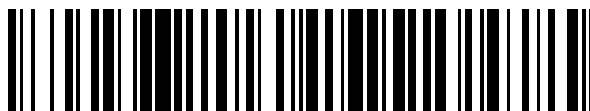


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 150**

51 Int. Cl.:

C07C 45/85 (2006.01)

C07C 49/727 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2012** **PCT/EP2012/069452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013** **WO13050365**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2012** **E 12778652 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2763948**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de ingenol**

30 Prioridad:

04.10.2011 ES 201131601 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2018

73 Titular/es:

INDENA S.P.A. (100.0%)

Viale Ortles, 12

20139 Milano, IT

72 Inventor/es:

BELLIDO CABELLO DE ALBA, MARIA LUZ;

APPENDINO, GIOVANNI;

PAGANI, ALBERTO y

MUÑOZ BLANCO, EDUARDO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 674 150 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

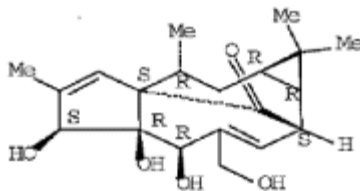
Procedimiento de aislamiento de ingenol

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la biología, farmacia y medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de ingenol de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol, más particularmente cuando dichas mezclas provienen de plantas, específicamente de semillas del género *Euphorbia*, y más específicamente de semillas de las especies de *E. lathyris*.

Estado de la técnica

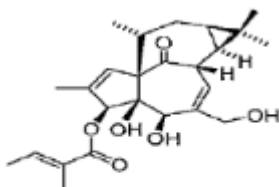
10 Los ingenoles son compuestos que, a pesar de que se pueden obtener por síntesis química, también están presentes fundamentalmente en plantas de la familia Euphorbiaceae, especialmente en aquellas variedades con actividad purgante [Evans FJ and Kinghorn ADJ. Linn. Soc. Bot. (London) 1977; 74:23-35; Evans FJ and 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]. Específicamente, se ha aislado ingenol ($C_{20}H_{28}O_5$) (número de registro CAS 30220-46-3) (Fórmula 1) de las semillas de plantas de la especie *Euphorbia lathyris* L., comúnmente conocidas como tártago. El
15 aceite de semilla de tártago se comercializa en diferentes países de todo el mundo y es una materia prima importante para la industria química, ya que se utiliza en la composición de un número de productos tales como pinturas, barnices, cosméticos, lubricantes, plásticos, biodiesel, etc.



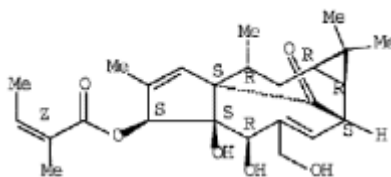
Ingenol (Fórmula I)

Me: CH_3 en la presente memoria

20 Ha surgido en los últimos años un enorme interés en el compuesto ingenol y sus derivados debido a sus actividades biológicas importantes. Ciertos ingenoles y especialmente los derivados esterificados en la posición 3', ya sean naturales u obtenidos por síntesis parcial, presentan actividad anticancerígena y antiviral potente [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.,
25 Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(1):271-3]. Se entiende por síntesis parcial el aislamiento de ingenol de plantas que lo contienen y la sustitución en su estructura molecular por reacciones químicas adecuadas en cada caso de los grupos que conducen a los diferentes derivados de interés. Dichos derivados esterificados en la posición 3' que presentan actividad biológica son, preferentemente, ingenol-3-tigliato (Fórmula II) e ingenol-3-angelato (Fórmula III).



Ingenol-3-tigliato
(Fórmula II)



Ingenol-3-angelato
(Fórmula III)

Ingenol está presente en la forma de ésteres en mezclas con ésteres diterpenoides, en las plantas y en extractos de plantas. Sin embargo, las semillas de tártago son la única fuente comercial para aislar ingenol de la que es posible obtener los derivados de ingenol biológicamente activos utilizados en la práctica clínica por medio de diferentes procedimientos químicos. Dichas semillas tienen una matriz compleja 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 de Euphorbia L₁-L₉ que comprenden una cantidad pequeña pero relativamente constante de monoésteres de ingenol (L₄, L₅ y L₆) [Adolf W and Hecker EZ. Krebsforsch. 1975, 84, 325-344], en la que la fracción que contiene ingenol es menor en comparación con la fracción que contiene los otros tipos diterpenoides. Los ésteres de ingenol son altamente tóxicos, lo que constituye un aceite altamente irritante, y aunque el ingenol solo aislado en forma libre es inofensivo, el ingenol aislado de dichos ésteres es técnicamente complejo y no está libre de riesgo para la salud de los operadores implicados en dichas operaciones de aislamiento debido a la toxicidad antes mencionada de la fracción de éster de ingenol.

Un procedimiento para aislar ingenol de semillas de *E. lathyris* fue publicado en 1991 [Bagavathi R. et al., Naturforsch. 1991; 46b: 1425-1433]. Dicho procedimiento consistía en la separación de la fracción que contiene ésteres de ingenol por medio de una serie de extracciones con disolventes, tales como metanol, éter de petróleo y cloroformo, seguido de adsorción selectiva en geles de sílice. Después, la fracción que contenía ésteres de ingenol se sometió a hidrólisis y el ingenol obtenido se purificó finalmente por medio de técnicas de cromatografía en columna. Dicho procedimiento de aislamiento de ingenol requiere una gran cantidad de tiempo y trabajo, debido al gran número de etapas o fases, por lo tanto, su rendimiento es bajo y por lo tanto complica el desarrollo de nuevos derivados semi-sintéticos que potencialmente podrían ser utilizados como fármacos.

Para resolver el problema de la baja eficiencia y bajo rendimiento del procedimiento descrito anteriormente en el estado de la técnica para el aislamiento de ingenol, Appendino *et al.* [Appendino G et al., J Nat Prod. 1999; 62(1):76-9] han desarrollado un protocolo más corto y menos tóxico para extraer y aislar ingenol dado que el tiempo en contacto con el aceite irritante extraído de las semillas de *E. lathyris* que contienen ésteres de ingenol y también contienen compuestos diterpenoides macrocíclicos fue menor que el descrito anteriormente. En dicho procedimiento, el aislamiento de ingenol de aceite de semilla de *E. lathyris* se llevó a cabo en tres etapas básicas. En resumen, por

(1) Separación de una fracción diterpenoide en bruto, (2) hidrólisis de los factores de Euphorbia L₁-L₉, y (3) separación de ingenol de los polioles resultantes de la hidrólisis de ésteres diterpenoides macrocíclicos (latirol, epoxilatirol, 7-hidroxilatirol, isolatirol, jolkinol, etc.). Ambas separaciones implican la purificación de una pequeña concentración de ingenol de una mezcla compleja de compuestos naturales que tienen una polaridad similar, que se traduce en la obtención de un ingenol que, debido a la complejidad de la muestra en la que está incluido y debido a dicha similitud en la polaridad de los compuestos que forman la muestra mencionada anteriormente, puede tener impurezas, dado que está contaminado con otras sustancias presentes en la mezcla mencionada, ésteres de ingenol principalmente no hidrolizados o ésteres de otros diterpenoides macrocíclicos.

El problema técnico resuelto por la presente invención es un procedimiento que es una alternativa a los descritos en el estado de la técnica de aislamiento de ingenol de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol. Estas mezclas pueden tener cualquier origen, es decir, que pueden ser naturales (de plantas) o generarse en un procedimiento de síntesis química. La invención preferentemente aísla ingenol de plantas del género *Euphorbia*, y más específicamente de semillas de *E. lathyris*.

Para resolver los problemas descritos existentes en el estado de la técnica para el aislamiento de ingenol, la presente invención describe un procedimiento de aislamiento de dicho compuesto de mezclas de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol, producidos preferentemente durante el procesamiento de semillas de *E. lathyris*, con un rendimiento más alto que aquellos conocidos en el estado de la técnica mediante la simplificación del número de etapas necesarias para dicho aislamiento, reduciéndolo a una sola etapa (con una etapa opcional de purificación) y la obtención de un ingenol con menos impurezas (pureza > 99%).

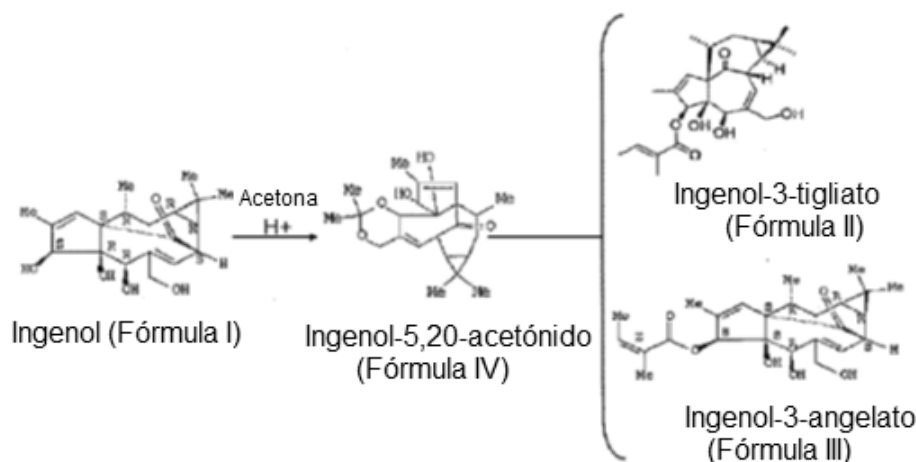
Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

El procedimiento descrito en la presente invención combina la hidrólisis de ingenol presente en la mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol y la separación de dicha ingenol de dicha mezcla en una sola etapa. Para ello, dicha mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol se trata con una solución de un disolvente orgánico, preferentemente tetrahidrofurano (THF), y agua acidificada, más preferentemente salmuera acidificada (agua + sal). El procedimiento descrito en la presente invención evita el aislamiento de intermedios tóxicos o irritantes, tales como la fracción de éster de ingenol, lo que simplifica el procedimiento y los tiempos para purificación de ingenol y, además, el rendimiento de producción de dicho compuesto es mucho mayor que los conocidos hasta ahora en el estado de la técnica. Se obtiene además ingenol con una menor concentración de impurezas, lo que hace al ingenol más adecuado para ser el compuesto de partida en los procedimientos para obtener derivados del mismo, con un mayor rendimiento y pureza, que pueden ser utilizados como fármacos.

Ingenol obtenido mediante el procedimiento descrito en la presente invención se puede utilizar para la obtención de derivados esterificados de dicho ingenol que son biológicamente activos, tales como ingenol-3-tigliato (Fórmula II) e ingenol-3-angelato (Fórmula ID), por ejemplo. El procedimiento de obtención de dichos derivados biológicamente activos incluye una etapa intermedia de síntesis del compuesto ingenol-5,20-acetónido (Fórmula IV) y, posteriormente, su esterificación (Diagrama 1), para dar los compuestos biológicamente activos mencionados con anterioridad de acuerdo con técnicas conocidas en el estado de la técnica para dicho propósito.

Diagrama 1. Procedimiento de obtención de derivados de ingenol biológicamente activos por medio de procedimientos conocidos en el estado de la técnica a partir de ingenol obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención.



Los derivados biológicamente activos obtenidos de ingenol por medio del procedimiento descrito en la presente invención presentan una pureza mayor que 99%. Para el caso particular de la obtención de ingenol-3-angelato de ingenol obtenido mediante el procedimiento descrito en la presente invención, su rendimiento de producción mejora significativamente el rendimiento de la materia prima por kg y es mucho más eficiente e industrialmente escalable que los procedimientos descritos en el estado de la técnica para la obtención de dicho producto (Hohmann, J. et al., Planta Med. 2000, 66: 291-294). Por lo tanto, el rendimiento de producción de ingenol-3-angelato de *Euphorbia peplus* conocido en el estado de la técnica es de 1,1 mg por kg de planta, mientras que, con el procedimiento de la presente invención, mediante la combinación de la extracción de ingenol de polvo de semilla de *Euphorbia Lathyris* seguido por un procedimiento para la síntesis química parcial del derivado de ingenol-3-angelato, puede obtenerse hasta 190 mg por kg de polvo de semilla de *Euphorbia Lathyris*.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de ingenol de mezclas que comprenden ésteres diterpenoides (incluyendo ésteres de ingenol) por la combinación de las fases de hidrólisis y el aislamiento/extracción de dicho ingenol en una sola etapa y que comprende opcionalmente además una fase adicional de purificación de ingenol aislado. Los términos de aislamiento y de extracción en relación con ingenol deben interpretarse como siendo equivalentes a lo largo de la presente invención.

A tal fin, el procedimiento de la invención somete la mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol a una sola etapa de tratamiento combinado con un agua acidificada y una solución de disolvente orgánico, preferentemente la relación de agua acidificada a disolvente orgánico es de 1:1.

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

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

Opcionalmente, el procedimiento de la invención comprende, además, una fase adicional de purificación de ingenol aislado. Dicha fase de purificación de ingenol se lleva a cabo preferentemente por medio de cromatografía en columna de gravedad.

En un modo preferido de llevar a cabo el procedimiento de la invención, la etapa única de hidrólisis y aislamiento/extracción de ingenol se lleva a cabo en un procedimiento de material de planta y que comprende las fases de:

a) Someter el material de planta, preferentemente 100 g de semillas molidas y homogeneizadas, a agitación mecánica durante preferentemente 4 horas a temperatura ambiente en una solución de metanol que contiene metilato de sodio, preferentemente a una concentración de 0,20 N.

b) Neutralizar la reacción anterior con una solución de un ácido acético glacial o ácido perclórico en una concentración de 0,03 M.

c) Filtrar o succionar la solución precedente preferentemente a través de celite.

d) Lavar el pellet obtenido en la fase anterior con 70% de metanol.

e) Concentrar el pellet preferentemente en un rotavapor.

f) Extraer el pellet anterior la fracción que contiene ésteres de ingenol con éter de petróleo.

g) Aislar ingenol de los compuestos restantes comprendidos en la fracción obtenida en la fase f anterior) por medio del tratamiento combinado con agua acidificada y THF en un solo paso.

h) Opcionalmente, purificar el ingenol aislado en la fase precedente.

En una realización preferida de la invención, el material de planta es semillas de *Euphorbia lathyris*.

La agitación mecánica se lleva a cabo preferentemente por medio de un rotor accionado por un motor eléctrico. En una realización preferida de la invención, las semillas se someten a esta agitación mecánica después de haber sido previamente molidas, y más preferentemente molida a polvo de semilla.

En otra realización preferida del procedimiento de aislamiento de ingenol de un material de planta de partida utilizado, la solución de agua acidificada consiste preferentemente en una combinación de H_2SO_4 a una concentración de 2 N y $\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$ al 35% p/v en una relación de 1:1.

En otra realización preferida del procedimiento de aislamiento de ingenol de un material de planta de partida utilizado, la fase de purificación de ingenol se lleva a cabo por medio de cromatografía en columna de gravedad, preferentemente usando una columna de gel de sílice como fase estacionaria con una fase móvil de éter de petróleo-acetato de etilo.

Como se ha mencionado repetidamente, el ingenol producido por medio del procedimiento de la invención puede ser utilizado como un precursor para la obtención de sus derivados biológicamente activos, preferentemente para la obtención de ingenol-3-tigliato (Fórmula II) e ingenol- 3-angelato (Fórmula III), que pueden ser utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de diferentes patologías. Dichos derivados, así como el propia ingenol aislado de acuerdo con el procedimiento de la invención, se obtienen con grados de pureza > 99%.

A tal fin, en una realización preferida de la invención, el ingenol aislado opcionalmente purificado, independientemente de si se obtiene de una mezcla de ésteres de ingenol y ésteres de diterpenoides de cualquier origen o dicha mezcla se genera a partir de una fuente de material de planta, preferentemente semillas de *E. lathyris*, dicho ingenol se somete a un procedimiento adicional de síntesis química parcial para producir un derivado en la posición 3, seleccionado de: ingenol-3-tigliato (Fórmula II), ingenol-3-angelato (Fórmula III), o sus mezclas. Preferentemente, dicho procedimiento adicional de síntesis química parcial para la obtención de derivados de ingenol en la posición 3 al que está sometido el ingenol aislado opcionalmente purificado tiene ingenol-5,20-acetonido como el compuesto intermedio común (Fórmula IV).

El objeto de los ejemplos descritos a continuación es ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

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

El polvo de semilla de *Euphorbia lathyris* L (1 kg) se agitó mecánicamente en una solución de 2 L de metilato de sodio en 0,20 N de metanol durante 4 horas. Después de dicho tiempo, la solución se neutralizó con ácido acético glacial (o ácido perclórico) y se filtró y/o succionó a través de un lecho de celite. La pasta obtenida de dicha filtración se lavó varias veces con metanol (100 ml cada vez), y los materiales filtrados se concentraron por medio de técnicas de vacío hasta un volumen de 1,5 L, y posteriormente se extrajeron con éter de petróleo. La fase de metanol obtenido de dicha extracción se evaporó con un evaporador rotatorio y el residuo resultante se sometió a la solución de salmuera ácida (H_2SO_4 2N + 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 se purificó por cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (150 ml) usando un gradiente de éter de petróleo-EtOAc (acetato de etilo) hasta obtener 0,750 g de ingenol (Fórmula 1) con una pureza > 99%.

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

Se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (50 mg) a una solución de ingenol (100 mg, 0,29 mmol) disuelto en acetona (5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y después se sometió a evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gravedad hasta alcanzar 62 mg (55% de rendimiento) de ingenol-5,20-acetonido (Fórmula IV). Por datos físicos y espectroscópicos, véase Bangavathi R. et al. On the Chemistry of Ingenol IV. Z. Naturforsch. 1991, 46b, 1425-1433.

Ejemplo 3. Producción de tigliato de ingenol (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), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtró a través de un lecho de Celite y se evaporó. El material resultante se filtró en gel de sílice (aproximadamente 5 g) y se evaporó. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (5 g, éter de petróleo:EtOAc 85:15) hasta obtener más de 80 mg de ingenol-3-tigliato con una pureza > 99%). Por datos físicos y espectroscópicos, véase Hohmann J et al. Planta Medica 2000,66,291-294.

Ejemplo 4. Producción de angelato de ingenol (Fórmula III)

Una solución de ingenol-5,20-acetonido (100 mg, 0,26 mmol), ácido angélico (39 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) Y DMAP (48 mg, 0,39 mmol, 1,5 mol. equiv.) en tolueno (4 ml), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtró a través de un lecho de celite y se evaporó. El material resultante se filtró en gel de sílice (ca. 5 g) y se evaporó. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (5 g, éter de petróleo:EtOAc 85:15) hasta obtener más de 80 mg de ingenol-3-angelato con una pureza > 99%. Por datos físicos y espectroscópicos, véase Hohmann J et al. Planta Medica 2000, 66, 291-294.

Literatura

- Adolf W and Hecker EZ. Krebsforsch. 1975,84,325-344.
- Appendino G et al., An expeditious procedure for the isolation of Ingenol from the *Euphorbia lathyris* seeds. 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 cancer cells. Br J Cancer. 2008 Dec 2; 99(11):1808-15.
- Duke, J. D. Handbook of Energy Crops (disponible 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, 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 C. *Cancer Res.* 2004; 64(9):3243-55.
- Le TI et al. Immunostimulatory cancer chemotherapy using local ingenol-3-angelate and synergy with immunotherapies. *Vaccine.* 2009 May 18; 27(23):3053-62.
- 5 • Mainieri F et al. Synthesis of Sapintoxin D and N-Methylantranilatebased Fluorescent 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.
- 10 • Olsnes AM et al. The protein kinase C agonist PEP005 increases NF-kappaB expression, 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

- 5 1. Un procedimiento de aislamiento de ingenol de una mezcla de ésteres diterpenoides y ésteres de ingenol mediante la combinación de las fases de hidrólisis de los ésteres de ingenol y extracción/aislamiento de ingenol en una sola etapa, sometiendo dicha mezcla a una sola etapa de tratamiento combinado con un agua acidificada y una solución de disolvente orgánico.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación de agua acidificada a disolvente orgánico es de 1:1.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el disolvente orgánico es THF.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agua acidificada contiene sales inorgánicas.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el agua acidificada contiene NaCl.
- 15 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el agua acidificada y una solución de disolvente orgánico consiste en una combinación de H₂SO₄ 2N y H₂O más NaCl al 35% de peso/volumen en una relación de 1:1.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una fase adicional de purificación de ingenol aislado.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** la fase de purificación de ingenol aislado se lleva a cabo por medio de cromatografía en columna de gravedad.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el ingenol aislado purificado se somete a un procedimiento adicional de síntesis química parcial para producir un derivado en la posición 3 seleccionado de: ingenol-3-tigliato, ingenol-3-angelato o sus mezclas.
- 25 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el procedimiento adicional de síntesis química parcial para la obtención de derivados de ingenol en la posición 3 al que está sometido el ingenol aislado purificado tiene ingenol-5,20-acetonido como el compuesto intermedio común.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende las fases de:
 - a) Someter el material de planta a agitación mecánica en una solución de metilato de sodio en metanol.
 - b) Neutralizar la reacción anterior con una solución de un ácido acético glacial o ácido perclórico.
 - 30 c) Filtrar o succionar la solución precedente.
 - d) Lavar el pellet obtenido en la fase anterior con metanol.
 - e) Concentración por medio de técnicas de vacío.
 - f) Extraer la fracción que contiene ésteres de ingenol con éter de petróleo.
 - 35 g) Aislar ingenol de los compuestos restantes contenidos en la fracción obtenida en la fase anterior f) por medio de tratamiento con agua acidificada y THF.
 - h) Opcionalmente purificar el ingenol aislado
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** el material de planta son semillas de *Euphorbia lathyris*.
- 40 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde la concentración de metilato de sodio en metanol es 0,20 N y el tiempo durante el cual las semillas se someten a agitación mecánica es de 4 horas.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado porque** la filtración o de aspiración de la etapa c) se lleva a cabo sobre celite.
- 45 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado porque** la solución de agua acidificada consiste en una combinación de H₂SO₄ 2N y H₂O más NaCl al 35% de peso/volumen en una relación de 1:1.

16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, **caracterizado porque** la fase de purificación de ingenol se lleva a cabo por medio de cromatografía en columna de gravedad.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado porque una columna de gel de sílice se utiliza como fase estacionaria con una fase móvil de éter de petróleo-acetato de etilo.
- 5 18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el ingenol aislado opcionalmente purificado se somete a un procedimiento adicional de síntesis química parcial para producir un derivado en la posición 3, seleccionado de: ingenol-3- tigliato, ingenol-3-angelato o sus mezclas.
- 10 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el procedimiento adicional de síntesis química parcial para la obtención de derivados de ingenol en la posición 3 al que está sometido el ingenol aislado opcionalmente purificado tiene ingenol-5,20-acetónido como el compuesto intermedio común.