

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 637**

21 Número de solicitud: 201300916

51 Int. Cl.:

C07C 39/08	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C07C 69/612	(2006.01)		
A61K 31/05	(2006.01)		
A61K 31/047	(2006.01)		
A61P 3/02	(2006.01)		
A61P 7/02	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.07.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Pabellón de Brasil - Paseo de las Delicias s/n
41013 Sevilla ES

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ BOLAÑOS, Jose María;
MAYA CASTILLA, Inés;
GONZÁLEZ BENJUMEA, Alejandro;
LÓPEZ GARCÍA, María Ángeles;
ALARCÓN DE LA LASTRA ROMERO, Catalina;
VILLEGAS LAMA, Isabel;
SÁNCHEZ FIDALGO, Susana y
APARICIO SOTO, Marina

54 Título: **Nuevos antiinflamatorios basados en polifenoles del olivo**

57 Resumen:

El objeto de la invención se centra en la síntesis por dos rutas alternativas del (3,4-dihidroxifenil)glicol (6), producto natural presente en el olivo, y en la síntesis de (3,4-dihidroxifenil)diacilglicoles (12). Tanto (6) como (12) son útiles como antiinflamatorios no esteroideos. De igual manera, los alcanosatos de hidroxitirosilo y diversos tioderivados del hidroxitirosol poseen propiedades antiinflamatorias. Por último, el acetato de hidroxitirosilo reduce el daño provocado en el colon de ratones en un modelo de colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS).

DESCRIPCIÓN

Nuevos antiinflamatorios basados en polifenoles del olivo.

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a productos basados en polifenoles del olivo que proporcionan aplicaciones con notables ventajas en base a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

10

Esta invención es de aplicación en la Industria Alimentaria, Cosmética y Farmacéutica.

ANTECEDENTES EN EL ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Atendiendo al estado de la técnica, no existen antecedentes de la síntesis del compuesto natural 3,4-dihidroxifenilglicol, el cual ha sido aislado del alperujo (J. Fernández-Bolaños Guzmán; G. Rodríguez Gutiérrez; A. Lama Muñoz; F. Senent Rubio; J. M. Fernández-Bolanos Guzmán; I. Maya Castilla; O. López López; A. Maset Castro, PCT Int. Appl. (2013), WO 2013007850 A1 20130117) o de aceitunas de mesa (G. Rodríguez; A. Lama; S. Jaramillo; J.M. Fuentes-Alventosa; R. Guillén; A. Jimenez-Araujo; R. Rodríguez-Arcos; J. Fernandez-Bolanos, J. Agr. Food Chem. 57, 2009, 6298-6304). Tampoco existen antecedentes de derivados acilados del 3,4-dihidroxifenilglicol.

20

25

Algunos polifenoles presentes en el olivo presentan propiedades antiinflamatorias que han sido descritas, bien como productos puros o como extractos. Así, el aceite de oliva virgen extra suplementado con hidroxitirosol (HT) ejerce un papel beneficioso sobre la colitis crónica inducida por DSS gracias a su capacidad de reducir la expresión de proteínas inflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y modular la interleucina-10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (S. Sánchez-Fidalgo, L. Sánchez de Ibarguen, A. Cárdeno, C. Alarcón de la Lastra, Eur. J. Nutr. 51, 2012, 497–506). El HT y la oleuropeína extraídos de hojas de olivo presentan actividades antiinflamatorias y analgésicas (E. Haloui; B. Marzouk; Z. Marzouk; A. Bouraoui; N. Fenina, J. Food Agr. Environ. 9, 2011, 128-133). Se ha demostrado que el HT es el

30

principal compuesto antiinflamatorio en extractos acuosos de aceitunas y que reduce la producción de citocinas y quimiocinas en macrófagos (N. Richard; S. Arnold; U. Hoeller; C. Kilpert; K. Wertz, Karin; J. Schwager, *Planta Medica*, 77, 2011, 1890-1897). Se ha demostrado la actividad antiinflamatoria del HT y la inhibición de producción de citocinas en un modelo de neuroinflamación asociado al Parkinson (R. Crea; C. M. Bittle.; L. M. Bolin; P. Pontoniere, *Agro Food Ind. Hi-Tec.* 23, 2012, 26-29).

Se ha descrito que alquil éteres en la cadena lateral ejercen efectos antiinflamatorios superiores a los que presenta el HT (J. J. Reyes, J. P. De La Cruz, J. Muñoz-Maín, A. Guerrero, J. A. López-Villodres, A. Madrona, J. L. Espartero, J. A. González-Correa, *Eur. J. Nutr.* 52, 2013, 591-599). También se han descrito las propiedades antiinflamatorias del oleocantal, un tirosil ester del dialdehído del ácido elenólico, p-HPEA-EDA (S. Cicerale; L. J. Lucas; R. S. J. Keast, (Ed.) D. Boskou, *Olive Oil*, 2012, 357-374; L. Lucas; S. Cicerale; R. Keast, *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 10, 2011, 399-406; M. Scotece; R. Gómez; J. Conde; V. López; J. Gómez-Reino; F. Lago; A. B Smith; O. Gualillo, *Life Sci.* 91, 2012, 1229-1235). También se ha demostrado la capacidad de fenoles del olivo, incluyendo HT, tirosol, y sus derivados secoiroideos, en la modulación de la producción de mediadores inflamatorios en monocitos humanos recién aislados de donadores sanos. (P. Rosignoli, R. Fuccelli, R. Fabiani, M. Servili, G. Morozzi, *J. Nutr. Biochem.* 24, 2013, 1513-1519).

No existe ningún antecedente que describa las propiedades antiinflamatorias del 3,4-dihidroxifenilglicol, ni de sus derivados acilados, ni de los alcanos de hidroxitirosilo. Tampoco existen datos sobre las propiedades antiinflamatorias de los tio derivados del HT.

Así, a luz de los antecedentes descritos, la invención "Nuevos antiinflamatorios basados en polifenoles del olivo" aporta notables ventajas en la prevención y tratamiento de enfermedades asociadas a procesos inflamatorios y autoinmunes como artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso y enfermedad inflamatoria intestinal.

Así mismo, dentro de la Industria Alimentaria puede ser útil para la formulación de alimentos funcionales o como aditivos para prevenir el deterioro del alimento mejorando

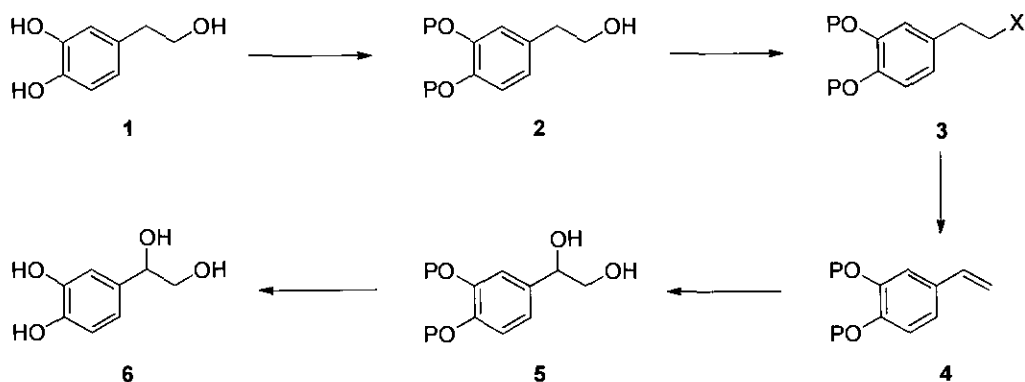
sus propiedades organolépticas o nutricionales. En la Industria Farmacéutica el uso de estos compuestos estaría encaminado a la obtención de nuevos fármacos antiinflamatorios o formulaciones que lo contengan, para su administración por vía oral, tópica o rectal. En la Industria Cosmética estos compuestos podrán utilizarse como componentes de cremas solares y antienvjecimiento por su capacidad de captación de radicales libres.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

A modo explicación de la invención "Nuevos antiinflamatorios basados en polifenoles del olivo", el mismo consiste en dos procedimientos para obtener 3,4-dihidroxifenilglicol **6**.

Opción 1 Procedimiento de síntesis del 3,4-dihidroxifenilglicol a partir del HT

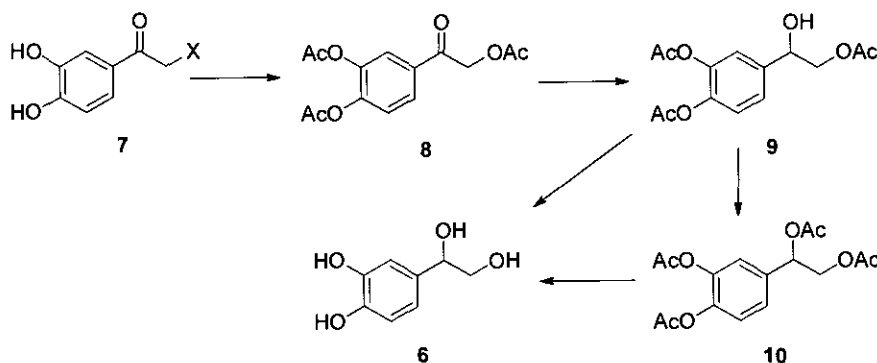
Se parte de HT **1**, a la vista del Esquema 1 que se expondrá a continuación, y se protegen los hidroxilos fenólicos con grupos tales como grupos bencilos o un grupo *o*-xilileno para dar **2**. La halogenación de la cadena lateral de **2** por sustitución del hidroxilo alifático por halógeno y posterior deshidrohalogenación de **3** conduce al vinilcatecol O-protegido **4** que es dihidroxilado para dar **5**, usando por ejemplo tetróxido de osmio. Por último la desprotección del fragmento de catecol conduce a **6**.



Esquema 1.

Opción 2 Procedimiento de síntesis del 3,4-dihidroxifenilglicol a partir de cloruro de 3,4-dihidroxifenacilo.

El segundo procedimiento de preparación de 3,4-dihidroxifenilglicol **6** a la vista del Esquema 2 que se expondrá a continuación parte de haluro de 3,4-dihidroxifenacilo **7** que se transforma en la triacetoxiacetofenona **8** siguiendo una modificación del procedimiento de H. Voswinckel, Ber. Dtsch. Chem. Ges.42, 1910, 4651-4654. La hidrogenación de **8** se puede llevar a cabo con distintos catalizadores tales como Pd/C, Pd(OH)₂/C, Nickel Raney, en disolventes como etanol, metanol, THF, conteniendo o no anhídrido acético. Se forma en dichas condiciones mezclas de **9** y **10** que se convierten en **10** por acetilación convencional, con rendimiento de **10** del 80% calculado a partir de **8**. También obtenemos **9** por reducción de **8** con hidruros de boro como el triacetoxiborohidruro, en presencia o en ausencia de tricloruro de cerio. La hidrólisis de **9**, de **10** o de mezclas de **9** y **10** para dar **6** se lleva a cabo en medio acuoso y catálisis ácida o básica.

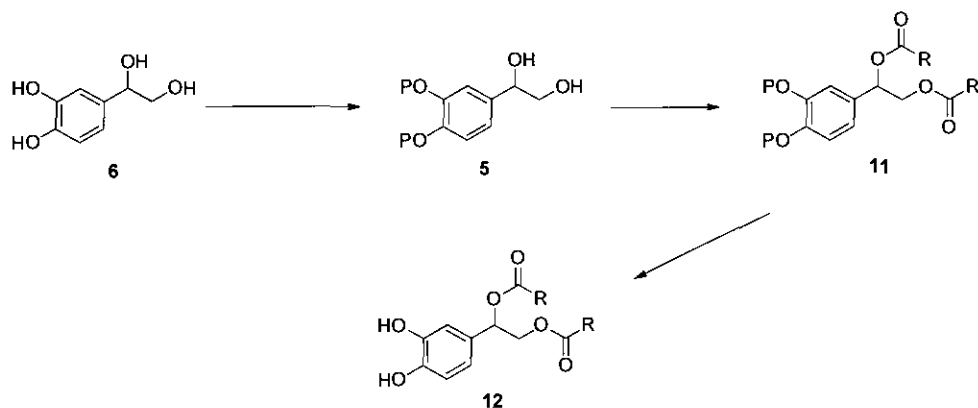


Esquema 2.

Procedimiento de síntesis de (3,4-dihidroxifenil)diacilglicoles

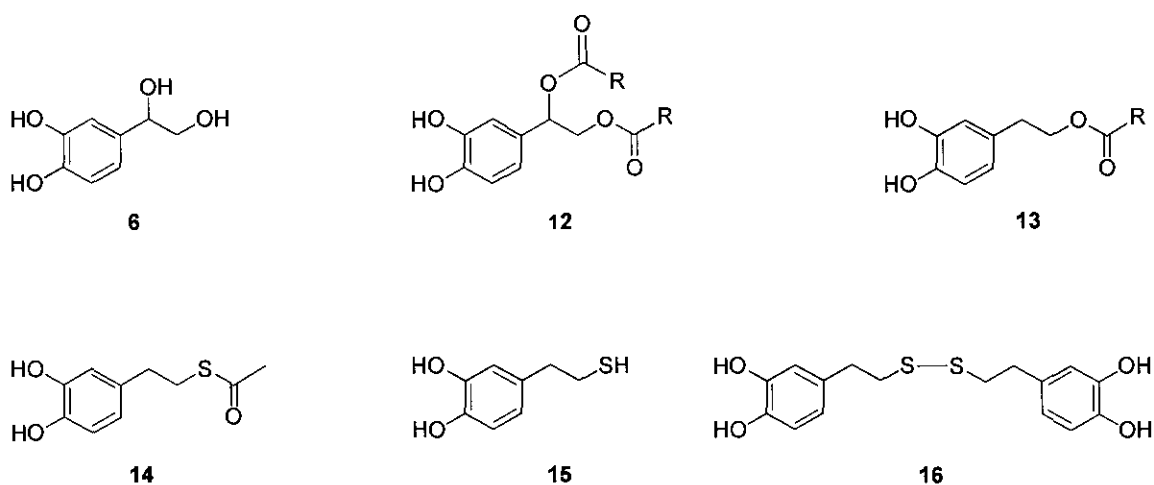
Consistente en la preparación de (3,4-dihidroxifenil)diacilglicoles **12** mediante el procedimiento descrito en el Esquema 3 que se expondrá a continuación. El intermedio clave es el glicol **5** al que se puede acceder desde el HT (Esquema 1), o por protección de **6**, sintético o extraído de diversas fuentes naturales, con reactivos como haluro de bencilo

o dihaluro de o-xilileno. La acilación exhaustiva de **11** conduce a los diacil derivados **11** cuya desprotección conduce a **12**.



Esquema 3.

Así mismo, la presente invención incluye las propiedades antiinflamatorias del 3,4-dihidroxifenilglicol presente en la pulpa de aceituna, en el aceite de oliva virgen extra y en alperujo. Es decir, la presente invención también remarca la actividad antiinflamatoria del 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**), de los 4-(1,2-diaciloxyetil)benzene-1,2-diol (**12**), de los alcenoatos de hidroxitirosilo (**13**), y de los tioderivados de HT **14-16** en macrófagos peritoneales de ratón estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) comparándolos con HT (**1**).



Es decir, se recalcan las propiedades antiinflamatorias de los derivados lipófilos del HT y del 3,4-dihidroxifenilglicol, conteniendo grupos acilo en la cadena lateral. Gracias a la lipofilia aportada por los grupos acilo los nuevos antiinflamatorios pueden ser añadidos a matrices lipídicas como por ejemplo aceites vegetales y de pescado, con lo que se obtendrían alimentos funcionales con propiedades antiinflamatorias potenciadas. Además, mostramos las propiedades anti-inflamatorias de los derivados de HT.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de inflamaciones en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la ingesta dietética de una cantidad terapéuticamente efectiva del acetato de hidroxitirosilo (**13**, R = Me) y de esta forma poner de manifiesto los beneficios de la terapia nutricional a base de **13** en la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal, mediante su incorporación a diferentes formas de soporte nutricional útiles en patología digestiva como la nutrición oral, parenteral total, dietas enterales o suplementos nutricionales.

Descripción de las figuras

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Fig. 1. Efecto del acetato de hidroxitirosilo (**13**), del 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**) y sus derivados 4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (**12a**) y 4-(1,2-dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (**12b**), así como de los tioderivados del HT, el tioacetilado (**14**), tihidroxitirosol (**15**) y disulfuro de hidroxitirosol (**16**) en la producción de nitritos en el modelo de macrófagos peritoneales de ratón. HT ha sido usado como producto de referencia. Las células fueron previamente tratadas con los diferentes compuestos y tras 30 minutos estimuladas con LPS. Después de 18 h los sobrenadantes fueron recogidos para la evaluación de nitritos por el método de Griess. ***($p < 0.001$) diferencias significativas respecto al grupo control LPS; +(p<0.05) diferencias significativas respecto al grupo HT.

Fig. 2. Efecto de (13), (6), (12a), (12b), (14), (15) y (16) en la expresión de iNOS en el modelo de macrófagos peritoneales de ratón. Las células fueron previamente tratadas con los diferentes compuestos y tras 30 minutos estimuladas con LPS. Después de 18 h las células fueron recogidas para la determinación proteica por western blot. HT ha sido usado como producto de referencia y los western blots han sido normalizados al patrón de carga β -actina. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. *(p<0.05), ** (p<0.01) y ***(p<0.001) diferencias significativas respecto al grupo control LPS.

Fig. 3. Efecto de (13), (6), (12a), (12b), (14), (15) y (16), en la expresión de COX-2 en el modelo de macrófagos peritoneales de ratón. Las células fueron previamente tratadas con los diferentes compuestos y tras 30 minutos estimuladas con LPS. Después de 18 h las células fueron recogidas para la determinación proteica por western blot. HT ha sido usado como producto de referencia y los western blots han sido normalizados al patrón de carga β -actina. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. *(p<0.05) y ** (p<0.01) diferencias significativas respecto al grupo control LPS.

Fig. 4. Efecto de (13), (6), (12a), (12b), (14), (15) y (16) en la expresión de IkappaB en el modelo de macrófagos peritoneales de ratón. Las células fueron previamente tratadas con los diferentes compuestos y tras 30 minutos estimuladas con LPS. Después de 18 h las células fueron recogidas para la determinación proteica por western blot. HT ha sido usado como producto de referencia y los western blots han sido normalizados al patrón de carga β -actina. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. ***(p<0.001) diferencias significativas respecto al grupo control LPS; ++(p<0.01) y +++(p<0.001) diferencias significativas respecto al grupo HT.

Fig. 5. Evolución del peso de los animales de experimentación desde el comienzo de tratamiento con DSS al 3 % p/v en el agua de bebida (D0) hasta el final del estudio.

Fig. 6. Pérdida de peso experimentada por los animales de experimentación, expresada en porcentaje, durante todo el período experimental. *** $p < 0.001$ vs Control y ++ $p < 0.01$ vs Control-DSS.

5 **Fig. 7.** Longitud del colon obtenido de los animales de experimentación, expresado en centímetros. * $p < 0.05$ vs Control.

Fig. 8. Relación peso/longitud del colon, expresada en gramos por centímetros (g/cm). * $p < 0.05$ vs Control y +++ $p < 0.001$ vs Control-DSS.

10

Fig. 9. Índice de actividad de la enfermedad (DAI), expresada como promedio de las escalas de pérdida de peso, consistencia de las heces y presencia de sangre en las mismas. *** $p < 0.001$ vs Control y +++ $p < 0.001$ vs Control-DSS.

15

Fig. 10. Actividad mieloperoxidasa (MPO) como medida de la infiltración neutrofílica en el tejido colónico, expresada en unidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (U/mg tejido). *** $p < 0.001$ vs Control y + $p < 0.05$ vs Control-DSS.

20

Fig 11. Evaluación histológica del tejido colónico tras la administración de una dieta suplementada con acetato de hidroxitirosilo (**13**). Las imágenes son representativas de la sección colónica de los grupos ensayados (control, control DSS, DSS + (**13**)), tras la tinción con hematoxilina/eosina a un aumento 10X.

25

Fig. 12. Efecto de la dieta suplementada con **13** en la expresión de iNOS y COX-2 en el modelo in vivo de colitis ulcerosa inducida por DSS. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. * $p < 0.05$ vs Control y + $p < 0.05$ vs Control-DSS.

30

Fig. 13. Efecto de la dieta suplementada con **13** en la expresión de la p-p38 y JNK MAPKs en el modelo in vivo de colitis ulcerosa inducida por DSS. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. * $p < 0.05$ vs Control y + $p < 0.05$ vs Control-DSS.

Fig. 14. Efecto de la dieta suplementada con acetato de hidroxitirosilo (**13**) en la expresión de $\text{I}\kappa\text{B}$ en el modelo in vivo de colitis ulcerosa inducida por DSS. Los valores son expresados en unidades arbitrarias tras medir la intensidad de las señales por densitometría. * $p < 0.05$ vs Control.

5

EJEMPLO DE REALIZACIÓN PREFERENTE

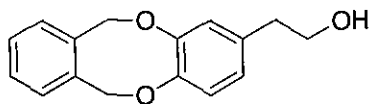
En una realización preferida de la invención "Nuevos basados en polifenoles del olivo" se incluye a continuación un primer apartado a modo de ejemplo de síntesis de los compuestos principales, seguido de dos apartados donde se presentan resultados a modo de evaluación de sus aplicaciones.

10

A. SÍNTESIS DE COMPUESTOS

15

2-[3',4'-(*o*-Xililenodioxi)fenil]etanol (2)



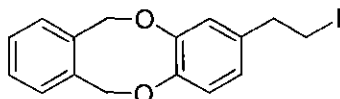
A una disolución de **1** (200 mg, 1.30 mmol) en H_2O -EtOH 1:5 (12 mL) se añadió K_2CO_3 (358 mg, 2.60 mmol), ascorbato sódico (260 mg, 1.30 mmol) y α,α' -dibromo-*o*-xileno (342 mg, 1.30 mmol) y se agitó a 55 °C durante 5 h bajo atmósfera de argón. A continuación, se concentró a sequedad, el residuo se disolvió en AcOEt y se lavó con H_2O y la fase acuosa se extrajo tres veces con AcOEt. El conjunto de las fases orgánicas se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt:hexano 1:3). El compuesto **2** se obtuvo como un sólido incoloro. Rendimiento: 67%; p.f.: 100-102 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.28-7.12 (m 4H), 6.93 (d 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.83 (d 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.74 (dd 1H), 5.39 (s 2H), 5.36 (s 2H), 3.74 (t 2H, $J = 6.6$ Hz), 2.70 (t 2H), 1.71 (s.a. 1H).

20

25

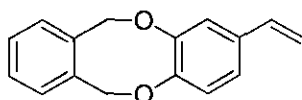
30

1,2-(*o*-Xililenodioxi)-4-(2-yodoetil)benceno (3)



A una disolución de **2** (300 mg, 1.18 mmol) en THF seco (10 mL) y atmósfera inerte, se
 5 añadió PPh_3 (308 mg, 1.18 mmol), imidazol (160 mg, 2.36 mmol), I_2 (448 mg, 1.76 mmol) y
 tamiz molecular 4Å y se calentó a reflujo durante 2.5 h. A continuación, se filtró la mezcla
 de reacción, se evaporó el disolvente, y el residuo resultante se disolvió en AcOEt (40
 mL), añadiéndose una disolución saturada de NaHCO_3 ac. (10 mL) y una disolución
 10 saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ac. (10 mL). Se agitó durante unos minutos hasta desaparición del
 color amarillento y se separó la fase orgánica de la acuosa, extrayéndose esta última con
 AcOEt (3 x 30 mL). El conjunto de las fases orgánicas se secó con MgSO_4 anhidro, se
 filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó mediante cromatografía en
 columna (AcOEt-hexano 1:30) y se obtuvo **3** como un sólido. Rendimiento: 80%; p.f.: 57-
 59 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.30-7.16 (m 4H), 6.94 (d 1H, J = 8.1 Hz), 6.82 (d 1H,
 15 J = 1.9 Hz), 6.73 (dd 1H), 5.41 (s 2H), 5.39 (s 2H), 3.27 (m 2H), 3.04 (t 2H, J = 7.8 Hz).

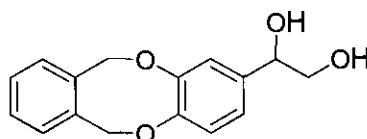
1,2-(o-Xililenodioxi)-4-vinilbenceno (4)



A una disolución de **3** (300 mg, 0.82 mmol) en DMF (5 mL) y mantenida en frío (0 °C) se
 20 añadió NaH (29 mg, 1.23 mmol) y se agitó a t.a. durante 1 h. A continuación, se
 adicionaron unas gotas de MeOH, se eliminó la DMF a presión reducida y el residuo se
 disolvió en AcOEt (15 mL) y se lavó con agua (10 mL) para eliminar las sales. La fase
 25 orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró, se concentró a sequedad y el residuo se purificó
 mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:30), aislándose **4** en forma de
 sólido incoloro. Rendimiento: 98%. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.29-7.23 (m 4H, 7.06 (d

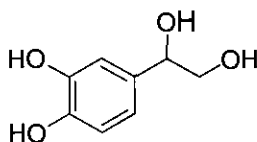
1H, $J = 1.8$ Hz), 6.96 (dd 1H, $J = 8.3$ Hz), 6.92 (d 1H), 6.57 (dd 1H, $J = 17.6$ Hz, $J = 10.9$ Hz), 5.56 (dd 1H, $J = 0.7$ Hz), 5.41 (s 4H), 5.13 (dd 1H).

1-[3',4'-(*o*-Xililenodioxi)fenil]etano-1,2-diol (5b)



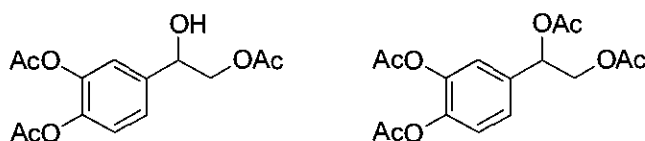
A una disolución de **4** (300 mg, 1.26 mmol) en agua-acetona (1:3, 12 mL) se añadió *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (186 mg, 1.38 mmol) y OsO₄ en *tert*-butanol (2.5%, 75 µL, 0.006 mmol) y se agitó a t.a. durante 3 h. A continuación, se evaporó la acetona, el producto se extrajo con AcOEt (3 x 30 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1 → 2:1), aislándose **5** en forma de sólido incoloro. Rendimiento: 73%. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 7.30-7.23 (m 4H), 7.00 (s.a. 1H), 6.91 (m 2H), 5.43 (s 2H), 5.41 (s 2H), 4.57 (dd 1H, $J = 4.3$ Hz, $J = 7.7$ Hz), 3.54 (dd 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.3$ Hz), 3.46 (dd 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 7.7$ Hz).

(3',4'-Dihidroxifenil)glicol (6) por desprotección de 5b.



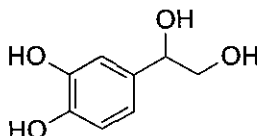
A una disolución de **5b** (300 mg, 1.10 mmol) en EtOH (5 mL) se añadió Pd-C 10% (100 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica, a t.a y en la oscuridad durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró sobre celita, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (CH₂Cl₂-MeOH 5:1), aislándose **6** como sirupo incoloro. Rendimiento: 88%. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 6.90 (d 1H, $J = 1.8$ Hz), 6.77 (d 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.70 (dd 1H), 4.60 (dd 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 8.0$ Hz), 3.60 (dd 1H, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.1$ Hz), 3.52 (dd 1H, $J = 11$ Hz, $J = 8.0$ Hz).

Diacetato de 4-(2-acetoxi-1-hidroxietil)-1,2-fenileno y diacetato de 4-(1,2-acetoxiacetil)-1,2-difenileno (9) y (10)



A una disolución de cloruro de 3,4-dihidroxifenacilo (1.03 g, 5.53 mmol) **7** en anhídrido acético (10 ml), se le añade NaOAc anhidro (879 mg, 10.7 mmol) y se calienta a reflujo durante 6 horas. Se añade agua y unas gotas de piridina y se agita durante 1 h. A continuación se concentra a sequedad y el sirupo se purifica en cromatografía en columna con AcOEt-hexano (1:3→1:2). Rendimiento del acetato de 3,4-diacetoxifenacilo (**8**): 90%. A una disolución de **8** (1.46 g, 4.96 mmol) en EtOH (30 ml), se añaden 470 µl de anhídrido acético y se hidrogena con Pd/C 10% (500 mg) a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 4 h. A continuación se filtra sobre celita y se concentra a sequedad. El sirupo resultante se purifica por cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:2 → 1:1), para obtener el triacetilado **9** (46%) y el tetraacetilado **8** (32%). Si se lleva a cabo la acetilación de la mezcla de **9** y **10** en Ac₂O en piridina 1:1 (2 ml) antes de su separación cromatográfica se obtiene **10** con un 80%. ¹H-RMN de **8** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.26 (m 2H, 7.19-7.16 (m 1H), 4.95 (dd 1H, *J*= 8.1 Hz, *J*= 3.3 Hz), 4.29 y 4.13 (2 dd 1H cada uno, *J*= 11.6 Hz, *J*= 3.3 Hz, *J*= 8.1 Hz), 2.29, 2.28 y 2.10 (3s 3H cada uno). ¹H-RMN de **9** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (dd 1H, *J*= 8.6 Hz, *J*= 2.0 Hz), 7.22 (d 1H, *J*= 2.0 Hz), 7.19 (d 1H, *J*= 8.6 Hz), 6.01 (dd 1H, *J*= 7.8 Hz, *J*= 3.9 Hz), 4.34 y 4.27 (2 dd 1H cada uno, *J*= 11.9 Hz, *J*= 3.9 Hz, *J*= 7.8 Hz).

(3,4-Dihidroxifenil)glicol 6 a partir de 10



Se agita una dispersión de **10** (204 mg, 0.60 mmol) en H_2SO_4 2N (10 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas. Se neutraliza el medio con NaHCO_3 y se concentra a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna en CH_2Cl_2 -MeOH (30:1 $\rightarrow$ 10:1) para dar **6**. Rendimiento: 55%.

5

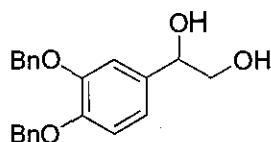
Método general para la síntesis de los diacilglicoles protegidos

A una disolución del glicol protegido (1 mmol) en piridina previamente enfriada a 0 °C se añade el agente acilante (3 mmol). Tras agitar 10-20 minutos en frío, se deja en agitación, y a temperatura ambiente, durante 12-72 horas hasta reacción completa. Se añaden unas gotas de agua y posteriormente se diluye la disolución con CH_2Cl_2 y se realizan los siguientes lavados: primero con HCl 1M hasta pH ácido, posteriormente con NaHCO_3 1M hasta pH básico y, por último, con agua hasta pH neutro. Se concentra a sequedad y el residuo se purifica por cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:5 $\rightarrow$ 1:1).

10

15

1-(3,4-Bis(benciloxi)fenil)etano-1,2-diol (5a)

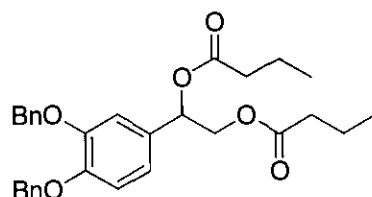


A una disolución de **6** (200 mg, 0.57 mmol) en acetona seca (20 ml) se añade K_2CO_3 (640 mg, 4.63 mmol) y BrBn (320 μL , 2.72 mmol). Se calienta a reflujo en oscuridad durante 12 horas. Se filtra y se concentra a sequedad. El sirupo resultante se purifica en cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:5 $\rightarrow$ 1:1) obteniendo el producto final como un sirupo muy denso amarillo pálido. Rendimiento: 81%. ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.50–7.29 (m 10H), 7.11 (d 1H, J = 1.9 Hz), 7.02 (d 1H, J = 8.3 Hz), 6.93 (dd 1H, J = 8.3 Hz, J = 1.9 Hz), 5.15 (s 2H), 5.13 (s 2H), 4.62 (t 1H, J = 6.0 Hz), 3.58 (d 2H, J = 6.0 Hz).

20

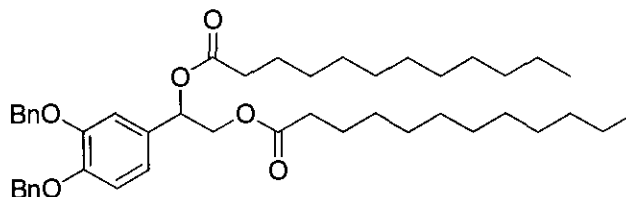
25

1,2-Dibenciloxi-4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno (11a)



A una disolución de **5a** (553 mg, 1.58 mmol) en piridina (3 ml) enfriada a 0 °C se añade cloruro de butanoilo (500 μ l, 4.81 mmol), se agita 10 minutos y se deja en congelador toda la noche. Se añade unas gotas de agua y se diluye la piridina con CH₂Cl₂ (90 ml). Se lava con HCl 1M (porciones de 30 ml) hasta pH ácido. Posteriormente la fase orgánica se lava con NaHCO₃ 1M (porciones de 30 ml) hasta pH básico y, por último, se lava la fase orgánica con agua hasta pH neutro. Finalmente la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra a sequedad obteniendo un sirupo que se purifica por cromatografía en columna en AcOEt- hexano (1:5 $\rightarrow$ 1:1). Rendimiento: cuantitativo. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.48–7.29 (m 10H), 7.06 (d 1H, *J*= 1.9 Hz), 7.04 (d 1H, *J*= 8.3 Hz), 6.94 (dd 1H, *J*= 8.3 Hz, *J*= 1.9 Hz), 5.95 (dd 1H, *J*= 7.0 Hz, *J*= 5.0 Hz), 5.16 y 5.15 (2 s 2H cada uno), 4.24 (m 2H), 2.36-2.31 (m 2H), 2.27 (t 2H, *J*=7.3 Hz), 1.65 y 1.62 (2 sex 2H cada uno, *J*=7.4Hz), 0.95 y 0.94 (2 t 3H cada uno, *J*=7.4 Hz).

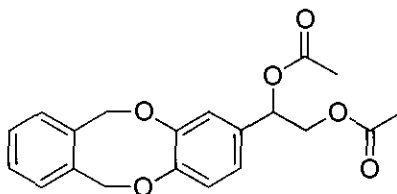
1,2-Dibenciloxi-4-(1,2-dilauroiloxietil)benzeno (11b)



A una disolución de **5a** (400 mg, 1.12 mmol) en piridina (2.5 ml) enfriada a 0 °C se añade cloruro de lauroilo (780 μ l, 3.37 mmol), se agita 10 minutos y se deja a temperatura ambiente tres días. Se añaden unas gotas de agua y se diluye con CH₂Cl₂ (150 ml). Se lava con HCl 1M (porciones de 40 ml) hasta pH ácido. Posteriormente la fase orgánica se lava con NaHCO₃ 1M (porciones de 40 ml) hasta pH básico y, por último, se lava la fase orgánica con agua hasta pH neutro. Finalmente la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra a sequedad obteniendo un sirupo que se purifica por cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:5 $\rightarrow$ 1:1). Rendimiento: 95%. ¹H-RMN (300 MHz,

(CD₃)₂CO): δ .93 (d 1H, J = 1.9 Hz), 6.86 (d 1H, J = 8.1 Hz), 6.79 (dd 1H, J = 1.9 Hz, J = 8.1 Hz), 5.94 (dd 1H, J = 7.5 Hz, J = 4.8 Hz), 4.33-4.24 (m 2H), 2.40-2.29 (m 4H), 1.67-1.58 (m 4H), 1.33 (sa 32H), 0.94-0.90 (m 6H).

5 **4-(1,2-Diacetoxietil)-1,2-(o-xililenodioxi)benceno (11c)**

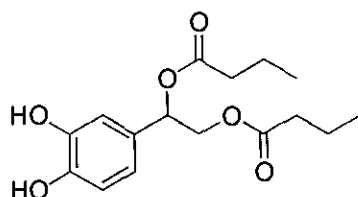


10 Se añade una mezcla de anhídrido acético y piridina 1:1 (4 ml) previamente enfriada a **5b** (300 mg, 1.10 mmol) en baño de hielo durante 20 minutos. A continuación se deja en nevera toda la noche. Seguidamente se hidroliza el anhídrido acético con hielo y se concentra a sequedad. El sirupo se purifica en cromatografía en columna en AcOEt-hexano (5 $\rightarrow$ 1:1). Rendimiento: cuantitativo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.25 (m 2H), 7.20-7.17 (m 2H), 7.00 (d 1H, J = 2.1 Hz), 6.98 (d 1H, J = 8.2 Hz), 6.91 (dd 1H, J = 8.2 Hz, J = 2.1 Hz), 5.91 (dd 1H, J = 7.8 Hz, J = 4.1 Hz), 5.41 y 5.37 (2 d 1H cada uno, J = 13.2 Hz), 4.27 y 4.21 (2 dd 1H cada uno, J = 16.0 Hz, J = 7.8 Hz, J = 4.1 Hz), 2.09 (s 3H), 2.03 (s 3H).

20 **Método general para la síntesis de los (3,4-dihidroxifenil)diacilglicoles a partir de sus correspondientes diacilglicoles protegidos**

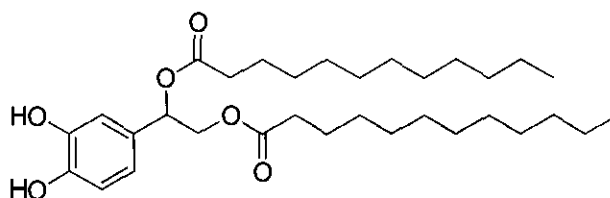
25 A una disolución del diacilglicol protegido (0.5 mmol) en EtOH o THF (según su solubilidad), se añade Pd/C al 10% (50% en peso aproximadamente) y se hidrogena durante 2-72 horas hasta reacción completa. Se filtra sobre celita y se concentra a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna.

4-(1,2-Dibutanoiloxi)benceno-1,2-diol (12a)



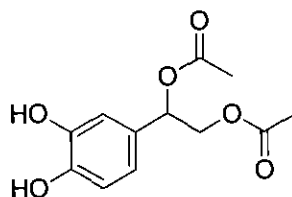
A una disolución de **11a** (240 mg, 0.49 mmol) en EtOH absoluto (4 ml) se añadió Pd/C al 10% (115 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica, a t.a. y en oscuridad durante 3 días. La mezcla se filtró sobre celita, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:1) aislándose como sirupo incoloro. Rendimiento: 90%. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 6.87-6.86 (m 1H), 6.82 (d 1H, J = 8.1 Hz), 6.76 (dd 1H, J = 8.1 Hz, J = 1.5 Hz), 5.89 (t 1H, J = 6.0 Hz), 4.27 (d 2H), 2.35 (t 2H, J = 7.5 Hz), 2.29 (t 2H, J = 7.4 Hz), 1.64 (sex 2H, J = 7.4Hz), 1.63 (sex 2H, J = 7.4Hz), 0.92 (t 6H, J = 7.3 Hz).

4-(1,2-Dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (12b)



A una disolución de **11b** (350 mg, 0.47 mmol) en THF (5 mL) se añadió Pd/C al 10% (160 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica, a t.a. y en oscuridad durante un día. La mezcla se filtró sobre celita, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en AcOEt-hexano (1:3) aislándose como sólido blanco. Rendimiento: 79%. ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 6.93 (d 1H, J = 1.9 Hz), 6.86 (d 1H, J = 8.1 Hz), 6.79 (dd 1H, J = 1.9 Hz, J = 8.1 Hz), 5.94 (dd 1H, J = 7.5 Hz, J = 4.8 Hz), 4.33-4.24 (m 2H), 2.340-2.29 (m 4H), 1.67-1.58 (m 4H), 1.33 (sa 32H), 0.94-0.90 (m 6H).

4-(1,2-Diacetoxietil)benceno-1,2-diol (12c)



A una disolución de **11c** (180 mg, 0.51 mmol) en EtOH (4 mL) se añadió Pd/C al 10% (80 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica, a t.a. y en oscuridad durante 2 h. La mezcla se filtró sobre celita, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna CH₂Cl₂-MeOH (50:1 → 10:1) aislándose como un sirupo amarillo pálido. Rendimiento: 93%. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.86 (d 1H, J= 1.5 Hz), 6.82 (d 1H, J= 8.1 Hz), 6.78 (dd 1H, J= 8.1 Hz, J= 1.5 Hz), 5.88 (dd 1H, J= 6.9 Hz, J= 5.2 Hz), 4.31-4.22 (m 2H), 2.10 (s 3H), 2.07 (s 3H).

B. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Actividad anti-inflamatoria de 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**), 4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (**12a**), 4-(1,2-dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (**12b**), acetato de hidroxitirosilo (**13**) y los tioderivados: etanotioato de S-2-(3,4-dihidroxifenil)etilo (**14**), 4-(2-sulfaniletil)benceno-1,2-diol (**15**), disulfuro de bis(3,4-dihidroxifenetilo)(**16**) en el modelo in vitro de macrófagos peritoneales de ratón estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS). Comparación con HT(1).

B1 Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratón

La estimulación de macrófagos peritoneales es uno de los modelos mejor caracterizados para la producción de mediadores pro-inflamatorios. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un componente presente en la membrana externa de bacterias Gram negativas, que induce una respuesta inflamatoria severa mediante la iniciación de señales celulares que incluyen la síntesis de múltiples mediadores implicados en el proceso inflamatorio como el óxido nítrico (NO), PGE₂ (prostaglandina E₂) y citocinas como el TNF-α entre otros.

Para la obtención de macrófagos peritoneales de ratón se inyectó 1 mL de tioglicolato sódico 10% (p/v) en la cavidad peritoneal de los ratones permitiendo el libre acceso a comida y agua durante 4 días. Tras el sacrificio se inyectó PBS 1x estéril en la cavidad peritoneal, tras lo cual se procedió a la recolección de la suspensión celular. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 1200 r.p.m y 4° C y tras el centrifugado se descartaron las muestras contaminadas con sangre. Todas las manipulaciones de las células fueron realizadas en cabinas de flujo laminar vertical y en condiciones estériles.

A continuación, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendió cada pellet celular en medio RPMI-1640 al 10%(v/v) de suero fetal bovino (SFB) tras lo cual se procedió al recuento de los macrófagos obtenidos mediante el test de exclusión de Azul Tripán.

B2 Evaluaciones realizadas

✓ Viabilidad celular. Test de la Sulforodamina (SRB)

Para la realización de este ensayo las células en suspensión extraídas de la cavidad peritoneal de los ratones fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Danmark) y tratadas con los distintos polifenoles estudiados. Los resultados fueron comparados con los obtenidos de células tratadas con DMSO (vehículo), y con un grupo control constituido por células sin tratar. La supervivencia celular fue medida como el porcentaje de absorbancia comparado con un grupo control (células no tratadas) según la metodología descrita por Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. 82, 1990, 1107-1112.

✓ Producción de óxido nítrico (NO).

La células son incubadas con los compuestos a ensayar en placas de 24 pocillos durante media hora (37° C, 95% aire, 5% CO₂), tras la cual se adiciona LPS (5µg/ mL) en cada pocillo y se incuba 18 horas (37° C, 95% aire, 5% CO₂). Finalmente se recogen los sobrenadantes obtenidos y en placas de 96 pocillos estériles se añade cada una de nuestras muestras de sobrenadante a analizar por triplicado y 100 µl de blanco [medio usado en el cultivo celular: RPMI-1640 al 5 % de SFB (v/v)]. Para terminar se adiciona 100

µl del reactivo de Griess a todos los pocillos procediéndose acto seguido a la medida en lector de placas *Bio-Rad 550* a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de nitritos se obtiene por extrapolación desde una recta patrón con nitrito de sodio. En todos los experimentos los resultados se compararon con un grupo celular sin estimular, usado como control negativo, y con un grupo de células estimuladas únicamente con LPS y otro grupo estimulado con LPS al que se le adiciona el vehículo (DMSO), como controles positivos.

✓ **Expresión de las enzimas pro-inflamatorias ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estudio de las vía de señalización celular del factor nuclear de transcripción (NF-κB) mediante western blotting**

Los células fueron sembradas a una concentración de 1×10^6 células/ml, incubadas en presencia o ausencia de los diferentes compuestos a ensayar y estimuladas con LPS a una concentración de 5 µg/ ml. En todos los experimentos los resultados se compararon con un grupo celular sin estimular, usado como control negativo y con un grupo de células estimuladas únicamente con LPS y otro grupo estimulado con LPS al que se le adiciona el vehículo (DMSO), como controles positivos. Tras 18 horas de incubación (37° C, 95% aire, 5% CO₂) las células fueron recogidas con un rascador en PBS 1x estéril conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas y fueron procesadas como se ha descrito (Sánchez-Hidalgo et al., *Biochem. Pharmacol.* 69, 2005, 1733-1744).

La medida del contenido de proteínas (µg/mL) fue realizada mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford MM., *Anal. Biochem.* 7, 1976, 248-254), basado en la cuantificación colorimétrica de la concentración de proteínas total en cada una de las muestras usando como estándar γ-globulina (Bio-Rad®).

Las muestras, desnaturalizadas por calor (100 °C, 10 minutos) y conteniendo igual cantidad de proteínas (20 µg), fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacríamida-SDS al 10%. En el siguiente paso, las proteínas se transfirieron electroforéticamente desde el gel a una membrana de nitrocelulosa y finalmente fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos: anti-rabbit COX-2, anti-rabbit iNOS (Cayman®, Ann Arbor, MI, USA) (1:2500 y 1:1000 respectivamente), anti-rabbit IκBα (Cell

Signalling®, Danvers, MA, USA) (1:1000) y anti-mouse β -actina (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, USA) e incubadas durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras los lavados del anticuerpo primario, las membranas se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios: anti-rabbit HRP conjugated (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA) (1:50000) o anti-mouse (Dako®, Atlanta, GA, USA) (1:2000) en solución de bloqueo durante 1-2 h a temperatura ambiente. Tras los lavados del anticuerpo secundario, la detección de los inmunocomplejos marcados con peróxidos se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para valorar esta señal de quimioluminiscencia, se introdujeron las membranas en el transiluminador (LAS-3000 Imaging System de Fujifilm Image Reader (Stamford, USA)), dispositivo que nos permitió obtener una imagen de la señal emitida.

Los datos de densitometría fueron estudiados siguiendo una normalización con el control de β -actina, y las señales obtenidas fueron analizadas y cuantificadas mediante el programa informático Java (Image J, Softonic®) y expresadas en relación al grupo control DMSO-LPS.

B3 Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados han sido expresados como la media aritmética $\pm$ el error estándar, y la significación de las diferencias entre los distintos grupos ha sido evaluada utilizando el análisis de la varianza (test de ANOVA) seguido del test de Tukey para datos paramétricos. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis estadístico ha sido realizado utilizando el programa informático Graph Pad Prism® 2.01.

B4 Resultados

Los resultados reflejan la media de dos ensayos independientes por triplicado.

Evaluación de la viabilidad celular. Tras el ensayo de viabilidad celular de diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar acetato de hidroxitirosilo (**13**), 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**) y sus derivados 4-(1,2-dibutanoiloxi)benceno-1,2-diol (**12a**) y 4-(1,2-

dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (**12b**) y el tioacetilado (**14**), tiohidroxitirosol (**15**) y disulfuro de hidroxitirosol (**16**), fueron seleccionadas las concentraciones de los compuestos que presentaron una viabilidad superior al 95%.

Producción de óxido nítrico (Fig. 1). Acetato de hidroxitirosilo (**13**), 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**) y sus derivados 4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (**12a**) así como los tres tioderivados (**14**, **15** y **16**) presentaron una disminución estadísticamente significativa de la producción de nitritos a los mismos niveles que el patrón de referencia HT. Es más, la concentración más elevada del compuesto **13** disminuyó significativamente los niveles de los nitritos respecto al HT. El compuesto **12b** fue capaz de disminuir solo levemente la producción del metabolito en las concentraciones ensayadas.

Expresión de la enzima proinflamatoria iNOS (Fig. 2). El tratamiento de las células con LPS indujo una importante sobreexpresión de la proteína iNOS. Sin embargo, la incubación con los compuestos acetato de hidroxitirosilo (**13**) y 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**), y los tres tioderivados (**14**, **15** y **16**) logró reducir de forma estadísticamente significativa su expresión a niveles paralelos a HT. Únicamente la concentración más elevada de 4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (**12a**) fue capaz de disminuir significativamente la sobreexpresión de iNOS.

Expresión de la enzima proinflamatoria COX-2 (Fig. 3). La expresión de la proteína COX-2 fue marcadamente aumentada tras el tratamiento de las células con LPS. Por el contrario, las células previamente tratadas con acetato de hidroxitirosilo (**13**), 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**) y el compuesto de referencia HT disminuyeron la sobreexpresión de la proteína COX-2 tras la administración de LPS. Tras la incubación con los derivados diacilglicoles, 4-(1,2-dibutanoiloxi)benceno-1,2-diol (**12a**) y 4-(1,2-dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (**12b**) no se observaron resultados estadísticamente significativos. Con respecto a los tioderivados la concentración más elevada de los tioderivados (**15**) y (**16**) muestran una disminución significativa de la sobreexpresión de la enzima.

Expresión del factor de transcripción NF- κ B (Fig. 4). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la proteína I κ B se encuentra aumentada en las células tratadas con los compuestos acetato de hidroxitirosilo (**13**) y 3,4-dihidroxifenilglicol (**6**). Es más,

estos resultados son también significativos respecto al patrón de referencia (HT). Los compuestos 4-(1,2-dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (12a) y 4-(1,2-dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (12b) y los tioderivados 14-16 no presentaron cambios en la expresión de la IkappaB.

5

C. EFECTOS DE ACETATO DE HIDROXITIROSILO EN UN MODELO DE COLITIS AGUDA INDUCIDA POR DEXTRANO SULFATO SÓDICO (DSS)

C1 Modelo animal y de enfermedad

10

Todos los protocolos llevados a cabo han seguido las recomendaciones de la Unión Europea relativas a la experimentación animal (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE). Como animales de experimentación se utilizaron ratones hembra C57BL/6J de 7-12 semanas de edad y 18-22 g de peso, mantenidas en condiciones estándar de estabulización a 24-25°C, doce horas de luz al día y alimentación controlada y suministrados por Harlan Ibérica, S.A. Barcelona (España).

15

El modelo de enfermedad utilizado está basado en la administración de dextrano sulfato sódico (DSS) a ratones, modelo seleccionado por presentar características morfológicas, clínicas y analíticas similares a la de los pacientes que manifiestan una enfermedad inflamatoria intestinal del tipo de la colitis ulcerosa o de la enfermedad de Crohn. (Melgar et al. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 288, 2005, G1328-1338.

20

Cada grupo de animales (n = 14) fue alimentado con una dieta estándar, que fue suplementada con 0.1% del compuesto acetato de hidroxitirosilo (13) en el grupo de estudio correspondiente. Esta dosis supone la ingesta por ratón (con peso medio de 25gramos, y suponiendo una ingesta diaria de 3 g de dieta) de 120 mg de producto (13)/día x kg (peso de animal).

25

El protocolo de experimentación *in vivo* consistió en la administración de una dieta preventiva durante 35 días,. Como bebida todos los animales consumieron agua durante los primeros 25 días, seguido de 5 días de consumo de agua adicionada de DSS (3% p/v; MW: 40.000) y de otros 5 días de agua solamente. Los grupos de experimentación fueron

30

los siguientes: grupo control (dieta estándar + agua durante los 35 días), grupo control-DSS (dieta estándar + DSS en agua de bebida durante 5 días) y grupo A (dieta estándar suplementada con producto A + DSS en agua de bebida durante 5 días).

5 Los efectos de la colitis inducida, de acuerdo a los descritos anteriormente en este modelo, fueron los siguientes:

- Pérdida de apetito y peso.
- Diarrea y sangre en heces, con la aparición de anemia.
- 10 • Acortamiento del colon y engrosamiento de sus paredes.
- Alteración de la barrera mucosa incrementando la exposición de los macrófagos a la microbiota
- Infiltrado leucocitario, pérdida de epitelio y destrucción de criptas.
- Liberación de citocinas proinflamatorias.
- 15 • Aumento del estatus inflamatorio a nivel intestinal y sistémico.

C2 Evaluaciones realizadas

- ✓ **Control de peso, ingesta de alimento y bebida:** a lo largo de todo el experimento, y de manera individualizada, se monitorizó el peso de cada ratón, la cantidad de dieta ingerida y la de agua bebida.
- 20 ✓ **Sangre y agua en heces:** una semana antes, en días alternos, y diariamente a partir de la incorporación de DSS en el agua, hasta la finalización del ensayo, se evaluó la consistencia de las heces (agua en heces) y la presencia de sangre en las mismas mediante la utilización de una escala visual propuesta por Gommeaux (Gommeaux et al., Mol. Cell. Biol. 27, 2007, 2215-2228).
- 25 ✓ **Longitud del colon:** una vez sacrificados los animalitos, se procedió a la extracción de este órgano, a su limpieza y extensión para obtener dicho parámetro por medida directa.
- 30 ✓ **La evaluación macroscópica** del daño colónico se realizó atendiendo al índice de actividad de la enfermedad (DAI). Se evaluó diariamente, a partir de la incorporación de DSS en el agua de bebida (D0 correspondiente al día 26 del ensayo global), la inflamación intestinal mediante el DAI, que correlaciona la

pérdida de peso, la consistencia de las heces y la presencia de sangre en las mismas, siendo el índice de actividad el promedio de los tres parámetros, según la escala propuesta por Gommeaux (Gommeaux et al., Mol. Cell. Biol. 27, 2007, 2215-2228).

5

- La pérdida de peso se calculó como el % de la diferencia entre el peso original a día = 0 (antes de comenzar a administrar el DSS) y el peso de cada día de suministro de DSS y los días de recuperación, siguiendo la siguiente escala de puntuación:

10

- 0: < 1 % de pérdida de peso
- 1: 1-4.99 % de pérdida de peso
- 2: 5-10 % de pérdida de peso
- 2.5: 10.01-20 % de pérdida de peso
- 3: > 20 % de pérdida de peso

15

- La consistencia de heces se evaluó según la siguiente escala:
 - 0: consistencia normal de las heces
 - 1: heces blandas no adheridas al ano
 - 2: heces muy blandas y adheridas al ano
 - 3: heces líquidas y ano humedecido

20

- La presencia de sangre en heces se determinó visualmente, según la siguiente escala:

25

- 0: ninguna mancha de sangre en heces
- 1: pequeña mancha de sangre en heces y región anal seca
- 2: gran mancha de sangre en heces, con sangrado localizado en el orificio anal
- 3: heces de color rojo oscuro y sangrado abundante alrededor del ano

30

- ✓ **Actividad mieloperoxidasa en mucosa colónica:** fue evaluada para conocer el grado de infiltración neutrofílica, mediante espectrofotometría (a 655 nm) y según el método descrito por Grisham (Grisham et al., Meth. Enzymol. 186, 1990, 729-742). Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (U/mg tejido).

✓ **Expresión colónica de las proteínas COX-2, iNOS, IkappaB, JNK y p-p38, mediante la técnica de western blot**

Las muestras, desnaturalizadas por calor (100 °C, 10 minutos) y conteniendo igual cantidad de proteínas (50 µg), fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacríamida-SDS al 10% según su peso molecular. En el siguiente paso, las proteínas se transfirieron electroforéticamente desde el gel a una membrana de nitrocelulosa y finalmente fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos: anti-rabbit COX-2, anti-rabbit iNOS (Cayman®, Ann Arbor, MI, USA) (1:2500 y 1:1000 respectivamente), anti-rabbit IkBα (Cell Signalling®, Danvers, MA, USA) (1:1000) y anti-mouse β-actina (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, USA) e incubadas durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras los lavados del anticuerpo primero, las membranas se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios: anti-rabbit HRP conjugated (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA) (1:50000) o anti-mouse (Dako®, Atlanta, GA, USA) (1:2000) en solución de bloqueo durante 1-2 h a temperatura ambiente. Tras los lavados del anticuerpo secundario, la detección de los inmunocomplejos marcados con peróxidos se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para valorar esta señal de quimioluminiscencia se introdujeron las membranas en el transiluminador (LAS-3000 Imaging System de Fujifilm Image Reader (Stamford, USA)), dispositivo que nos permitió obtener una imagen de la señal emitida.

Los datos de densitometría fueron estudiados siguiendo una normalización con el control β-actina y las señales obtenidas fueron analizadas y cuantificadas mediante el programa informático Java (Image J, Softonic®) y expresadas en relación al grupo control DMSO-LPS.

✓ **Análisis microscópico del daño colónico (arquitectura colónica):** tras haber seleccionado 3 animales por lote, se procedió a la extracción del colon y, con escalpelo, se obtuvieron secciones de de tejido constituidas por anillos de colon ascendente, transversal y descendente, que fueron lavadas con solución salina fisiológica y, rápidamente, se sumergieron en solución fijadora (paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS), pH 7.2) durante 12-18 h a 4 °C. Posteriormente se sometieron a un

proceso de deshidratación en frío con agitación mediante una batería de alcoholes de concentración creciente, iniciándose con alcohol de 50° hasta alcohol absoluto.. Tras la deshidratación las muestras fueron introducidas en xileno y finalmente en parafina.pura. Tras la formación de los bloques, para ser , se seccionaron en cortes de 5-7 μm de grosor con una cuchilla de vidrio siguiendo el plano perpendicular a la superficie de la mucosa. y los cortes fueron teñidos con hematoxilina/eosina y visualizados en un microscopio óptico.

C3 Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados han sido expresados como la media aritmética $\pm$ el error estándar, y la significación de las diferencias entre los distintos grupos ha sido evaluada utilizando el análisis de la varianza (test de ANOVA) seguido del test de Tukey para datos paramétricos y la U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis estadístico ha sido realizado utilizando el programa informático Graph Pad Prism® 2.01.

C4 Resultados observados

Evolución del peso: durante los días de exposición al agente inductor del daño (DSS, al 3% v/v) en el agua de bebida, los animales experimentaron un descenso de peso que fue claramente patente al final del período de evaluación (**Fig. 5**). Esta pérdida de peso fue estadísticamente significativa en los animales pertenecientes al grupo control-DSS ($p < 0.001$), mientras que los animales que recibieron una alimentación suplementada con el compuesto acetato de hidroxitirosilo (**13**) experimentaron una pérdida de peso similar a la del grupo control (**Fig. 6**).

Preservación de la longitud del colon: los ratones del lote control-DSS experimentaron un acortamiento del colon que fue significativo ($p < 0.05$) con respecto a los animales sanos correspondientes al grupo control. Los ratones que recibieron la dieta suplementada con acetato de hidroxitirosilo (**13**) preservaron la longitud colónica en los valores del control sano (**Fig. 7**). La relación peso/longitud del colon como marcador inflamatorio macroscópico, expresada en gramos por centímetro (g/cm), indicó un marcado descenso

($p < 0.05$) en dicha relación para los animales del grupo control-DSS, mientras que los animales alimentados con la dieta suplementada con acetato de hidroxitirosilo (13) mantuvieron la relación del orden de la del control (Fig. 8).

Evaluación del DAI (índice de actividad de la enfermedad). Según la escala propuesta por Gommeaux (Gommeaux et al., *Mol. Cell. Biol.* 27, 2007, 2215-2228), los resultados mostraron un incremento del DAI en los ratones control-DSS que fue significativo ($p < 0.001$) frente al que obtenido en grupo control sano (Fig. 9). Sin embargo los animales ratones que recibieron la dieta suplementada con acetato de hidroxitirosilo (13) el DAI se mantuvo en los valores del control sano.

Disminución de la actividad MPO en mucosa colónica (Fig. 10). La MPO como índice de infiltración neutrofílica, experimentó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) comparada con los resultados obtenidos de los intestinos procedentes de animales sanos. Por el contrario, se observó una reducción de dicho parámetro estadísticamente significativa en las muestras procedentes de animales que consumieron dieta suplementada con el acetato de hidroxitirosilo (13).

Atenuación del daño en la mucosa colónica (Fig. 11 A-C). En el control-DSS se apreció una destrucción masiva de las criptas colónicas y del epitelio, así como una sustancial infiltración del tejido linfóide (Fig. 11B). Sin embargo, en las mucosas colónicas procedentes de animales alimentados con una dieta enriquecida con acetato de hidroxitirosilo (13) se apreció histológicamente una atenuación de los parámetros morfológicos de daño celular, la mucosa colónica mostraba úlceras en proceso de curación, evolucionando a un tipo de infiltrado inflamatorio crónico (Fig. 11C).

Expresión colónica de las proteínas COX-2, iNOS, IkappaB, JNK y p-p38 (Fig. 12-14).

Como puede observarse en la Fig. 12 los niveles de expresión de las proteínas COX-2 e iNOS fueron muy elevados en las mucosas colónicas procedentes de ratones sometidos a colitis. Sin embargo, aquellos animales tratados con acetato de hidroxitirosilo (13) presentaron unos niveles de expresión significativamente más bajos ($p < 0.05$) respecto al grupo control-DSS. Entre los mecanismos de señalización celular implicados en esta

respuesta inmunoinflamatoria figuran la actividad de factores de transcripción como el NF- κ B regulados por la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK cinasas). Las proteínas MAPK cinasas en su estado inactivo (no fosforilado) residen en el citoplasma, pero cuando se activan son fosforiladas y a su vez fosforilan en serinas y treoninas a los factores de transcripción. Estos últimos promueven la transcripción de genes responsables de la activación de las células inflamatorias e inmunocompetentes y la expresión de proteínas mediadoras clave con el consiguiente efecto biológico. En este estudio evaluamos los niveles de expresión proteica de las MAPK p38 y JNK cinasas. Los niveles de expresión de la proteína JNK fosforilada (p-JNK) fueron elevados en las muestras colónicas procedentes de animales sometidos a colitis en relación a las controles sanos ($p < 0.01$) (Fig. 13). Sin embargo, en aquellos animales que recibieron terapia nutricional con acetato de hidroxitirosilo (13) se detectó una disminución estadísticamente significativa de la activación de esta cinasa ($p < 0.05$). Por otra parte, no se observaron modificaciones significativas en la proteína MAPK p38 en mucosa de los animales sometidos al tratamiento (Fig. 13).

El NF- κ B es un factor transcripcional regulador de la expresión de numerosos genes que codifican moléculas involucradas en el proceso inflamatorio, entre los que podemos incluir COX-2, iNOS y ciertas citocinas proinflamatorias. Este factor se encuentra en el citoplasma como un dímero formado por dos subunidades idénticas (homodímero) o diferentes (heterodímeros) y unido a sus inhibidores I κ B (I κ B- α , I κ B- β y I κ B- ϵ) previniendo su entrada al núcleo. En el caso de I κ B- α , la estimulación de receptores como el receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), receptores TLR o el receptor de linfocito T (TCR) activa al NF κ B a través de la ruta conocida como "canónica", el cual a través de la activación de IKK fosforila I κ B, siendo posteriormente ubiquitinada y degradada por el proteasoma, liberando NF κ B. La degradación de I κ B permite por tanto la entrada de las proteínas NF κ B al núcleo y su unión a secuencias específicas del ADN, regulando la transcripción de un gran número de genes que codifican citocinas proinflamatorias. En nuestro estudio valoramos posibles cambios de expresión de la proteína I κ B- α tras el tratamiento con el compuesto (13) (Lee y Surh, Biochem. Pharmacol. 84, 2012, 1340-1350). En base a los resultados obtenidos, los niveles de expresión de la proteína I κ B- α de las muestras colónicas de animales del grupo DSS fueron estadísticamente inferiores ($p < 0.01$) a los cuantificados en las muestras colónicas procedentes de animales sanos. En

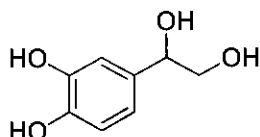
aquellos animales que recibieron una dieta enriquecida con acetato de hidroxitirosilo (13) los niveles de expresión de dicha proteína fueron similares a los obtenidos en los animales del grupo control DSS (Fig. 14).

- 5 No se considera necesario hacer más extensa esta descripción para que cualquier experto en la materia comprenda el alcance de la invención y las ventajas que de la misma se derivan. Los elementos que la componen, soluciones técnicas adoptadas o incluso su aplicación serán susceptibles de variación siempre y cuando ello no suponga una
- 10 alteración en la esencialidad del invento.

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto **6** para la elaboración de formulación farmacéutica o composición alimentaria para la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios.

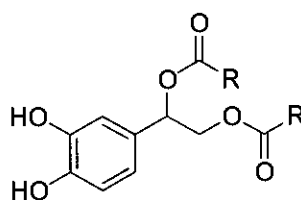
5



6

2. Uso del compuesto de fórmula general **12** para la elaboración de formulación farmacéutica o composición alimentaria para la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios.

10



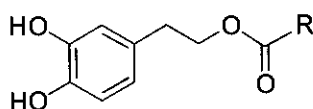
12

Donde R es un grupo alquilo (C_1 - C_{23}), un grupo alquenilo C_2 - C_{23} , un grupo alcadienilo C_4 - C_{23} , un grupo alcatrienilo o alcapolienilo de hasta 23 carbonos.

15

3. Uso del compuesto de fórmula general **13** para la elaboración de formulación farmacéutica o composición alimentaria para la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios.

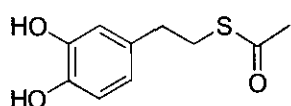
20



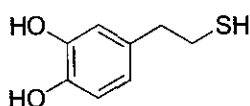
13

Donde R es un grupo alquilo (C_1-C_{23}), un grupo alquenilo C_2-C_{23} , un grupo alcadienilo C_4-C_{23} , un grupo alcatrienilo o alcapolienilo de hasta 23 carbonos.

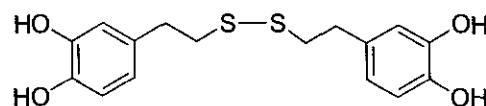
- 5 4. Uso de los tioderivados del HT 14-16 para la elaboración de formulación farmacéutica o composición alimentaria para la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios.



14



15



16

10

15

20

25

30

5. Uso de los compuestos reivindicados en 1 a 4 donde los procesos inflamatorios conducen o están originados por enfermedades inflamatorias, sistémicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas o cáncer.
6. Uso del compuesto según la reivindicación 5 donde la enfermedad inflamatoria sistémica es la artritis.
7. Uso de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde los procesos inflamatorios están relacionados con procesos infecciosos provocados por microorganismos.
8. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 1 a 4 donde los procesos inflamatorios son enfermedades inflamatorias del tracto digestivo.
9. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 1 a 4 donde las enfermedades inflamatorias son del intestino.
10. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 1 a 4 donde las enfermedades inflamatorias del tracto digestivo se seleccionan de la lista que comprende el

síndrome del colon irritable, colitis indeterminada, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

11. Compuesto de fórmula general **12**.

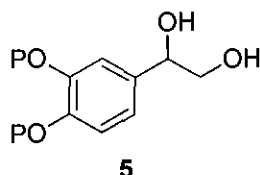
Donde R es un grupo alquilo (C_1-C_{23}), un grupo alquenilo C_2-C_{23} , un grupo alcadienilo C_4-C_{23} , un grupo alcatrienilo o alcapolienilo de hasta 23 carbonos.

12. Compuesto **4-(1,2-Dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (12a)**.

13. Compuesto **4-(1,2-Dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (12b)**.

14. Compuesto **4-(1,2-Diacetoxietil)benceno-1,2-diol (12c)**

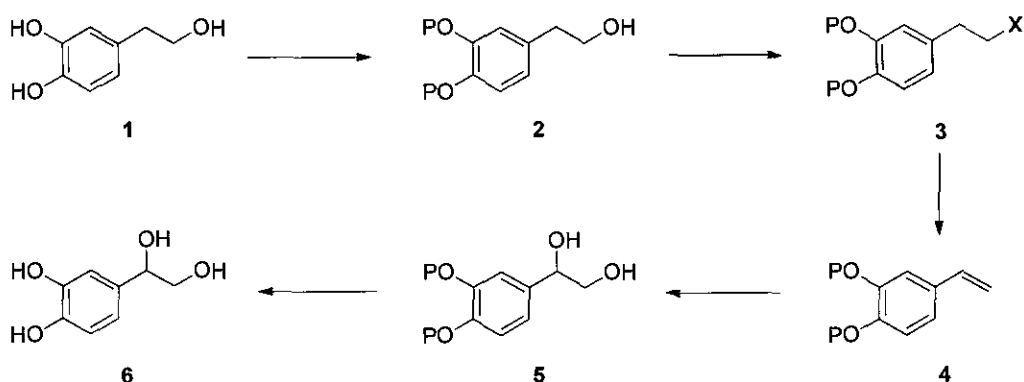
15. Compuesto de fórmula general **5** donde los grupos P pueden ser grupos bencilo, o-xilileno.



16. Procedimientos de síntesis química de **6** según una de las dos opciones que se indican a continuación;

Opción 1 Procedimiento de síntesis del 3,4-dihidroxifenilglicol a partir del HT

A partir de HT **1** a la vista del Esquema 1, mediante la protección de los hidroxilos fenólicos con grupos tales como grupos bencilos o un grupo o-xilileno para dar **2**. La halogenación de la cadena lateral de **2** por sustitución del hidroxilo alifático por halógeno y posterior deshidrohalogenación de **3** conduce al vinilcatecol O-protegido **4** que es dihidroxilado para dar **5**, usando por ejemplo con tetróxido de osmio. Por último la desprotección del fragmento de catecol conduce a **6**.



Esquema 1.

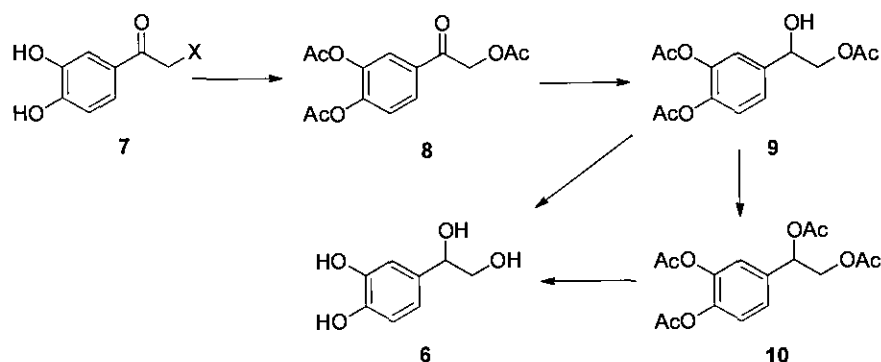
5

Opción 2 Procedimiento de síntesis del 3,4-dihidroxiacetofenilglicol a partir de cloruro de 3,4-dihidroxiacetofenilo

10

El segundo procedimiento de preparación de 3,4-dihidroxiacetofenilglicol **6** a la vista del Esquema 2 parte de haluro de 3,4-dihidroxiacetofenilo **7** que se transforma en la triacetoxiacetofenona **8** siguiendo una modificación del procedimiento de H. Voswinckel, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 42, 1910, 4651-4654. La hidrogenación de **8** se puede llevar a cabo con distintos catalizadores tales como Pd/C, Pd(OH)₂/C, Nickel Raney, en disolventes como etanol, metanol, THF, conteniendo o no anhídrido acético. Se forma en dichas condiciones mezclas de **9** y **10** que se convierten en **10** por acetilación convencional, con rendimiento de **10** del 80% calculado a partir de **8**. También obtenemos **9** por reducción de **8** con hidruros de boro como el triacetoxiborohidruro, en presencia o en ausencia de tricloruro de cerio. La hidrólisis de **9**, de **10** o de mezclas de **9** y **10** para dar **6** se lleva a cabo en medio acuoso y catálisis ácida o básica.

20



Esquema 2.

- 5 17. Uso del compuesto según cualquiera de la reivindicación 1 a 4 para la elaboración de un medicamento.
18. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la elaboración de una composición alimenticia.
- 10 19. Uso del compuesto según la reivindicación anterior donde la composición alimenticia se puede seleccionar de entre un alimento, complemento alimenticio, alimento funcional o nutracéutico.
- 15 20. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como antioxidantes.
21. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como antioxidantes alimentarios.
- 20 22. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula 6, 12, 13, 14, 15 y 16 con un vehículo farmacéuticamente aceptable, con actividad antiinflamatoria.
- 25 23. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que además comprende otro principio activo.

24. Composición alimenticia que comprende al menos un compuesto de fórmula general **12**.
- 5 25. Uso como nutracéutico de una composición nutricional que contenga al menos un compuesto de fórmula general **12**.
26. Uso como componente en alimentos funcionales de compuestos de fórmula general **12**.
- 10 27. Uso de compuestos de fórmula **6**, **12**, **13**, **14**, **15** y **16** para la modulación de la microbiótica intestinal, incrementando la población intestinal de bifido bacterias lactobacilos y disminuyendo la población de patógenos.
- 15 28. Composición cosmética con propiedades antiinflamatorias que comprende al menos un compuesto de las reivindicaciones 1 a 4.

Figura 1

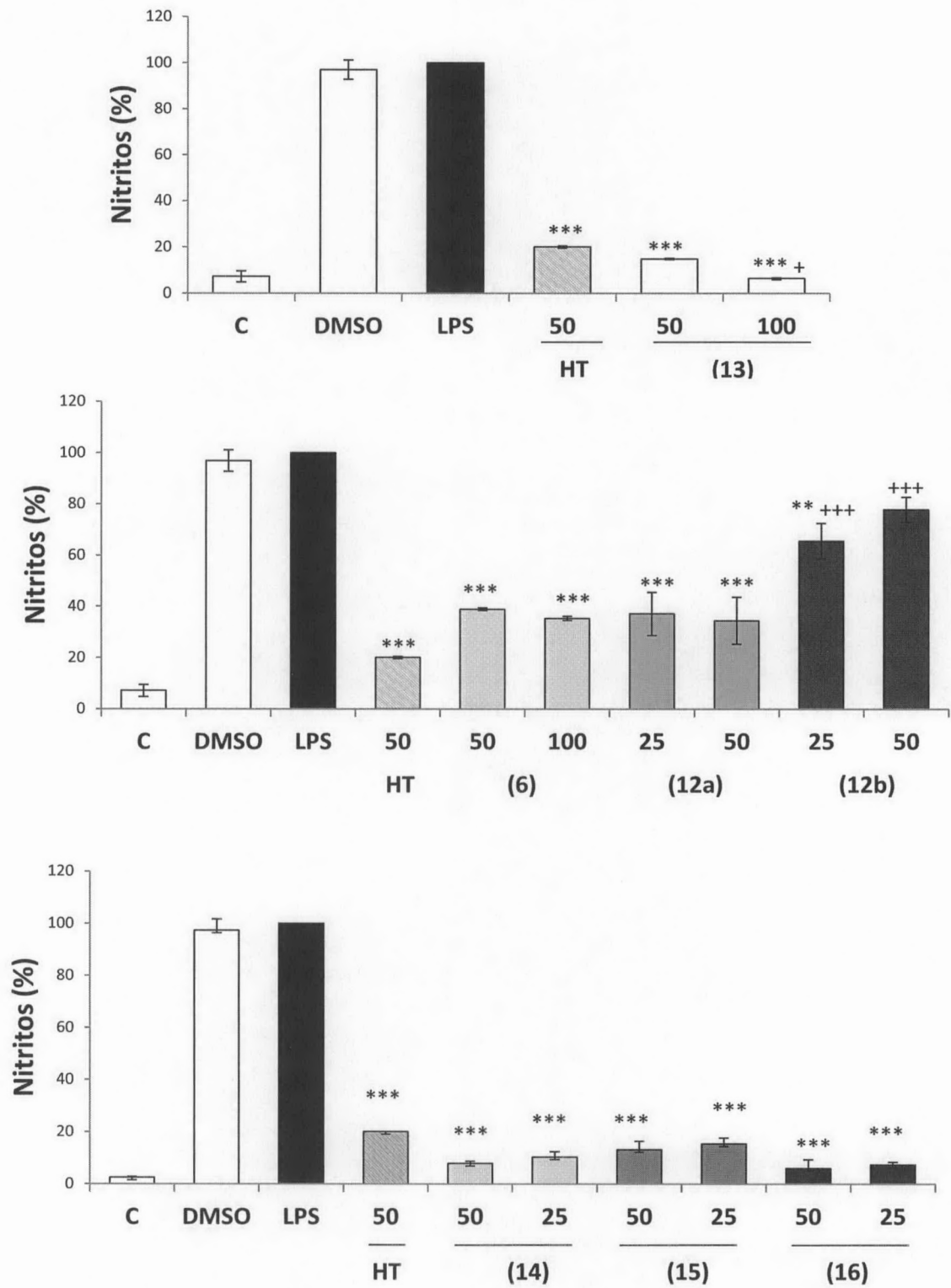


Figura 2

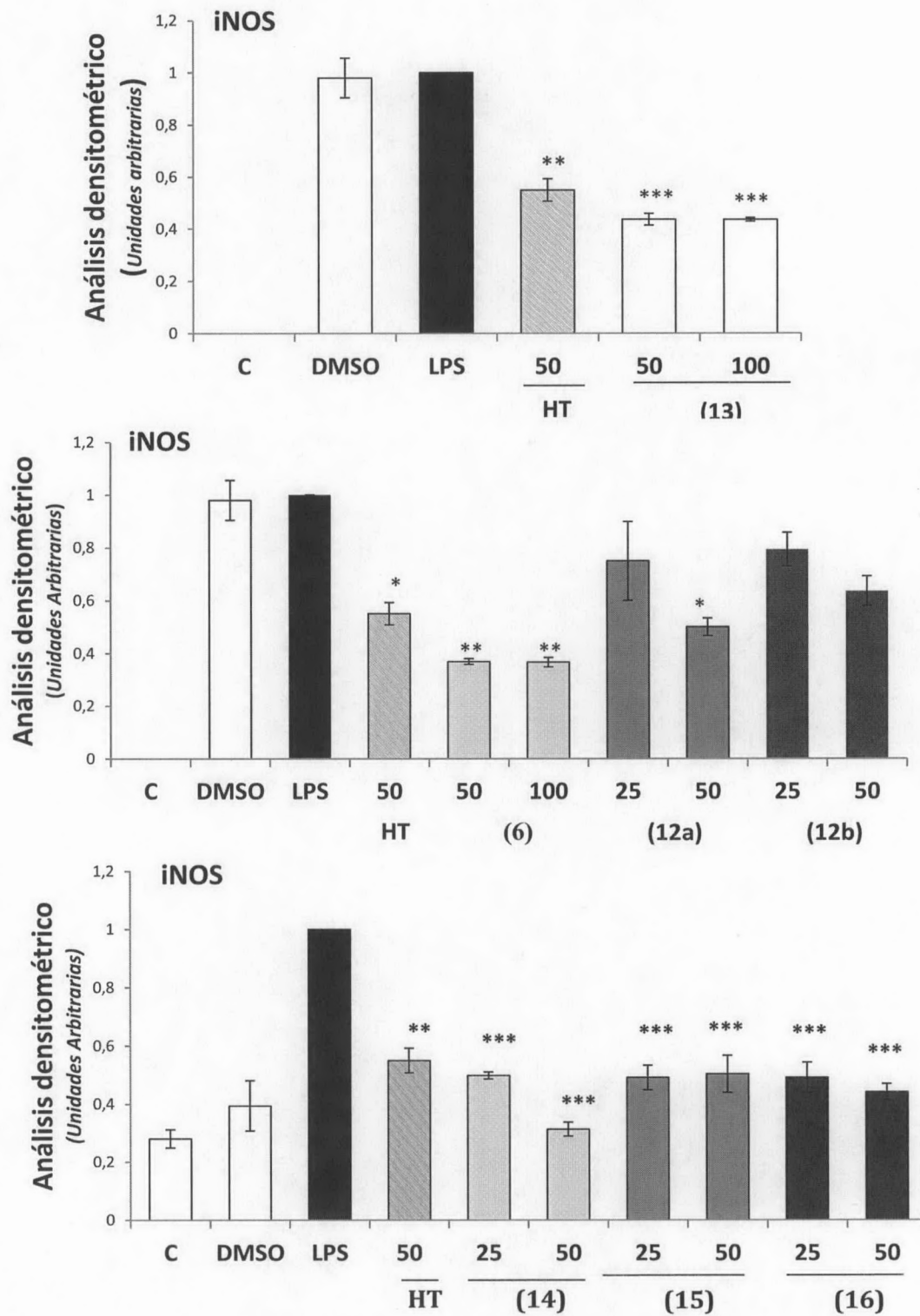


Figura 3

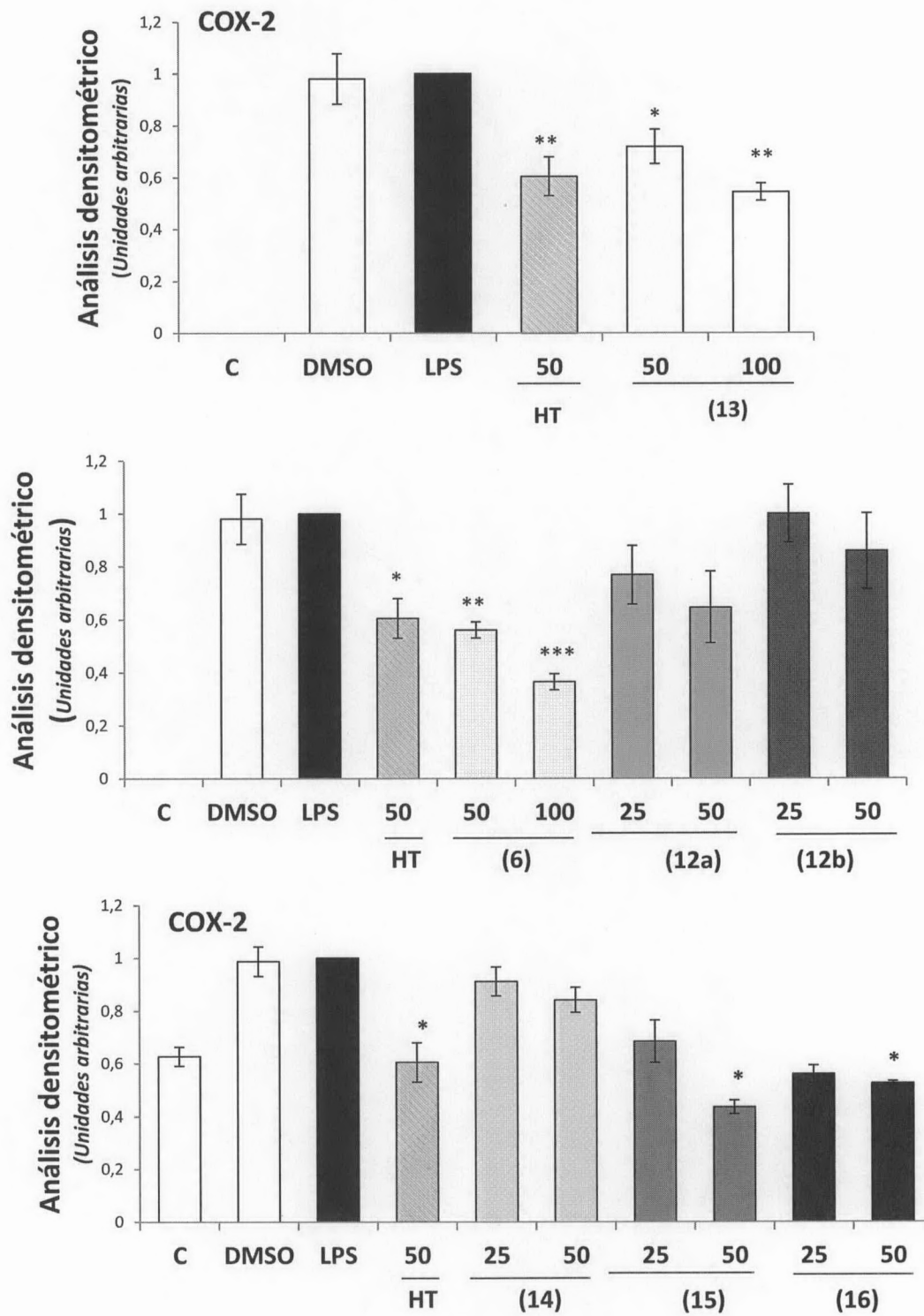


Figura 4

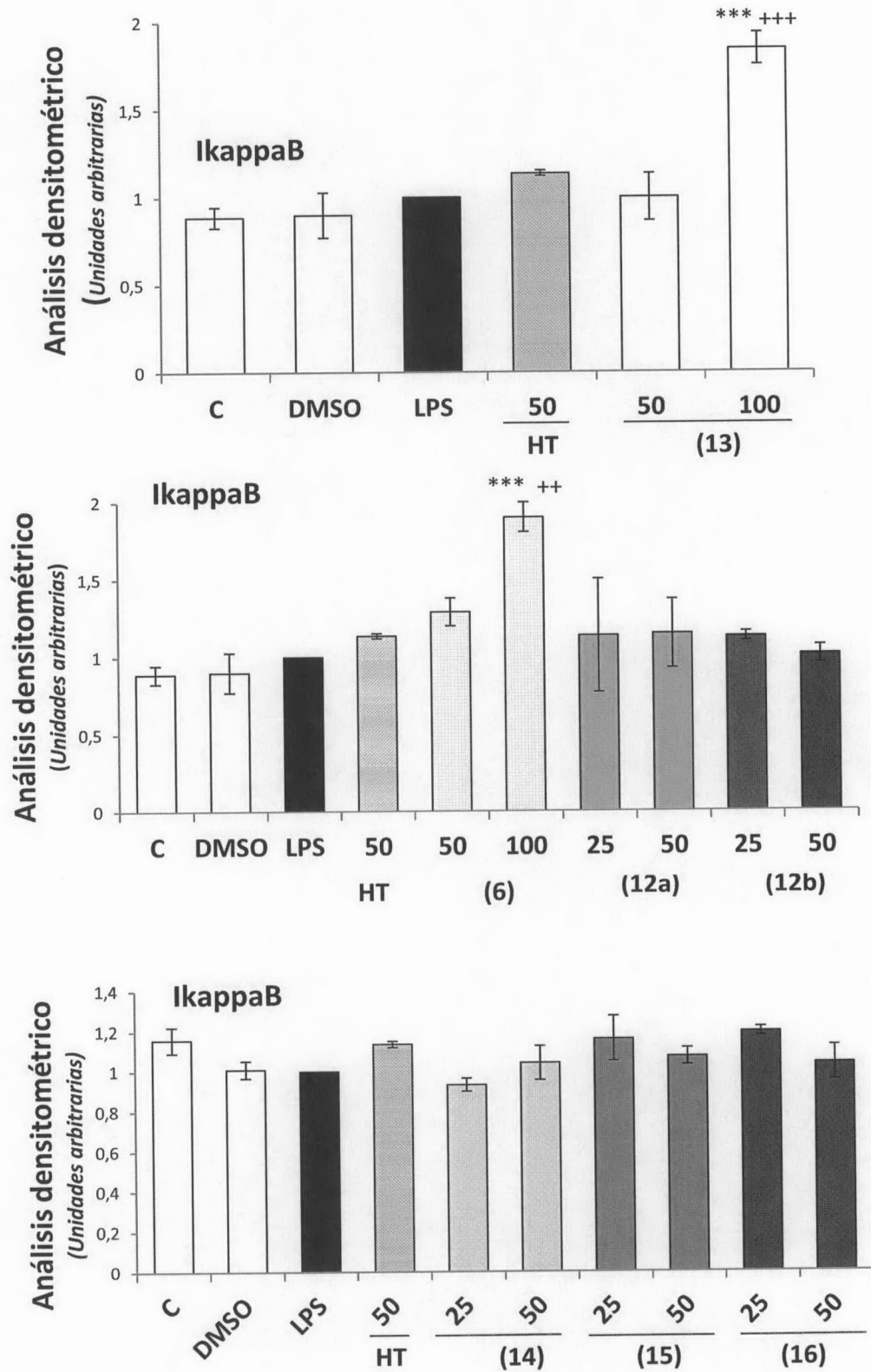


Figura 5

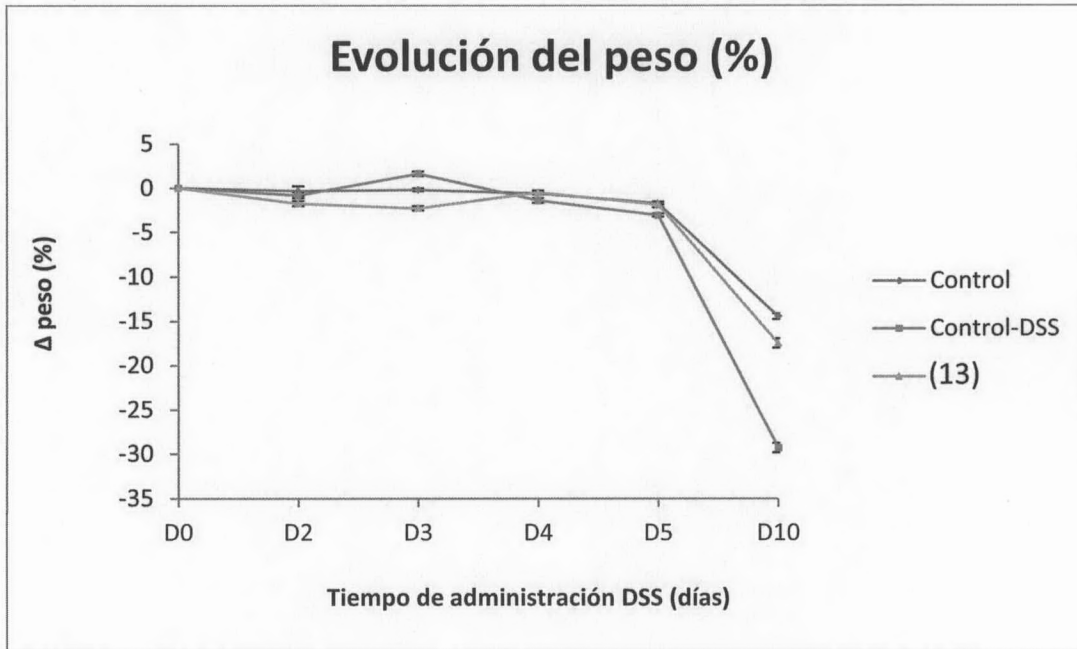


Figura 6

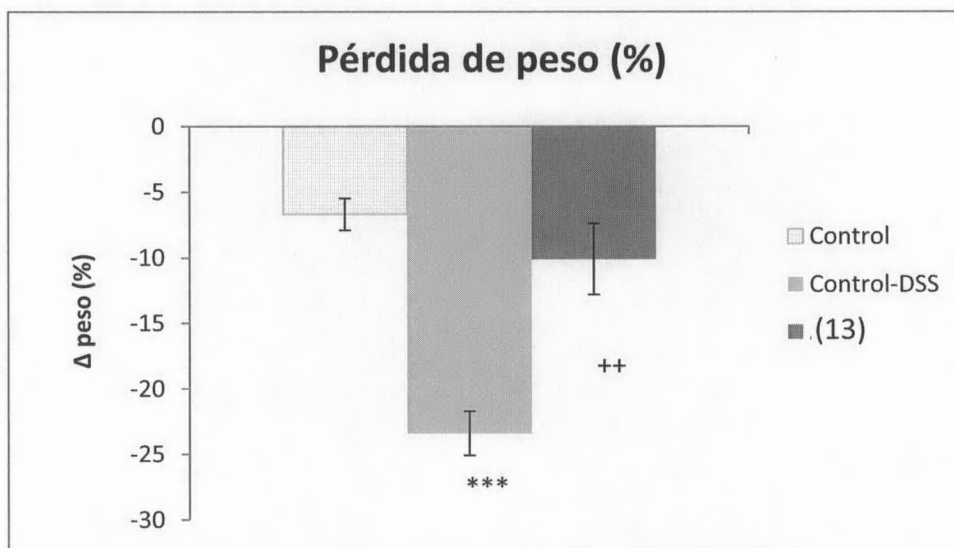


Figura 7

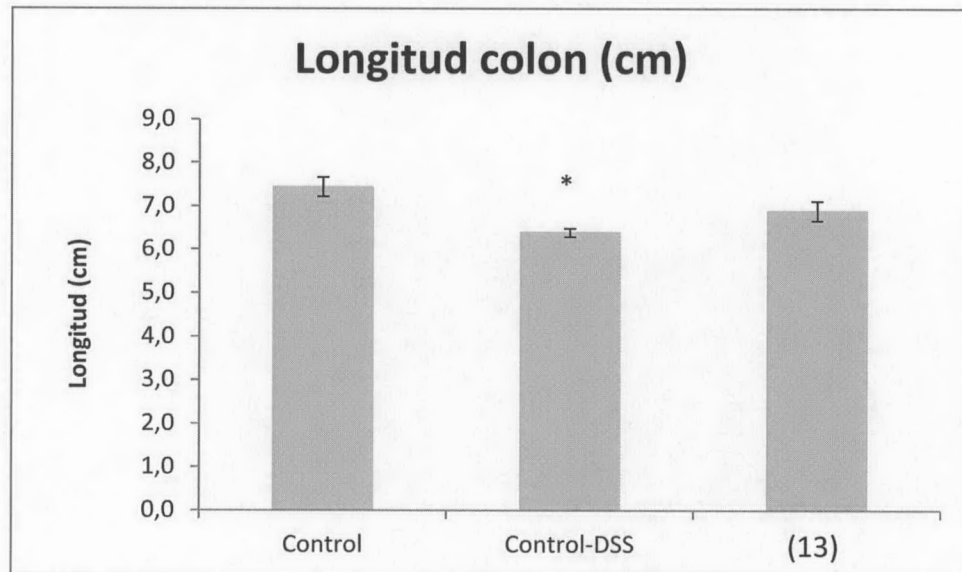


Figura 8

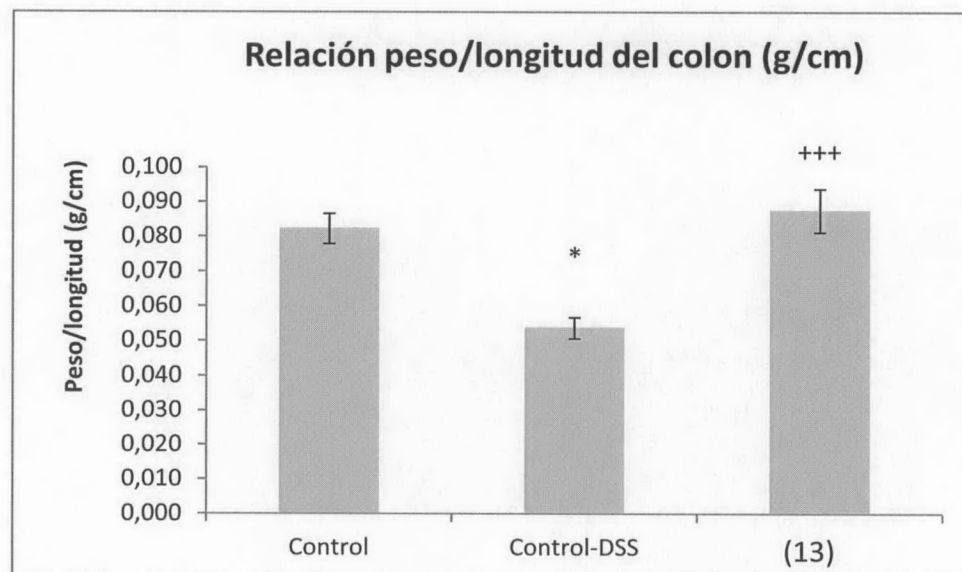


Figura 9

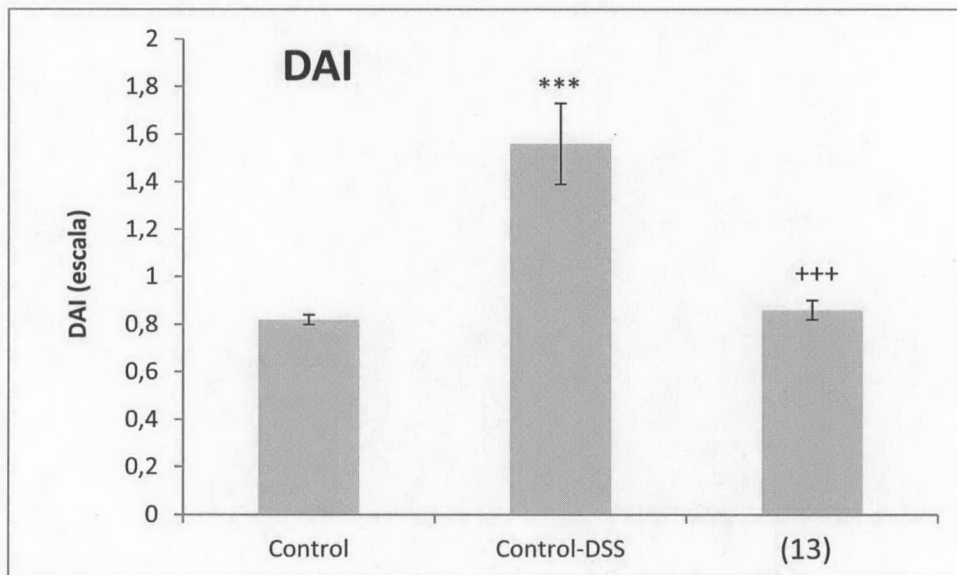


Figura 10

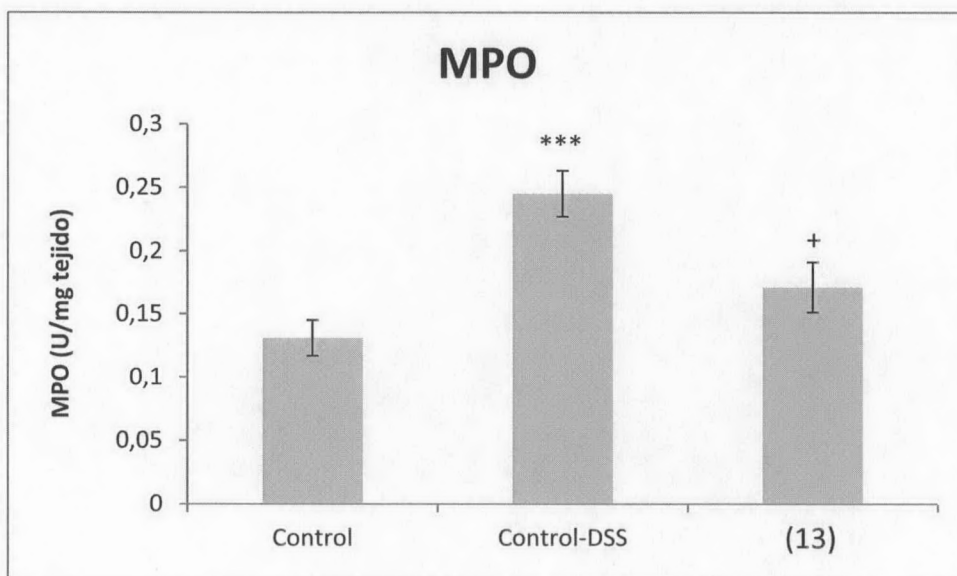
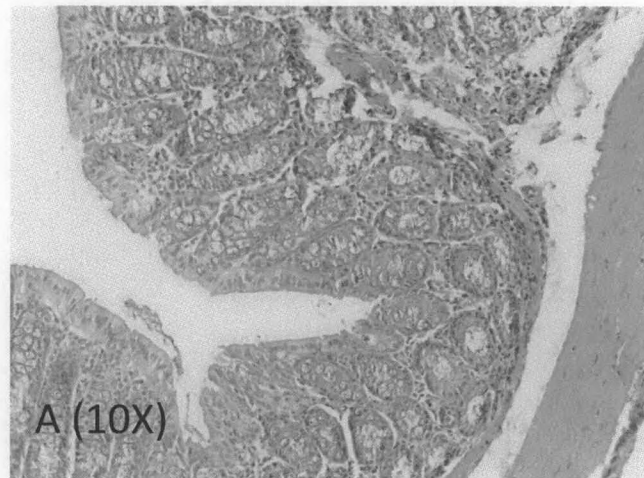
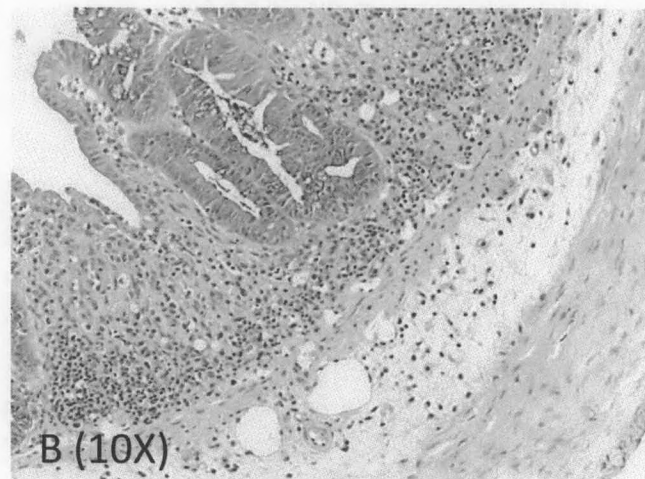


Figura 11

Control



Control-DSS



DSS + (13)

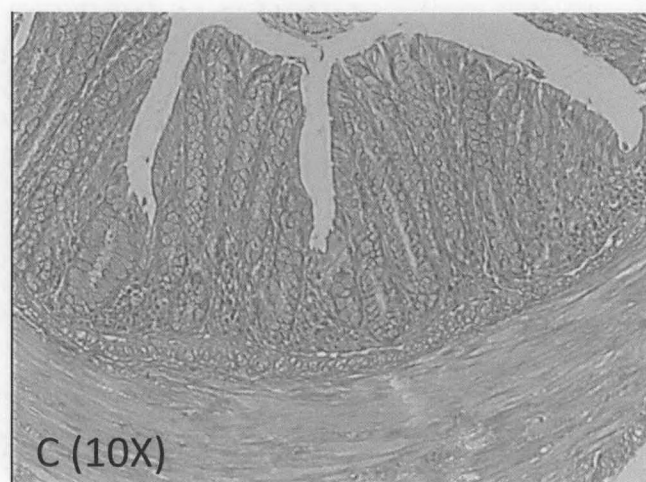


Figura 12

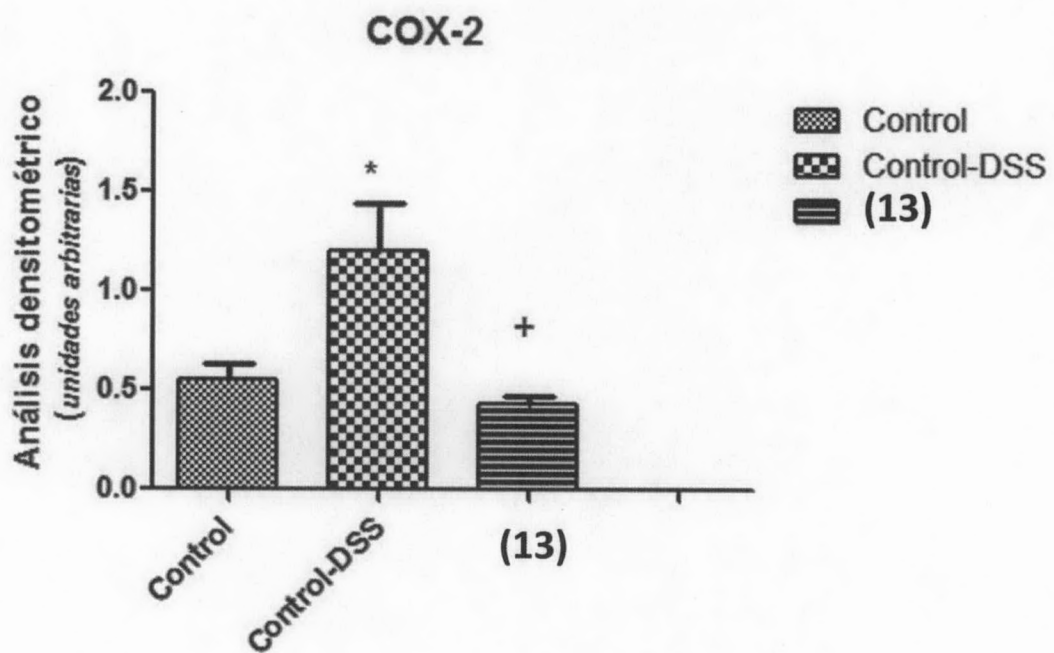
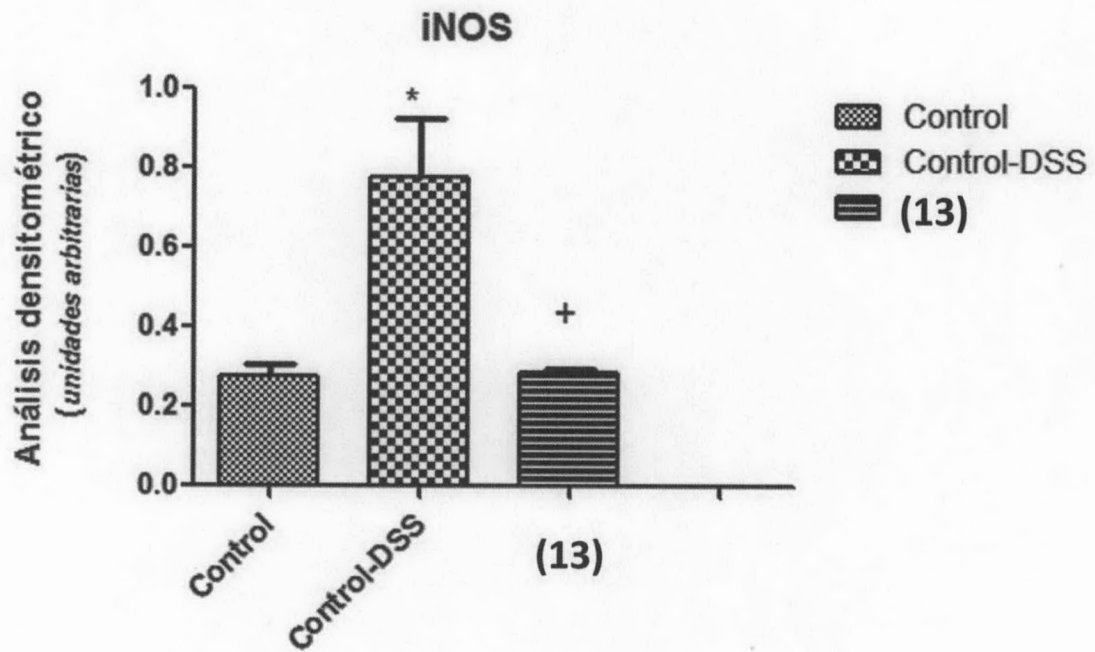


Figura 13

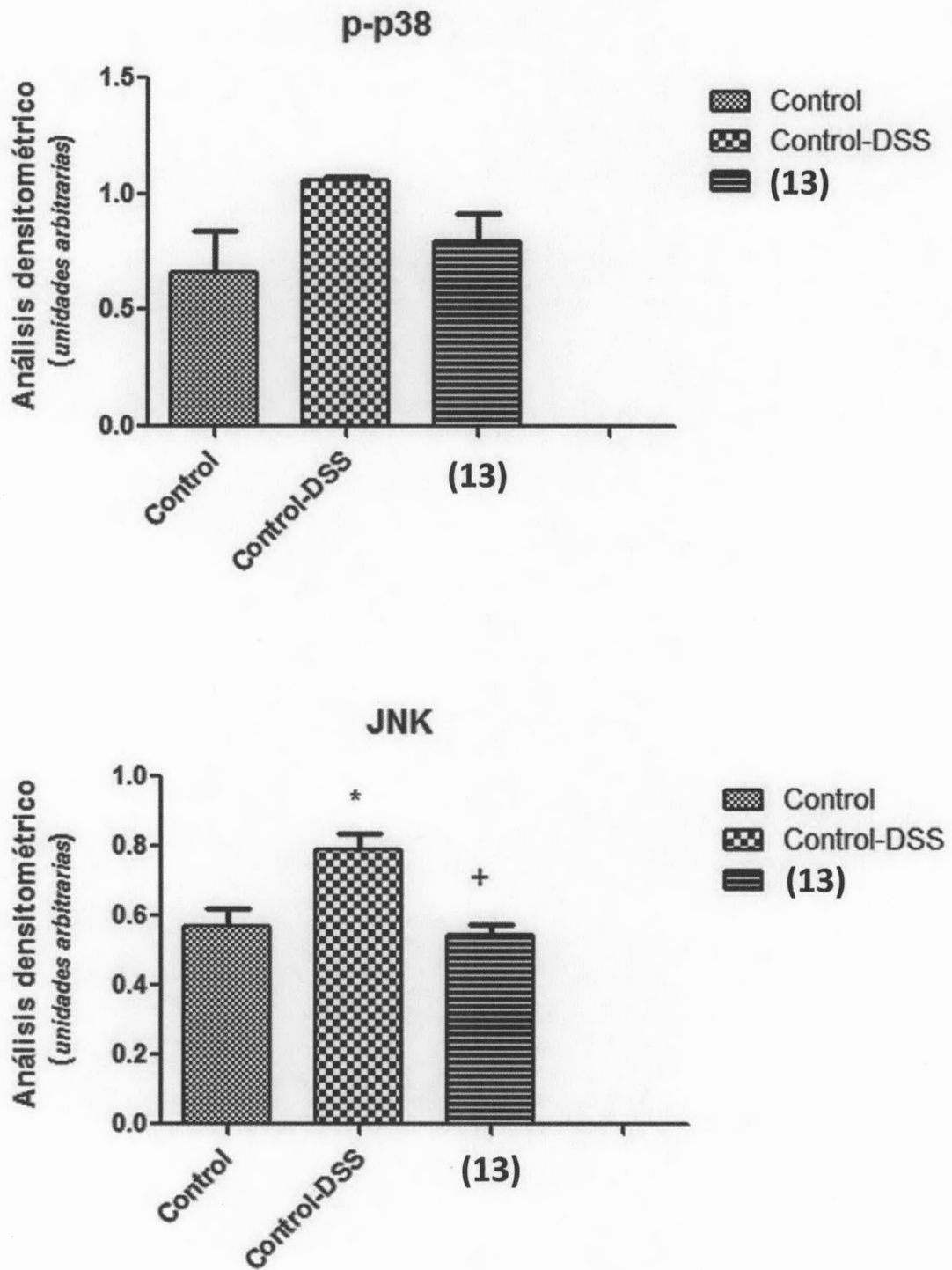
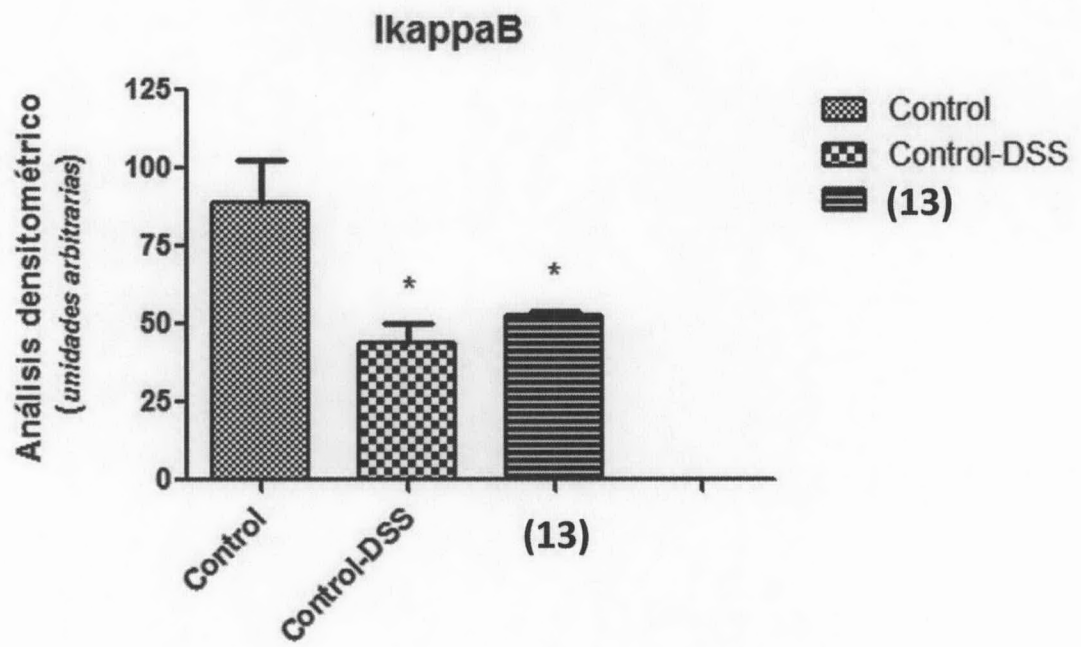


Figura 14





- ②① N.º solicitud: 201300916
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.09.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2395317 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 11.02.2013, página 3, líneas 32-39; página 5, líneas 20-37; reivindicaciones 14-21.	1,3,5-10,17-23,28
X	EP 2377510 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 19.10.2011, párrafos [0001],[0007]-[0008],[0036]-[0043]; reivindicaciones 28-33.	1,5-10,17-22,28
X	ES 2392915 A1 (UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 14.12.2012, páginas 5,9,10; compuestos 9,10,11; reivindicaciones 1,23-25,47-51.	4
X	J. D. BENIGNI et al., "The synthesis of two new metabolites of catecholamines: 3,4-dihydroxyphenylethyleneglycol and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethyleneglycol", Journal of Medicinal Chemistry, 1963, vol. 6, nº 5, páginas 607-608, ver Esquema.	15
X	T. R. WEBB, "A simple synthesis of potassium 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol-4-sulfate", Synthesis, 1984, vol. 3, páginas 213-214, ver Esquema, compuesto 6.	11-14
X	M. H. HOLSHOUSER et al., "Facile synthesis of glycol metabolites of phenethylamine drugs", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1986, vol. 75, nº 6, páginas 619-621, ver Esquema 1.	16
A	B. ROOS et al., "Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies", European Journal of Nutrition, 2011, vol. 50, páginas 553-562.	1-28

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
04.02.2014

Examinador
E. Dávila Muro

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C39/08 (2006.01)
C07C69/612 (2006.01)
A61K31/05 (2006.01)
A61K31/047 (2006.01)
A61P3/02 (2006.01)
A61P7/02 (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)
A61P31/00 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

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

C07C, A61K, A61P

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, XPESP, NLP, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.02.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2,11-14,16,24-27	SI
	Reivindicaciones 1,3-10,15,17-23,18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2,24-27	SI
	Reivindicaciones 1,3-23,28	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	ES 2395317 A1	11.02.2013
D02	EP 2377510 A1	19.10.2011
D03	ES 2392915 A1	14.12.2012
D04	J. D. BENIGNI et al., Journal of Medicinal Chemistry, 1963, vol. 6, nº 5, páginas 607-608.	1963
D05	T. R. WEBB, Synthesis, 1984, vol. 3, páginas 213-214.	1984
D06	M. H. HOLSHOUSER et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1986, vol. 75, nº 6, páginas 619-621.	1986

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 invención se refiere a los compuestos de fórmula general 12,12a-c y 5 derivados del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), compuesto 6 de la invención. La invención también se refiere al procedimiento de síntesis química de dicho compuesto 6 a partir del hidroxitirosol (HT) así como al uso del compuesto 6 y de los derivados acetilados 12 y 13 y tioderivados 14-16 para la elaboración de una formulación farmacéutica, composición alimentaria o cosmética para su uso como antioxidantes y para la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios.

El documento D01 divulga un procedimiento para la obtención y purificación de un extracto que contiene hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y acetato de hidroxitirosilo a partir de subproductos del olivo. En el documento se hace mención a las propiedades antioxidantes e inhibidores de la agregación plaquetaria de estos compuestos y se reivindica su uso como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos y anticancerosos en formulaciones de alimentos, productos cosméticos y fármacos (ver página 5, líneas 20-37, reivindicación 19). Los compuestos 3,4-dihidroxifenilglicol y acetato de hidroxitirosilo se corresponden exactamente con los compuestos 6 y 13 (R=alquilo C1-C23) de la invención.

El documento D02 también divulga un método para la extracción y purificación del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol a partir de subproductos del olivo. En el documento se menciona la actividad antioxidante del DHPG y su uso potencial como antiinflamatorio en composiciones farmacéuticas, cosméticas y nutricionales, así como para la prevención de trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos y tumorales y en general para la prevención y/o tratamiento de trastornos asociados al estrés oxidativo (ver párrafos [0036]-[0043], reivindicaciones 28,30-33). El compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol se corresponde exactamente con el compuesto 6 de la invención.

El documento D03 divulga unos compuestos bioactivos polifenólicos derivados del hidroxitirosol que contienen azufre o selenio y su uso como potentes antioxidantes y captadores de radicales libres de aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Entre los compuestos descritos hay que destacar los tioderivados compuestos 9,10,11 que se corresponden respectivamente con los compuestos 14,15,16 de la invención (ver página 15, Esquema 2 y páginas 36-37). En el documento se menciona que, en concreto, para la industria farmacéutica estos compuestos tendrían aplicación como agentes antiinflamatorios, antimicrobianos y antivirales, así como para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y tumorales (ver página 5, líneas 6-20, reivindicaciones 23-25).

En consecuencia, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1,3-10,17-23,28 no es nuevo ni con actividad inventiva según lo divulgado en los documentos D01-D03 (Arts. 6.1 y 8.1 LP/1986).

El documento D04 divulga la síntesis de los compuestos 3,4-dihidroxifeniletilenglicol y 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol a partir de los correspondientes precursores con los grupos hidroxilo protegidos con grupos bencilo (ver Esquema, página 607, Parte Experimental, página 607). El intermedio Va (R=bencilo) 3,4-dibenciloxifeniletilenglicol es estructuralmente idéntico al compuesto 5 de la invención cuando P=bencilo.

Por lo tanto, se considera que el objeto de la invención recogido en la reivindicación 15 no es nuevo ni con actividad inventiva a la vista de lo divulgado en el documento D04 (Arts. 6.1 y 8.1 LP/1986).

El documento D05 divulga la preparación del compuesto 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol-4-sulfato en forma de sal potásica mediante una ruta de síntesis que incluye como intermedio al derivado diacetilado 6; este compuesto es estructuralmente muy similar a los compuestos de fórmula 12 y 12c cuando R=acetilo (ver Esquema, página 213, Parte experimental, página 214), aunque en este caso uno de los hidroxilos en el anillo bencénico está metilado.

Aunque no se han encontrado divulgados en el estado de la técnica anterior los compuestos 12,12a-c tal como están definidos en la invención (R=alquilo C1-C23, alquenilo C2-C23, alcadienilo C4-C23, alcatrienilo, alcapolienilo), a la vista de lo descrito en D05 los compuestos 12a-c con sustituyentes R=butanoilo, lauroilo, acetoxilo se consideran una mera variación estructural del derivado diacetilado 6, sobre todo teniendo en cuenta que ya es conocido por el experto en la materia la protección de grupos hidroxilo por reacción con grupos acilo. En consecuencia, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 11-14 no cumple el requisito de actividad inventiva según lo divulgado en el documento D05 (Art. 8.1 LP/1986).

El documento D06 divulga un método de síntesis de los metabolitos glicol aromáticos de epinefrina y norepinefrina, compuestos 3,4-dihidroxifeniletilenglicol (DHPG) y 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG). La síntesis comienza con la bromación en alfa de acetofenonas con los grupos fenólicos protegidos, a continuación se lleva a cabo la sustitución del halógeno con AcOK/NaI o AcOK/Ac₂O y por último la reducción del grupo cetona con LiAlH₄ y eliminación de los grupos acetilo (ver Esquema I, página 619). Este esquema de síntesis es muy similar al recogido en la reivindicación 16 de la invención (opción 2) para obtener el 3,4-dihidroxifeniletilenglicol a partir de un haluro de 3,4-dihidroxifenacilo.

Aunque no se ha encontrado en el estado de la técnica la preparación de 3,4-dihidroxifeniletilenglicol a partir del haluro de 3,4-dihidroxifenacilo como se recoge en la reivindicación 16 (opción 2), a la vista de lo descrito en D06 ésta sería una mera variación estructural del proceso sobre todo teniendo en cuenta que es conocida la preparación de los compuestos 4-hidroxifeniletilenglicol (compuesto 14), 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol (compuesto 15) o 3(4)-metoxifeniletilenglicol (compuestos 16,17) utilizando como intermedio un derivado 3,4-triacetoxiacetofenona cuya reducción e hidrólisis conduciría al derivado con los grupos hidroxilo libres. Consecuentemente, la invención recogida en la reivindicación 16 se considera que carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP/1986).

Por otra parte, no se han encontrado en el estado de la técnica documentos que recojan el uso del compuesto 12, derivado diacetilado del 3,4-dihidroxifeniletilenglicol, ni su uso en composiciones alimentarias o nutricionales o como componente en alimentos funcionales. Tampoco se han encontrado documentos en los que se haga referencia al uso de los derivados del hidroxitirosol, compuestos de fórmulas 6,12,13,14,15,16 para la modulación de la microbiótica intestinal. Por lo tanto, las características de las reivindicaciones independientes 2 y 24-27 se consideran nuevas y con actividad inventiva y aplicación industrial según los Artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.