 190 mg por cada Kg de semillas en polvo de *Euphorbia Lathyris*.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un método de aislamiento de ingenol a partir de mezclas que comprenden ésteres diterpenoides (incluyendo los ésteres de ingenol), que combina en un único paso las etapas de hidrólisis y aislamiento/extracción de dicho ingenol y que, además comprende, opcionalmente, una etapa adicional de purificación del ingenol aislado. A lo largo de la presente invención, los términos aislamiento y extracción, referidos al ingenol, deben interpretarse como equivalentes.

Para ello, el método de la invención somete a la mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol a un único paso de tratamiento combinado con una solución de agua acidificada y un disolvente orgánico, preferentemente, el rango de agua acidificada y disolvente orgánico es 1:1.

El disolvente orgánico preferido es THF y también, preferentemente, el agua acidificada contiene sales inorgánicas, más preferentemente, el agua acidificada es una salmuera acidificada que contiene NaCl. La concentración de NaCl presente en el agua o salmuera acidificada, es a saturación, es decir aproximadamente 35% peso/volumen. A efectos de la presente invención, el término salmuera ácida se refiere a agua acidificada en la que está presente una determinada concentración de sal o sales, inorgánicas, específicamente de NaCl.

En una realización preferida, la solución de agua acidificada y disolvente orgánico utilizada en el método de la invención, está formada por una combinación de H_2SO_4 a una concentración de 2N y $\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl}$ al 35% peso/volumen (p/v), en una relación 1:1.

5 El método de la invención además comprende, opcionalmente, una etapa adicional de purificación del ingenol aislado. Preferentemente dicha etapa de purificación del ingenol se realiza mediante cromatografía en columna, por gravedad.

10 En una forma preferida de llevar a cabo el método de la invención, el único paso de hidrólisis y aislamiento/extracción de ingenol se lleva a cabo en un procedimiento que parte de material vegetal y que comprende las etapas de:

- a) El material vegetal, preferentemente 100 gr de semillas, trituradas y homogenizadas se somete a agitación mecánica, preferentemente durante 4 horas, a temperatura ambiente, en una solución metanólica conteniendo metilato sódico, preferentemente a una concentración

15 0.20 N.
- b) Neutralizar la reacción anterior con una solución de un ácido acético glacial o ácido perclórico, a una concentración (0,03 M).
- c) Filtrar o succionar la solución anterior, preferentemente sobre celite.
- d) Lavar el pellet obtenido en la etapa previa con metanol al 70%.
- 20 e) Concentrar el pellet, preferentemente, en rotavapor.
- f) Extraer del pellet anterior la fracción que contiene los ésteres de ingenol con éter petróleo.
- g) Aislar el ingenol del resto de compuestos comprendidos en la fracción obtenida en la etapa anterior f), mediante un único paso de tratamiento combinado con agua acidificada y THF.
- h) Opcionalmente, purificar el ingenol aislado en la etapa anterior

25 En una forma preferida de realización de la invención el material vegetal son semillas de *Euphorbia lathyris*.

30 La agitación mecánica se lleva a cabo preferentemente mediante un rotor propulsado por un motor eléctrico. En una forma preferida de realización de la invención las semillas se someten a esta agitación mecánica habiendo sido previamente trituradas y más preferentemente trituradas hasta ser convertidas en polvo de semillas.

En otra forma preferida en el método de aislamiento de ingenol a partir de material vegetal de partida utilizado, la solución de agua acidificada está formada preferentemente por una combinación de H_2SO_4 a una concentración de 2N y $\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl}$ al 35% p/v, en una relación 1:1.

- 5 En otra forma preferida en el método de aislamiento de ingenol a partir de material vegetal de partida utilizado, la etapa de purificación del ingenol se realiza mediante cromatografía en columna, por gravedad, preferentemente utilizando una columna de sílica-gel como fase estacionaria, con una fase móvil éter de petróleo-etilacetato.
- 10 Como se ha mencionado repetidamente, el ingenol producido mediante el método de la invención sirve como precursor para la obtención de derivados del mismo biológicamente activos, preferentemente para la obtención de ingenol 3-tigliato (Fórmula II) e ingenol 3-angelato (Fórmula III), que pueden ser utilizados en clínica para el tratamiento de diferentes patologías. Dichos derivados, así como el propio ingenol aislado según el procedimiento de la invención, se obtienen
- 15 con grados de pureza > 99%.

Para ello, en una forma preferente de realización de la invención, el ingenol aislado, opcionalmente purificado, tanto si se obtiene a partir de una mezcla de ésteres de ingenol y de ésteres de diterpenoides, de cualquier origen como si dicha mezcla se origina a partir de una fuente

20 de material vegetal, preferentemente semillas de *E. lathyris*, dicho ingenol se somete a un proceso adicional de semisíntesis química para producir un derivado en posición 3 seleccionado entre: Ingenol 3-tigliato (Fórmula II), Ingenol 3-Angelato (Fórmula III), o mezclas de los mismos. Preferentemente, dicho proceso adicional de semisíntesis química para la obtención de derivados de ingenol en posición 3, al que se somete al ingenol aislado, opcionalmente purificado, tiene como

25 compuesto intermedio común al ingenol 5,20-acetónido (Fórmula IV).

Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objeto ilustrar la invención, sin limitar el alcance de la misma.

30

Ejemplo 1. Método de aislamiento de ingenol (Fórmula I) a partir de semillas de *Euphorbia lathyris* L (tártago).

El polvo de las semillas de *Euphorbia lathyris* L (1 Kg) fue mecánicamente agitado en una

35 solución de 2L de metilato sódico metanólico 0,20 N durante 4 horas. Transcurrido dicho tiempo,

la solución fue neutralizada con ácido acético glacial (o ácido perclórico) y filtrada y/o succionada sobre un lecho de Celite. La pasta obtenida de dicha filtración fue lavada varias veces con metanol (100 ml cada vez), y con los materiales filtrados, se procedió a su concentración, mediante técnicas en vacío, hasta un volumen de 1,5 L y posteriormente se extrajeron con éter de petróleo. A continuación, la fase metanólica obtenida de dicha extracción se evaporó con rotaevaporador y el residuo resultante se fue sometido a una solución de salmuera ácida (2N H₂SO₄+salmuera 1:1, 0.5 L) y THF (0.2 L), a temperatura ambiente. La fase superior obtenida se evaporó a 80° C y el residuo fue purificado por gravedad mediante cromatografía de columna de sílica-gel (150 ml), usando un gradiente de éter de petróleo-EtOAc (etil acetato) hasta obtener 0,750 gr de ingenol (Fórmula I), con una pureza > 99%.

Ejemplo 2. Producción de Ingenol 5,20-acetonido (Fórmula IV).

A partir de una solución de ingenol (100 mg, 0,29 mmol) disuelto en acetona (5 ml), se añadió piridinio p-toluensulfonato (50 mg). La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 12 horas, y después sometida a evaporación. El residuo fue purificado por gravedad en cromatografía de columna hasta alcanzar 62 mg (55% de rendimiento) de ingenol 5,20-acetonido (Fórmula IV). Para datos físicos y de espectroscopía, ver: Bangavathi R. et al. On the Chemistry of Ingenol IV. Z. Naturforsch. 1991, 46b, 1425-1433.

Ejemplo 3. Producción de Ingenol tigliato (Fórmula II)

Una solución de ingenol 5,20-acetonido (100 mg, 0,26 mmol), ácido tíglico (39 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) y DMAP (48 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) en tolueno (4 mL), fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, a continuación filtrada sobre un lecho de Celite y evaporada. El material resultante fue filtrado en gel de sílice (ca. 5 g) y evaporado. El residuo fue purificado mediante gravedad por cromatografía de columna en gel de sílice (5 g, éter de petróleo-EtOAc 85:15) hasta alcanzar más de 80 mg de ingenol-3-tigliato, con una pureza > 99%). Para datos físicos y de espectroscopía, ver: Hohmann J et al. Planta Medica 2000, 66, 291-294.

Ejemplo 4. Producción de Ingenol angelato (Fórmula III)

Una solución de ingenol 5,20-acetonido (100 mg, 0,26 mmol), ácido angelico (39 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) y DMAP (48 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) en tolueno (4 mL), fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, a continuación filtrada sobre un lecho de Celite y

evaporada. El material resultante fue filtrado en gel de sílice (ca. 5 g) y evaporado. El residuo fue purificado mediante gravedad por cromatografía de columna en gel de sílice (5 g, eter de petróleo-EtOAc 85:15) hasta alcanzar más de 80 mg de ingenol 3-angelato, con una pureza > 99%. Para datos físicos y de espectroscopía, ver: Hohmann J et al. *Planta Medica* 2000, 66, 291-294.

BIBLIOGRAFIA

- Adolf W and Hecker EZ. Krebsforsch. 1975, 84, 325-344.
- Appendino G et al., An expeditious procedure for the isolation of Ingenol from the seeds of
5 euphorbia lathyris. J Nat Prod. 1999 Jan;62(1):76-9.
- Bangavathi R. et al. On the Chemistry of Ingenol IV. Z. Naturforsch. 1991, 46b, 1425-1433.
- Benhadji KA et al. Antiproliferative activity of PEP005, a novel Ingenol angelate that modulates PKC functions, alone and in combination with cytotoxic agents in human colon
10 cancer cells. Br J Cancer. 2008 Dec 2;99(11):1808-15.
- Duke, J. D. Handbook of Energy Crops (Disponibile en Internet en <http://www.hort.purdue.edu/newcrop>).
- Evans FJ and Kinghorn ADJ. Linn. Soc. Bot. (London) 1977, 74, 23-35.
- Evans, F. J. and Taylor, S. E., in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*,
15 Vol. 44, ed.W. Herz, H. Grisebach and G. W. Kirby. Springer, Vienna, 1983, p. I.
- Fujiwara M et al., Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by Ingenol triacetate. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Jan;40(1):271-3.
- Herz W, Fujiwara M et al. Upregulation of HIV-1 replication in chronically infected cells by ingenol derivatives. Arch Virol. 1998; 143(10):2003-10.
- Hohmann, J. et al. Diterpenoids from *Euphorbia peplus*. Planta Med. 66 (2000); 291: 294.
- Kedei N et al. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase
20 C. Cancer Res. 2004;64(9):3243-55.
- Le TT et al. Immunostimulatory cancer chemotherapy using local ingenol-3-angelate and synergy with immunotherapies. Vaccine. 2009 May 18;27(23):3053-62.
- Mainieri F et al. Synthesis of Sapintoxin D and N-Methylantranilate-based Fluorescent
25 Bioprobes. Nat. Prod. Commun. 2007, 2, 375-379.
- Ogbourne SM et al. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. Cancer Res 2004;64:2833-9.
- Olsnes AM et al. The protein kinase C agonist PEP005 increases NF-kappaB expression,
30 induces differentiation and increases constitutive chemokine release by primary acute myeloid leukaemia cells. Br J Haematol. 2009 Jun;145(6):761-74.
- Warrilow D et al., HIV type 1 inhibition by protein kinase C modulatory compounds. AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Sep;22(9):854-64.

REIVINDICACIONES

1. Método de aislamiento de ingenol a partir de una mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol que combina, en un único paso, las etapas de hidrólisis de los ésteres de ingenol y extracción/aislamiento del ingenol de dicha mezcla.
5
2. Método según la reivindicación 1 en que la mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol se somete un único paso de tratamiento combinado, con una solución de agua acidificada y un disolvente orgánico.
10
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en que la relación de agua acidificada y disolvente orgánico es 1:1.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en que el disolvente orgánico es THF.
15
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en que el agua acidificada contiene sales inorgánicas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en que el agua acidificada contiene NaCl.
20
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado por que la solución de agua acidificada y disolvente orgánico está formada por una combinación de H_2SO_4 2N y H_2O más NaCl al 35% peso/volumen, en una relación 1:1.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que, además comprende, una etapa adicional de purificación del ingenol aislado.
9. Método según la reivindicación 8 caracterizado porque la etapa de purificación del ingenol aislado se realiza mediante cromatografía en columna, por gravedad.
30
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 en que el ingenol aislado, opcionalmente purificado, se somete a un proceso adicional de semisíntesis química para producir un derivado en posición 3 seleccionado entre: Ingenol 3-tigliato, Ingenol 3-angelato o mezclas de los mismos.

11. Método según la reivindicación 10 en que el proceso adicional de semisíntesis química para la obtención de derivados de ingenol en posición 3, al que se somete al ingenol aislado, opcionalmente purificado, tiene como compuesto intermedio común al ingenol 5,20-acetónido.

5 12. Método de aislamiento de ingenol a partir de material vegetal que comprende las etapas de:

a) Someter el material vegetal a agitación mecánica en una solución de metilato sódico metanólico.

10 b) Neutralizar la reacción anterior con una solución de un ácido acético glacial o ácido perclórico.

c) Filtrar o succionar la solución anterior.

d) Lavar el pellet obtenido en la etapa previa con metanol.

e) Concentrar el pellet mediante técnicas en vacío.

f) Extraer del pellet la fracción que contiene los ésteres de ingenol, con éter petroleo.

15 g) Aislar el ingenol del resto de compuestos contenidos en la fracción obtenida en la etapa anterior f), mediante tratamiento con agua acidificada y THF.

h) Opcionalmente, purificar el ingenol aislado

20 13. Método según la reivindicación 12 caracterizado por que el material vegetal son semillas de *Euphorbia lathyris*.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 en el que la concentración de metilato sódico metanólico es 0.20 N y el tiempo a que se someten las semillas a agitación mecánica es de 4 horas.

25

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 caracterizado por que la filtración o succión del paso c) se realiza sobre celite.

30 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 caracterizado por que la solución de agua acidificada está formada preferentemente por una combinación de H₂SO₄ 2N y H₂O más NaCl al 35% peso/volumen, en una relación 1:1.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 caracterizado porque la etapa de purificación del ingenol se realiza mediante cromatografía en columna, por gravedad.

35

18. Método según la reivindicación 17 caracterizado por que se emplea una columna de sílica-gel como fase estacionaria, con una fase móvil éter de petróleo-etilacetato.

5 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en que el ingenol aislado, opcionalmente purificado, se somete a un proceso adicional de semisíntesis química para producir un derivado en posición 3 seleccionado entre: Ingenol 3-tigliato, Ingenol 3-angelato o mezclas de los mismos.

10 20. Método según la reivindicación 19 en que el proceso adicional de semisíntesis química para la obtención de derivados de ingenol en posición 3, al que se somete al ingenol aislado, opcionalmente purificado, tiene como compuesto intermedio común al ingenol 5,20-acetónido.



- ②① N.º solicitud: 201131601
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C49/727** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	APPENDINO, G. et al.: "An Expeditious Procedure for the Isolation of Ingenol from the Seeds of Euphorbia lathyris", J. Nat. Products (1999), vol. 62 (1), pp.: 76-79.	1-20
A	WO 2007000618 A1 (AMAZONIA FITOMEDICAMENTOS LTDA et al.) 04.01.2007, todo el documento.	1-20
A	RU 2008102593 A (AMAZONIJA FITOMEDIKAMENTUS LTDA) 10.08.2009, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013].	1-20
A	ONWUKAEME N D et al. Jatrophone and lathyrane diterpenoid esters from north american leafyspurge seed. PHYTOCHEMISTRY, 01.10.1992 VOL: 31 No: 10 Pags: 3479-3482 (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV199395009155.	1-20
A	BICCHI CARLO et al. HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (Euphorbia lathyris) seed oil. Phytochemical Analysis 07.2001 VOL: 12 No: 4 Pags: 255-262, (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV200100396123.	1-20
A	ABO K A et al. INGENOL ESTERS FROM THE PRO INFLAMMATORY FRACTION OF EUPHORBIA-KAMERUNICA. Phytochemistry (Oxford) 1982 VOL: 21 No: 3 Pags: 725-726, (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV198375015145.	1-20
A	GUNDIDZA M et al. A skin irritant principle from Euphorbia matabelensis Pax. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 01.08.1993 VOL: 39 No: 3 Pags: 209-212 ISSN 0378-8741 Doi: doi:10.1016/0378-8741(93)90038-7.	1-20
A	FERREIRA ANA MARGARIDA V D et al. Jatrophone and lathyrane diterpenoids from Euphorbia hyberna L.. Phytochemistry (Amsterdam) 10.2002 VOL: 61 No: 4 Pags: 373-377 ISSN 0031-9422 (ISSN print).	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.02.2013

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

C07C

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-20	SI
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-20	SI
	Reivindicaciones		NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	APPENDINO, G. et al.: "An Expeditious Procedure for the Isolation of Ingenol from the Seeds of <i>Euphorbia lathyris</i> ", J. Nat. Products (1999), vol. 62 (1), pp.: 76-79.	
D02	WO 2007000618 A1 (AMAZONIA FITOMEDICAMENTOS LTDA et al.)	04.01.2007
D03	RU 2008102593 A (AMAZONIA FITOMEDIKAMENTUS LTDA)	10.08.2009
D04	ONWUKAEME N D et al. Jatrophone and lathyrane diterpenoid esters from north american leafyspurge seed. PHYTOCHEMISTRY, 01.10.1992 VOL: 31 No: 10 Pags: 3479-3482 (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV199395009155.	01.10.1992
D05	BICCHI CARLO et al. HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (<i>Euphorbia lathyris</i>) seed oil. Phytochemical Analysis 07.2001 VOL: 12 No: 4 Pags: 255-262, (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV200100396123.	30.06.2001
D06	ABO K A et al. INGENOL ESTERS FROM THE PRO INFLAMMATORY FRACTION OF <i>EUPHORBIA-KAMERUNICA</i> . Phytochemistry (Oxford) 1982 VOL: 21 No: 3 Pags: 725-726, (resumen), BIOSIS [en línea], Thomson Scientific, Philadelphia, PA, USA. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 13.02.2013], nº de acceso de BIOSIS PREV198375015145.	30.11.1981
D07	GUNDIDZA M et al. A skin irritant principle from <i>Euphorbia matabelensis</i> Pax. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 01.08.1993 VOL: 39 No: 3 Pags: 209-212 ISSN 0378-8741 Doi: doi:10.1016/0378-8741(93)90038-7.	01.08.1993
D08	FERREIRA ANA MARGARIDA V D et al. Jatrophone and lathyrane diterpenoids from <i>Euphorbia hyberna</i> L.. Phytochemistry (Amsterdam) 10.2002 VOL: 61 No: 4 Pags: 373-377 ISSN 0031-9422 (ISSN print).	30.09.2002

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

La solicitud reivindica un procedimiento para el aislamiento de ingenol a partir de una mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol. Este método combina en un único paso la hidrólisis de los ésteres de ingenol y la extracción y el aislamiento de ingenol de la mezcla.

Para llevar a cabo el procedimiento se pone en contacto la mezcla de ésteres anteriormente citada con una combinación de agua (acidificada con ácido sulfúrico concentrado) y un disolvente orgánico (tetrahidrofurano).

Asimismo, se reivindica una etapa opcional de semisíntesis para producir un derivado de ingenol en posición 3 a partir de ingenol obtenido mediante las etapas anteriores del procedimiento.

D01-D08 constituyen el estado de la técnica anterior. De ellos D01 representa el más cercano a la solicitud. Se refiere a un procedimiento de obtención de ingenol a partir de semillas de *Euphorbia lathyris*. Es un procedimiento sensiblemente más complejo que el de la solicitud con varias etapas que incluyen lavados, extracciones con distintos disolventes, filtrados y cromatografías.

El principal objeto de la invención es aportar un procedimiento más simple y breve que el descrito en D01 con el consiguiente ahorro de tiempo y material y que acorta el tiempo de exposición a los intermediarios tóxicos que se generan en los procedimientos de extracción de ingenol.

D02-D08 se refieren a distintos procedimientos de extracción de diversos ésteres de ingenol a partir de varias especies del género *Euphorbia*.

Ni de D01 ni del resto de documentos puede inferirse de una manera obvia el procedimiento simplificado reivindicado en la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-20 cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 y de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/ de 1986.