

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 044**

21 Número de solicitud: 201700216

51 Int. Cl.:

C07D 261/20 (2006.01)

A61K 35/655 (2015.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.09.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA (100.0%)
Juan de Quesada, 30
35001 Las Palmas ES**

72 Inventor/es:

**TOLEDO MARANTE, Francisco Javier;
ESTÉVEZ ROSAS, Francisco Jesús y
GONZÁLEZ BENTOVICS, Alba**

54 Título: **Procedimiento para producir una mezcla regioisomérica de dos derivados de la (11R, 17R)-11-epi-fistularina-3, mezcla inhibidora de células de leucemia humana**

57 Resumen:

Procedimiento para producir una mezcla regioisomérica de dos derivados de la (11R, 17R)-11-epi-fistularina-3, mezcla inhibidora de células de leucemia humana.

La presente invención se refiere a un procedimiento extractivo/sintético específico para obtener una mezcla regioisomérica de dos derivados de la (11R, 17R)-11-epi-fistularina-3, a partir de la biomasa de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*, así como su uso en terapias diversas como inhibidores de células de leucemia humana.

ES 2 680 044 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir una mezcla regioisomérica de dos derivados de la (11R, 17R)-11-*epi*-fistularina-3, mezcla inhibidora de células de leucemia humana.

5

Sector de la técnica

Industrias farmacéutica y química.

10 **Estado de la técnica anterior**

El tratamiento recomendado para tratar la leucemia humana es la quimioterapia. En ésta se emplean diversos medicamentos destinados a destruir las células leucémicas. La búsqueda de nuevos fármacos con actividad citotóxica frente a las líneas celulares de leucemia humana ha despertado, pues, mucho interés. Como consecuencia del trabajo realizado, en la actualidad se conocen muchas moléculas antileucémicas, pero pocas de origen marino. Es por ello que nuestro grupo de investigación se ha centrado en descubrir sustancias que, siendo antileucémicas, se puedan producir industrialmente por maricultura de algún organismo marino, como es el caso de las esponjas marinas. Las sustancias con actividad antileucémica que se han aislado de esponjas marinas en los últimos 26 años (período 1991-2017), se describen en las siguientes patentes y publicaciones científicas:

- 25 • Mohamed R.; Lee L.-J.; Ornar S. (1991). Cytotoxic activity of marine alkaloids from *Demospongia* sponge on human leukemic cells in vitro. Proceedings of the Malaysian Biochemical Society Conference, 16th, 37-42.
- Ishibashi M.; Tsuda M.; Ohizumi Y.; Sasaki, T.; Kobayashi J. (1991) Puralidin A, a new cytotoxic bromotyrosine-derived alkaloid from the Okinawan marine sponge *Psammoplysilla purea*. *Experientia*, 47 (3), 299-300.
- 30 • Ishida K.; Ishibashi M.; Shigemori H.; Sasaki T.; Kobayashi J. (1992). Agelasine G, a new antileukemic alkaloid from the Okinawan marine sponge *Agelas* sp. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 40 (3), 766-767.
- Casapullo A.; Minale L.; Zollo F. (1993). Paniceins and related sesquiterpenoids from the Mediterranean sponge *Reniera fulva*. *Journal of Natural Products*, 56 (4), 527-533. DOI:10.1021/np50094a012.
- 35 • Fabian I.; Halperin D.; Lefter S.; Mittelman L.; Altstock R.T.; Seaton O.; Tsarfaty I. (1999). Alteration of actin organization by jaspamide inhibits ruffling, but not phagocytosis or oxidative burst, in HL-60 cells and human monocytes. *Blood*, 93 (11), 3994-4005.
- Rodríguez J. (2000). Polycyclic amine alkaloids (3-alkylpiperidine alkaloids) - novel marine bioactive compounds: Structure, synthesis and biochemical aspects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24 [Bioactive Natural Products (Part E)], 573-681.
- 40 • Makarieva T.-N.; Zakharenko A.-M.; Denisenko V.-A.; Dmitrenok P.-S.; Guzii A.-G.; Shubina L.-K.; Kapustina I.-I.; Fedorov S.-N. (2007). Rhizochalinin A, a new antileukemic two-headed sphingolipid from the sponge *Rhizochalina incrustata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43 (4), 468-469. DOI:10.1007/s10600-007-0164-4.
- 45 • Li M.; Wei S.-Y.; Tang S.-A.; Lin W.-H.; Cui J.-R. (2008) Antileukemic activity of jaspolide B, an isomalabaricane-type triterpene from marine sponge *Jaspis* sp. On human promyeloleukemic HL-60 cells. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 17 (1), 11-15.
- 50 • Martínez-Poveda B.; Quesada A.-R.; Medina M.-A. (2008). The anti-angiogenic 8-epipuupehedione behaves as a potential anti-leukemic compound against HL-60 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12 (2), 701-706. DOI:10.1111/j.1582-4934.2007.00134.x.

- 5 • Queiroz A.-F.-S.; Silva R.-A.; Moura R.-M.; Dreyfuss J.-L.; Paredes-Gamero E.-J.; Souza A.-C.-S.; Tersariol I.-L.-S.; Santos E.-A.; Nader H.-B.; Justo G.-Z.; y col. (2009) Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63 (6), 1023-1033. DOI: 10.1007/s00280-008-0825-4.
- Mieczkowski A.; Roy V.; Agrofoglio L.-A. (2010) Preparation of Cyclonucleosides. *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States), 110 (4), 1828-1856. DOI: 10.1021/cr900329y.
- 10 • Abed C.; Legrave N.; Dufies M.; Robert G.; Guérineau V.; Vacelet J.; Auburger P.; Amade P.; Mehiri M. (2011). A new hydroxylated nonaprenylhydroquinone from the Mediterranean marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. *Marine drugs*, 9 (7), 1210-1219.
- Makarieva T.-N.; Tabakmaher K.-M.; Guzii A.G.; Denisenko V.-A.; Dmitrenok P.- S.; Shubina L.-K.; Kuzmich A.-S.; Lee H.-S.; Stonik V.-A. (2011) Monanchocidins B-E: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge
- 15 *Monanchora pulchra*. *Journal of natural products*, 74 (9), 1952-1958.
- Lee Y.-J.; Lee D.-G.; Rho H.-S.; Krasokhin V.-B.; Shin H.-J.; Lee J.-S.; Lee H.-S. (2013). Cytotoxic 5-Hydroxyindole Alkaloids from the Marine Sponge *Scalarispongia* sp. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50 (6), 1400-1404. DOI: 10.1002/jhet. 1599.
- Rangel M.; Falkenberg M. (2015) An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3 (6), 421-428. DOI:10.12980/JCLM.3.2015JCLM-2015-0018.
- 20 • Lai K.-H.; Su J.-H.; Du Y.-C.; Weng M.-K.; Chou C.-H.; Lu M.-C.; Lai K.-H.; Su J.-H.; Du Y.-C.; Chou C.-H.; y col. (2016) Antileukemic Scalarane Sesterterpenoids and Meroditerpenoid from *Carteriospongia* (Phyllospongia) sp. Induce Apoptosis via Dual Inhibitory Effects on Topoisomerase II and Hsp90. *Scientific reports*, 6, 636170. DOI:10.1038/srep36170.
- 25

Breve descripción de la invención

- 30 Aquí se describe brevemente un procedimiento para la fabricación de una mezcla 1:1 de dos sustancias antileucémicas derivadas de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) (Figura 1). Dichas dos sustancias tienen las estructuras moleculares **2** y **3** (Figura 1) y son nuevas en la bibliografía. El procedimiento para producirlas comprende las siguientes fases:
- 35 a) Recoger biomasa de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba* (Figura 2).
- b) Desecar la biomasa en estufa de vacío (3 mm Hg, 60 °C, 48 horas).
- c) Extraer la biomasa por maceración en frío con cualquier disolvente aprótico volátil.
- 40 d) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor para obtener un primer residuo negruzco con aspecto de semisólido.
- e) Reextraer la biomasa en caliente mediante un aparato *Soxhlet* y con cualquier disolvente aprótico volátil.
- 45 f) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor para obtener un segundo residuo pardo semisólido, el cual se reúne con el obtenido en el punto (d) anterior.
- 50 g) El residuo total obtenido en el apartado (f) se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo en un matraz en forma de pera (matraz para rotavapor), se adiciona gel de sílice para cabezas cromatográficas y se evapora el disolvente en aparato rotavapor para obtener una "cabeza cromatográfica".

h) Se monta una columna cromatográfica con gel de sílice del tamaño adecuado a la cantidad de extracto obtenido en el apartado (f).

5 i) La columna cromatográfica anterior se eluye con hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo, cambiando la proporción de ambos disolventes cada litro de eluyente recogido.

10 j) Las fracciones que se eluyen de la columna cromatográfica con la mezcla hexano - acetato de etilo (30:70) se monitorizan por cromatografía en capa fina analítica para identificar la presencia de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**). Las fracciones que solo contienen (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) se reúnen y evaporan en un aparato rotavapor. El resultado es la obtención de la sustancia deseada (**1**) separada y purificada.

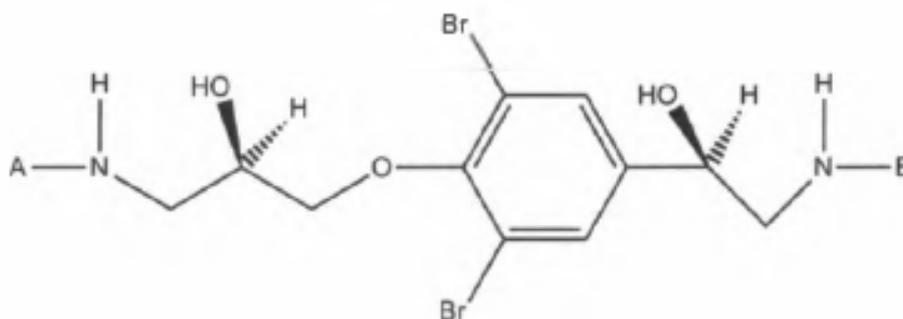
15 k) Las fracciones que en el apartado (j) resulten ser mezclas del compuesto (**1**) y otras sustancias en el análisis de TLC se recromatografían según el apartado (h) para obtener cantidades adicionales de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**).

20 l) La mezcla regioisomérica de los derivados **2 + 3** (en proporción 1:1) se obtiene a continuación por reacción de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) con cloruro de p-bromobenzoilo en piridina. Tras extraerlo, el producto se disuelve en diclorometano en un matraz en forma de pera para rotavapor, se adiciona gel de sílice, y se lleva a sequedad. La cabeza cromatográfica así obtenida se aplica a una columna cromatográfica húmeda que contiene gel de sílice. La columna se eluye con mezclas de hexano y acetona incrementando de forma progresiva la proporción de acetona. La mezcla de estereoisómeros **2+3** se identifica por cromatografía en capa fina analítica de gel de sílice eluyendo con hexano-acetona 6:4 y revelando con óleum.

30 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso del producto obtenido de acuerdo con el procedimiento antes mencionado –la mezcla regioisomérica de los derivados sintéticos **2 y 3** (Figura 1)- en terapias diversas debido a que presenta actividad citotóxica frente a líneas celulares de leucemia humana, esto es, actividad antileucémica.

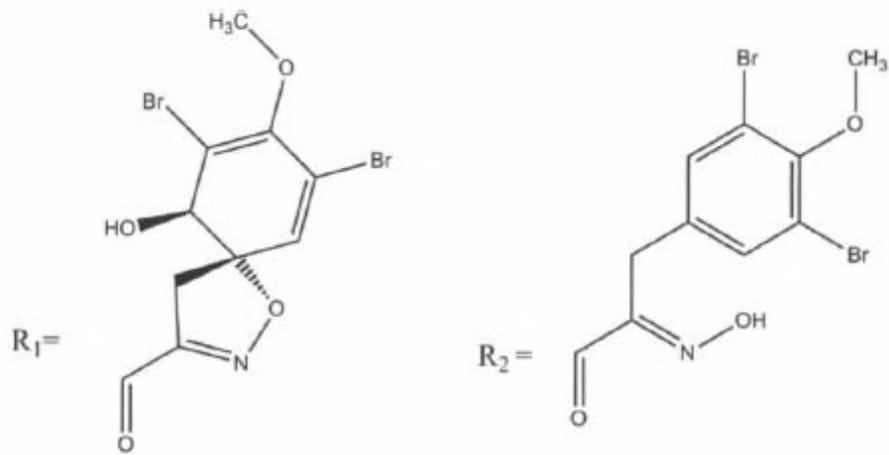
Descripción de las figuras

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

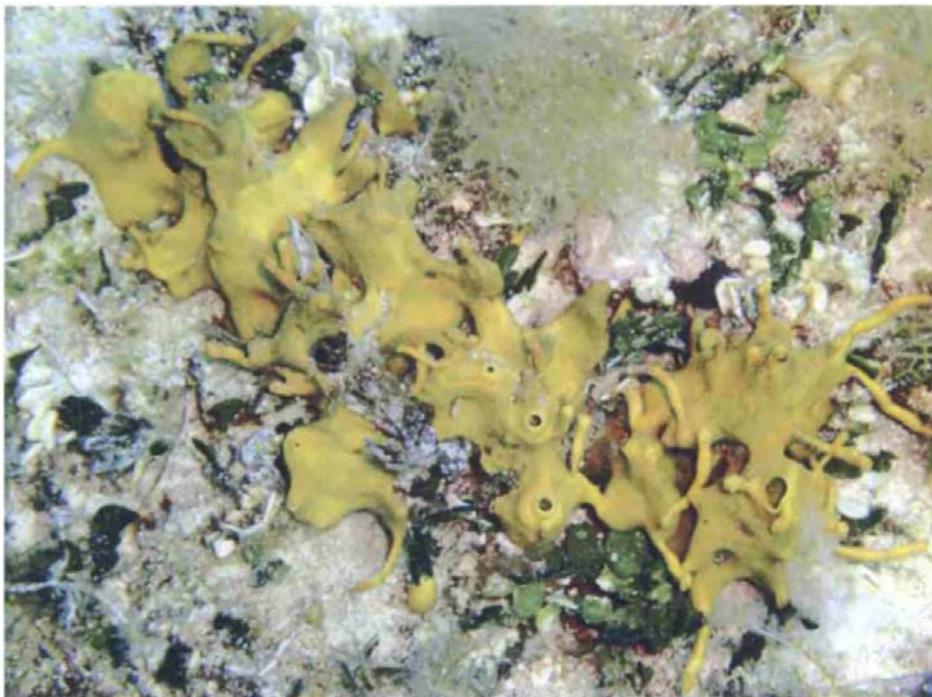


40

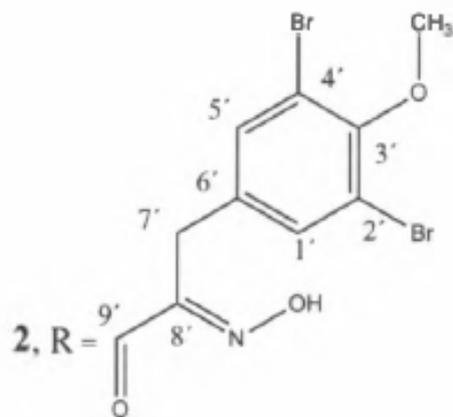
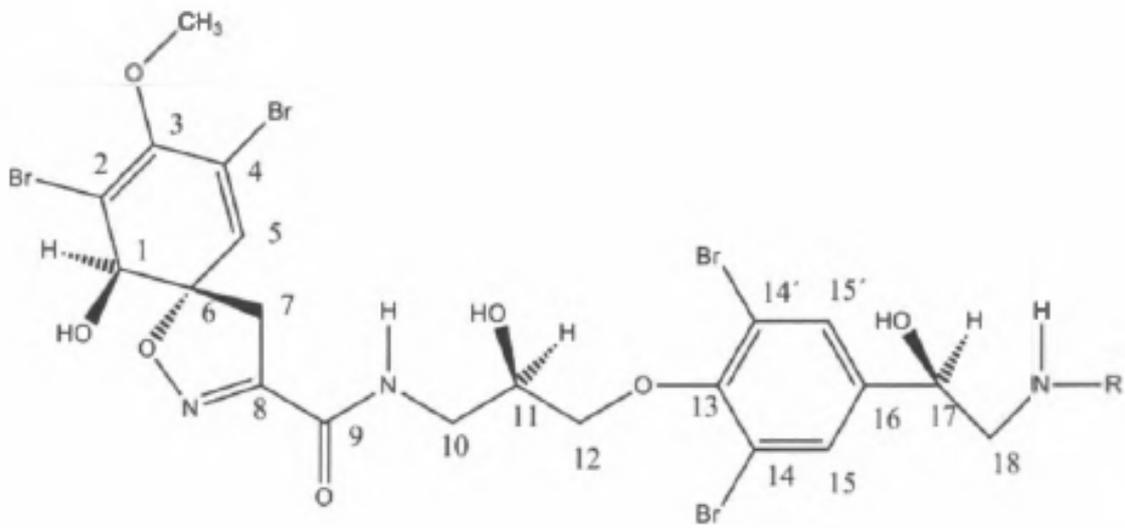
- 1**, A=B=R₁
2, A=R₁, B=R₂
3, A=R₂, B=R₁



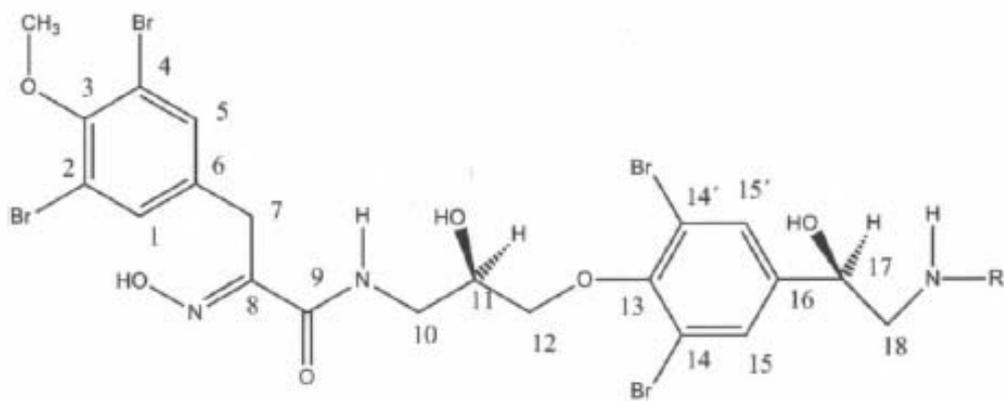
5 Figura 1.- Muestra las estructuras de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) y sus derivados (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**). Para una mezcla 1:1 de las sustancias **2** y **3** se reivindica el procedimiento para producirla, así como su uso en terapias diversas por su actividad antileucémica.



10 Figura 2.- Muestra la morfología de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*, cuya biomasa es la materia prima que sirve para producir la mezcla 1:1 de las sustancias **2** y **3**.



5 Figura 3.- Muestra la estructura de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) con enumeración de su esqueleto carbonado.



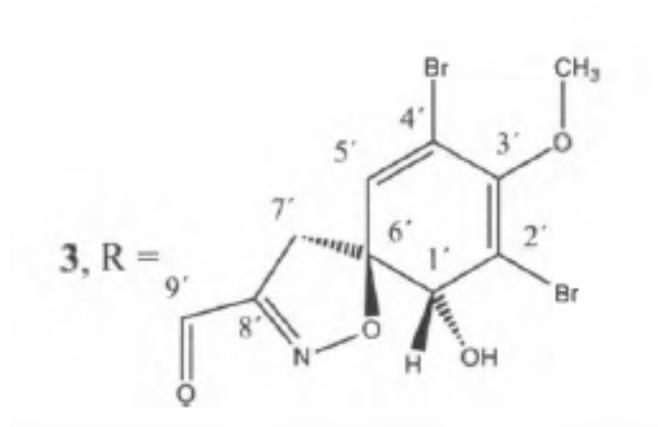


Figura 4.- Muestra la estructura de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) con enumeración de su esqueleto carbonado.

5

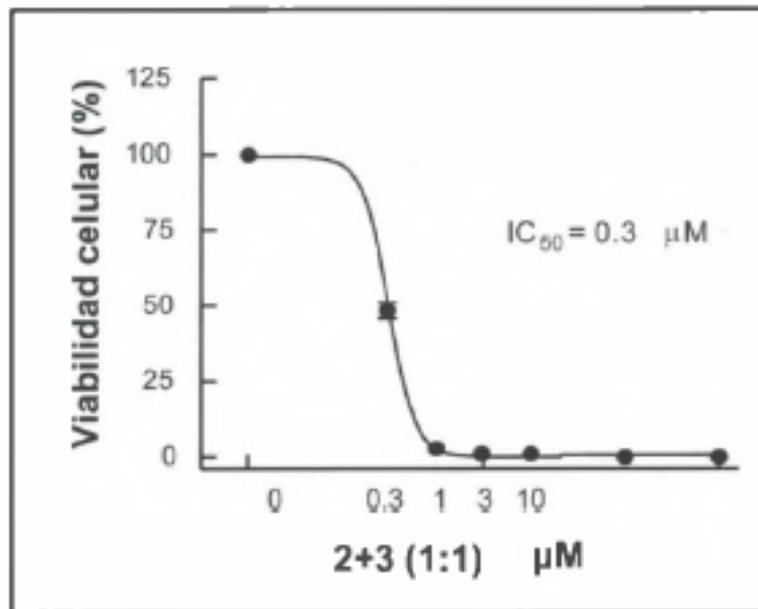


Figura 5.- Muestra una de las curvas de viabilidad de las células HL-60 frente a la concentración de la mezcla 1:1 de los dos derivados regioisoméricos **2** y **3**.

10

Descripción detallada de la invención

Aquí se describe un procedimiento para la fabricación de dos sustancias antileucémicas derivadas de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) (Figura 1). Dichas dos sustancias tienen las estructuras moleculares **2** y **3** (Figuras 1, 3 y 4) y son nuevas en la bibliografía. El procedimiento para producirlas **comprende** las siguientes fases:

15

a) Recoger biomasa de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*) que crece de forma natural en el litoral de las Islas Canarias entre 10 y 30 metros de profundidad (Figura 2).

20

b) Desecar la biomasa en estufa de vacío (3 mm Hg, 60 °C, 48 horas).

c) Extraer la biomasa por maceración en frío. Dicha extracción se puede realizar con cualquier disolvente aprótico volátil (acetona, acetato de etilo, diclorometano, etc), de bajo punto de

ebullición (<70 °C). Nunca usar metanol ni etanol, pues dan reacciones indeseadas con las sustancias bioactivas que se desea extraer.

5 d) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor a 60 °C en el baño de agua y a 3 mm de Hg de vacío para obtener un primer residuo negruzco con aspecto de semisólido.

10 e) Reextraer la biomasa en caliente mediante un aparato *Soxhlet* (al menos diez sifonadas). De nuevo dicha extracción se puede realizar con cualquier disolvente aprótico volátil (acetona, acetato de etilo, diclorometano), de bajo punto de ebullición (<70 °C). Nunca usar metanol ni etanol, pues dan reacciones indeseadas con las sustancias que se desea extraer. El tamaño del aparato *Soxhlet* y la cantidad de disolvente se adaptan a la cantidad de biomasa, según la cantidad de extracto que se desea obtener.

15 f) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor a 60 °C en el baño de agua y a 3 mm de Hg de vacío para obtener un segundo residuo pardo semisólido, el cual se reúne con el obtenido en el punto (d) anterior. El rendimiento en el residuo total (el de los dos residuos reunidos) suele oscilar en el intervalo 2-5 % (w/w de biomasa seca).

20 g) El residuo total obtenido en el apartado (f) se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo en un matraz en forma de pera (matraz para rotavapor) y se adiciona gel de sílice para cabezas cromatográficas (gel de sílice para cromatografía en columna de 0,06-0,2 mm de tamaño de grano) en la proporción 2 gramos de gel por gramo de extracto, y se evapora el disolvente en aparato rotavapor (3 mm Hg, 60 °C) para obtener una "cabeza cromatográfica".

25 h) Se monta una columna cromatográfica con gel de sílice para columna cromatográfica con tamaño de grano de 0,04-0,06 mm. Las dimensiones de la columna dependen de la cantidad de extracto obtenido en el apartado (f), lo cual es lo mismo que decir que del tamaño adecuado a la cantidad de "cabeza cromatográfica" obtenida en el apartado (g). Como referencia, úsese la siguiente proporción: 25 gramos de gel de sílice por gramo de residuo total obtenido en (f).

30 i) La columna cromatográfica anterior se eluye con hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20,... 0:100), cambiando la polaridad (esto es la proporción) cada litro de eluyente recogido. Las fracciones que se recojan tendrán un volumen proporcional al del tamaño de la columna cromatográfica.

35 j) Las fracciones que se eluyen de la columna cromatográfica con la mezcla hexano - acetato de etilo (30:70) se monitorizan por cromatografía en capa fina analítica (gel de sílice, 0.25 mm, hexano: acetona 6:4 v/v) para identificar la presencia de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) (color marrón-verdoso, $R_f = 0.74$). Las fracciones que solo contienen (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) se reúnen y evaporan en un aparato rotavapor. El resultado del procedimiento es la obtención de la sustancia deseada (**1**) separada y purificada.

40 k) Las fracciones que en el apartado (j) resulten ser mezclas del compuesto (**1**) y otras sustancias en el análisis de TLC se pueden recromatografiar según el apartado (h) para obtener cantidades adicionales de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**).

45 l) La mezcla regioisomérica de los derivados **2 + 3** (en proporción 1:1) se obtiene a continuación por reacción de 3.00 gramos de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) con 3.58 g de cloruro de p-bromobenzoilo y 15 mL de piridina, refrigerando con un baño de hielo. Tras 24 horas de reacción se adicionan 10 g de hielo machacado y 10 mL de agua. Luego se extrae tres veces en un embudo de decantación con 30 mL de éter dietílico (x3) y los extractos se lavan con HCl 2N primero y con una disolución al 5% de NaHCO₃ después. La posterior desecación sobre sulfato sódico anhidro seguido de filtración y concentración en rotavapor rinde 3.394 g del producto de reacción. Este último producto se disuelve en 150 mL de

5 diclorometano en un matraz en forma de pera para rotavapor, se adicionan 10 g de gel de sílice para columna cromatográfica (de 0,06-0,2 mm de tamaño de grano), se mezcla bien y se lleva a sequedad. La cabeza cromatográfica así obtenida se aplica a una columna cromatográfica húmeda que contiene 93 g de gel de sílice para columna cromatográfica de 0,04-0,06 mm de tamaño de grano. La columna se eluye con mezclas de hexano y acetona 95:5, 90:10, 85:15, etc. La mezcla de estereoisómeros **2+3** se identifica por cromatografía en capa fina analítica de gel de sílice eluyendo con hexano-acetona 6:4 y revelando con óleum (manchas marrón-verdosas de $R_f=0.76$). Los datos espectroscópicos de las sustancias **2** y **3** se dan en las Tablas 1 y 2.

10 Las proporciones de los materiales utilizados en este procedimiento son:

- Biomasa de la esponja marina [*Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*] entre un 10.50 % y un 11.50 %
- Hexano entre un 38.00 % y un 38.80 %
- 15 – Acetona entre un 21.5 % y un 22.30 %
- Acetato de etilo entre un 34.10 % y un 35.00 %
- Diclorometano entre un 0.80 % y un 1.20 %
- Gel de sílice para cromatografía en columna (0.06-0.2 mm) entre un 0.14 % y un 0.18 %
- Gel de sílice para cromatografía en columna (0.04-0.06 mm) entre un 1.60 % y un 2.10 %
- 20 – Cloruro de p-bromobenzoilo entre un 0.01 % y un 0.03 %
- Piridina entre un 0.06 % y un 0.10 %
- Eter dietílico entre un 0.30 % y un 0.40 %
- Ácido clorhídrico acuoso 2N entre un 0.25 % y un 0.30 %
- 25 – Bicarbonato sódico acuoso al 5% (w/w) entre un 0.20 % y un 0.35 %
- Sulfato sódico anhidro entre un 0.04 % y un 0.06 %

También se describe el producto obtenido de acuerdo con el procedimiento antes mencionado **caracterizado** porque el componente principal es una mezcla (1:1) de los regioisómeros sintéticos **2** y **3** (Figuras 1, 3 y 4), mezcla que es citotóxica frente a diversas líneas celulares de leucemia humana. Características como constantes cromatográficas, datos espectroscópicos y datos de actividad antileucémica se dan en los siguientes apartados (m-p).

35 m) Un compuesto obtenido según el procedimiento anterior seleccionado del grupo consiste en:

40 El antileucémico (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**, Figuras 1 y 3).- Resulta ser un polvo pardo que presenta en TLC (gel de sílice, 0.25 mm espesor) un $R_f = 0.74$ cuando se eluye con hexano - acetona (6:4) y se revela sobre la capa fina (óleum, 120 °C) a luz del día como una mancha de color pardo-verdoso (Tabla 3). El espectro de $^1\text{H-RMN}$ a 300 MHz (Tabla 1) y el de $^{13}\text{C-RMN}$ a 75 MHz (Tabla 1), enriquecidos por experimentos en dos dimensiones nos confirman que este regioisómero posee la estructura **2** (Figuras 1 y 3), fórmula que es nueva en la bibliografía.

Posición (Figura 3)	$^1\text{H-RMN}$	$^{13}\text{C-RMN}$
1	3.91 (1H, s)	73.53 (CH)
2	---	112.50 (C)
3	---	147.70 (C)
4	---	121.10 (C)
5	6.56 (1H, s)	131.10 (CH)
6	---	90.70 (C)

7	Solapado	38.50 (CH ₂)
8	---	153.50 (C)
9	---	160.20 (C)
10	Solapado	42.36 (CH ₂)
11	4.06 (1H, m)	67.99 (CH)
12	3.83 (2H, m)	75.35 (CH ₂)
13	---	151.60 (C)
14,14'	---	117.30 (C)
15,15'	7.59 (2H, s)	130.50 (CH)
16	---	141.50 (C)
17	4.68 (1H, m)	69.34 (CH)
18	3.30 (2H, m)	46.25 (CH ₂)
1', 5'	7.81 (2H, s)	146.61; 146.51 (CH)
2', 4'	---	126.95 (C)
3'	---	154.97 (C)
6'	---	131.21 (C)
7'	3.17 (2H, s)	42.96 (CH ₂)
8'	---	158.44 (C)
9'	---	171.64 (C)
OCH ₃	3.63 (6H, s)	59.59 (CH ₃)
1-OH	6.30 (s ancho)	---
11-OH	5.27 (s ancho)	---
17-OH	5.74 (s ancho)	---
NH	8.41 (1H, t)	---
NH	8.46 (1H, t)	---
=N-OH	3.34 (1H, solapado)	---

Tabla 1.- Espectros de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) en DMSO-D₆.

- 5 n) Otro compuesto obtenido según el procedimiento anterior seleccionado del grupo consiste en:

10 El antileucémico (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**, Figuras 1 y 4). Resulta ser un polvo pardo que presenta en TLC (gel de sílice, 0.25 mm espesor) un R_f = 0.74 cuando se eluye con hexano - acetona (6:4) y se revela sobre la capa fina (óleum, 120 °C) a la luz del día como una mancha de color pardo-verdoso (Tabla 3). El espectro de ¹H-RMN a 300 MHz (Tabla 2) y el de ¹³C-RMN a 75 MHz (Tabla 2), enriquecidos por experimentos en dos dimensiones nos confirman que este regioisómero posee la estructura **3** (Figuras 1 y 4), la cual es nueva en la bibliografía.

15

Posición (Figura 4)	¹ H-RMN	¹³ C-RMN
1,5	7.81 (2H, s)	146.61; 146.51 (CH)
2,4	---	126.91; 126.98 (C)
3	---	154.92 (C)
6	---	131.21 (C)
7	3.17 (2H, s)	42.96 (CH ₂)
8	---	158.50 (C)
9	---	171.64 (C)
10	Solapado	42.36 (CH ₂)
11	4.06 (1H, m)	67.99 (CH)
12	3.83 (2H, m)	75.35 (CH ₂)
13	---	151.60 (C)
14,14'	---	117.30 (C)
15,15'	7.59 (2H, s)	130.50 (CH)
16	---	141.50 (C)
17	4.68 (1H, s)	69.34 (CH)
18	3.30 (2H, m)	46.25 (CH ₂)
1'	3.91 (1H, s)	73.48 (CH)
2'	---	112.50 (C)
3'	---	147.7 (C)
4'	---	121.10 (C)
5'	6.59 (1H, s)	131.10 (CH)
6'	---	90.70 (C)
7'	Solapado	38.50 (CH ₂)
8'	---	153.50 (C)
9'	---	160.20 (C)
OCH ₃	3.63 (6H, s)	59.59 (CH ₃)
1'-OH	6.40 (s ancho)	---
11-OH	5.27 (s ancho)	---
17-OH	5.74 (s ancho)	---
NH	8.41 (1H, t)	---
NH	8.46 (1H, t)	---
=N-OH	3.34 (solapado)	---

Tabla 2.- Espectros de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) en DMSO-D₆.

5

o) Análisis por TLC de ambas sustancias bioactivas.

Las dos sustancias bioactivas, (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) pueden analizarse por la técnica cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor según se describe en la Tabla 3.

Compuesto	R _f (x100); color
(11R,17R)-11- <i>epi</i> -fistularina-3 (1)	74; marrón-verdoso
(11R,17R)-11- <i>epi</i> -fistularina-4 (2)	76; marrón-verdoso
(11R,17R)-11- <i>epi</i> -fistularina-5 (3)	76; marrón-verdoso

5 Tabla 3.- Análisis por cromatografía en capa fina del metabolito de *Aplysina aerophoba* (**1**) y sus derivados sintéticos (**2** y **3**). El cromatograma se desarrolla utilizando el eluyente hexano: acetona; 6:4, v/v y se revela con óleum. Los factores de retención (R_f) corresponden a un experimento realizado a 20 °C.

10 p) Actividad antileucémica de una mezcla 1:1 de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**).

15 Una mezcla 1:1 de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) se aplicaron a cultivos de células de leucemia humana, HL-60 y U-937 resultando actividad citotóxica, con IC₅₀ de 0.81 μM y 1.0 μM respectivamente (Figura 5, Tabla 4). En las dos líneas celulares se hicieron 3 experimentos de MTT independientes.

20 Las células de leucemia humana HL-60 y U-937 crecieron en RPMI 1640 conteniendo L-glutamina 2 mM suplementada con suero de vacuno fetal inactivado al calor, al 10 % (v/v). Estas líneas celulares se obtuvieron a partir de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Braunschweig, Alemania).

25 La acción de una mezcla 1:1 de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) sobre la viabilidad de las líneas celulares de leucemia humana HL-60 y U-937 se evaluó usando el ensayo colorimétrico del bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Como se ha descrito previamente [Berridge MV, Herst PM, and Tan AS. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152], el MTT se reduce por la reductasa mitocondrial contenida en las células a formazano, el cual es un compuesto de color púrpura. Brevemente, sobre platos de microcultivo de 96 pozos, con varias concentraciones de los compuestos, se sembraron 5x10³ células en crecimiento exponencial. Tras la adición de MTT (0.5 mgxL⁻¹), las células se incubaron a 37 °C durante 4 h. Se adicionó dodecil-sulfatosódico (SDS) (10 % w/v en HCl 0.05 M) a los pozos y luego se incubaron toda la noche, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La absorbancia se midió a 562 nm. Las concentraciones que indujeron un 50% de inhibición del crecimiento celular (IC₅₀) se determinaron gráficamente para cada experimento por medio de una regresión no lineal mediante el software Prism™ 4.0 (GraphPad). Los valores que se dan (Tabla 4) son las medias obtenidas después de, al menos, tres experimentos independientes y tres medidas en cada uno. En este ensayo se usó etopósido como control positivo (Los IC₅₀ se dan para las dos líneas celulares en la Tabla 4).

Compuesto	IC ₅₀ , μM	
	HL-60	U-937
Mezcla 1:1 de (11R,17R)-11- <i>epi</i> -fistularina-4 (2) y (11R,17R)-11- <i>epi</i> -fistularina-5 (3)	0.81	1.00
Etopósido	0.3	1.4

5 Tabla 4. Efectos de la mezcla 1:1 de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**) sobre el crecimiento de tres líneas celulares de leucemia humana. Las células se cultivaron durante 72 horas, y los valores IC₅₀ se dedujeron a partir de gráficos como el
10
15
mostrado en la Figura 5. Los datos mostrados representan el valor medio de tres experimentos independientes con tres determinaciones en cada uno. El etopósido se usó como control positivo.

10 Realización preferente de la invención

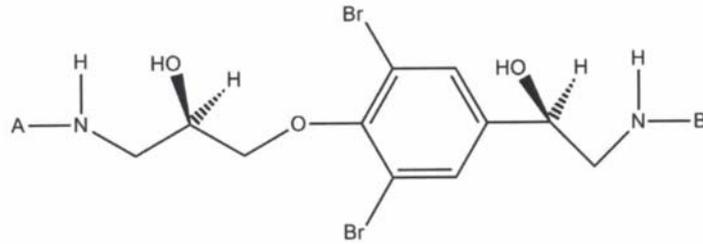
Una realización preferente de la invención se puede resumir en los siguientes pasos:

- 15 a) Recoger 2 kg de biomasa de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*) que crece de forma natural en el litoral de las Islas Canarias entre 10 y 30 metros de profundidad (Figura 2).
- b) Desecar la biomasa en estufa de vacío (3 mm Hg, 60 °C, 48 horas).
- 20 c) Extraer la biomasa por maceración en frío con 5 L de acetona.
- d) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor a 60 °C en el baño de agua y a 3 mm de Hg de vacío para obtener un primer residuo negruzco con aspecto de semisólido.
- 25 e) Reextraer la biomasa en caliente mediante un aparato *Soxhlet* (al menos diez sifonadas). De nuevo dicha extracción se realiza con acetona. El tamaño del aparato *Soxhlet* puede ser tal que disponga de un habitáculo para el cartucho contenedor de biomasa de unos 200 mL y la cantidad de disolvente, unos 5 L (aplicado en sucesivas extracciones de unos 500 mL cada una).
- 30 f) Eliminar el disolvente que contiene los diferentes extractos en un aparato rotavapor, a 60 °C en el baño de agua, y a 3 mm de Hg de vacío para obtener un segundo residuo pardo semisólido, el cual se reúne con el obtenido en el punto (d) anterior. El rendimiento en el residuo total (el de los dos residuos reunidos) oscila en el intervalo 2- 5 % (w/w de biomasa seca).
- 35 g) Disolver el residuo total obtenido en el apartado (f) en la mínima cantidad de cloroformo, en un matraz en forma de pera (matraz para rotavapor), adicionar gel de sílice para cromatografía en columna (0,06-0,2 mm de tamaño de grano) en la proporción 2 gramos de gel por gramo de extracto, y evaporar el disolvente en aparato rotavapor (3 mm Hg, 60 °C) para obtener una
40 "cabeza cromatográfica".
- h) Montar una columna cromatográfica con gel de sílice para cromatografía en columna (0,04-0,06 mm de tamaño de grano). Las dimensiones de la columna se adaptan a la cantidad de extracto obtenido en el apartado (f), lo cual es lo mismo que decir que del tamaño adecuado a la cantidad de "cabeza cromatográfica" obtenida en el apartado (g). Como referencia, úsese la siguiente proporción: 25 gramos de gel de sílice para columna cromatográfica (0,04-0,06 mm) por gramo de residuo total obtenido en (f).
- 45 i) Eluir la columna cromatográfica anterior con hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20,... 0:100), cambiando la polaridad (esto es la proporción) cada litro de eluyente recogido. Las fracciones que se recojan tendrán un volumen de 100 mL cada una.
- 50

- 5 j) Monitorizar las fracciones que se eluyen de la columna cromatográfica con la mezcla hexano - acetato de etilo (30:70) por cromatografía en capa fina analítica (gel de sílice, 0.25 mm, hexano: acetona 6:4 v/v) para identificar la presencia de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) (color marrón-verdoso, $R_f = 0.74$). Las fracciones que solo contienen dicho producto (**1**) se reúnen y evaporan en un aparato rotavapor. El resultado del procedimiento es la obtención de la sustancia deseada (**1**) separada y purificada.
- 10 k) Recromatografiar las fracciones que en el apartado (j) resulten ser mezclas del compuesto (**1**) y otras sustancias (en el análisis de TLC) según el apartado (h) para obtener cantidades adicionales de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**).
- 15 l) Obtener la mezcla regioisomérica de los derivados **2 + 3** (en proporción 1:1) por reacción de 3.00 gramos de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) con 3.58 g de cloruro de p-bromobenzoilo y 15 mL de piridina, refrigerando con un baño de hielo. Tras 24 horas de reacción se adicionan 10 g de hielo machacado y 10 mL de agua. Luego se extrae tres veces en un embudo de decantación con 30 mL de éter dietílico (x3) y los extractos se lavan con HCl 2N primero y con una disolución al 5% de NaHCO₃ después. La posterior desecación sobre sulfato sódico anhidro seguido de filtración y concentración en rotavapor rinde 3.394 g del producto de reacción. Este último producto se disuelve en 150 mL de diclorometano en un matraz en forma de pera para rotavapor, se adicionan 10 g de gel de sílice (0,06-0,2 mm), se mezcla bien y se lleva a sequedad. La cabeza cromatográfica así obtenida se aplica a una columna cromatográfica que contiene 93 g de gel de sílice (0,04-0,06 mm). La columna se eluye con mezclas de hexano y acetona 95:5, 90:10, 85:15, etc. La mezcla de regioisómeros **2 + 3** se identifica por cromatografía en capa fina analítica de gel de sílice eluyendo con hexano-acetona 20 6:4 y revelando con óleum (manchas marrón-verdosas de $R_f=0.76$). El producto final es un sólido pardo y amorfo cuyos datos espectroscópicos (espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN) son la superposición de los correspondientes espectros de los dos regioisómeros descritos en las 25 Tablas 1 y 2, los cuales se refieren a las Figuras 3 y 4.
- 30 m) Usar el producto obtenido en el apartado (l) en aplicaciones biomédicas diversas debido a que es citotóxico frente a diversas líneas celulares de leucemia humana.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la fabricación de una mezcla de dos sustancias antileucémicas, (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**), el cual **comprende** las siguientes fases:
- a) Recoger 2 kg de biomasa de la esponja marina *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*.
- 10 b) Desecar la biomasa en estufa de vacío (3 mm Hg, 60 °C, 48 horas).
- c) Extraer la biomasa por maceración en frío con un disolvente aprótico.
- 15 d) Eliminar el disolvente en un aparato rotavapor para obtener un primer residuo negruzco con aspecto de semisólido.
- e) Reextraer la biomasa en caliente, mediante un aparato *Soxhlet*, con el mismo disolvente aprótico.
- 20 f) Eliminar el disolvente que contiene los diferentes extractos en un aparato rotavapor, para obtener un segundo residuo pardo semisólido, el cual se reúne con el obtenido en el punto (d) anterior.
- 25 g) Redisolver el residuo total obtenido en el apartado (f) en la mínima cantidad de cloroformo, en un matraz para rotavapor, adicionar gel de sílice para cromatografía en columna (0,06-0,2 mm de tamaño de grano) en la proporción 2 gramos de gel por gramo de extracto, y evaporar el disolvente en aparato rotavapor (3 mm Hg, 60 °C) para obtener una "cabeza cromatográfica".
- 30 h) Montar una columna cromatográfica con gel de sílice para cromatografía en columna (0,04-0,06 mm) de dimensiones adaptadas a la cantidad de extracto obtenido en el apartado (f) (la proporción ha de ser de 25 gramos de gel de sílice para columna cromatográfica (0,04-0,06 mm) por gramo de residuo total obtenido en (f).
- 35 i) Eluir la columna cromatográfica anterior con hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20,... 0:100), cambiando la proporción cada litro de disolvente eluido y recogiendo fracciones cromatográficas de 100 mL.
- 40 j) Monitorizar por cromatografía en capa fina analítica (gel de sílice, 0.25 mm de espesor, hexano: acetona 6:4 v/v) las fracciones que se eluyen de la columna cromatográfica para identificar la presencia de (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) (color marrón-verdoso, $R_f = 0.74$), reuniendo y evaporando en rotavapor las fracciones que solo contienen dicho producto, para obtener la sustancia deseada (**1**) separada y purificada.
- 45 k) Recromatografiar las fracciones que en el apartado (j) resulten ser mezclas del compuesto (**1**) y otras sustancias (en el análisis de TLC), según el apartado (h), para obtener cantidades adicionales de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**).
- 50 l) Obtener la mezcla regioisomérica de los derivados **2 + 3** (en proporción 1:1) por reacción de la (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-3 (**1**) con el cloruro de p-bromobenzoilo y piridina en frío, seguido de extracción y cromatografía en columna.
- 55 2.- Uso de la mezcla (1:1) de dos sustancias regioisoméricas [(11R,17R)-11-*epi*-fistularina-4 (**2**) y (11R,17R)-11-*epi*-fistularina-5 (**3**)], obtenida por el procedimiento descrito en la reivindicación 1, como producto antileucémico.



- 1**, A=B=R₁
2, A=R₁, B=R₂
3, A=R₂, B=R₁

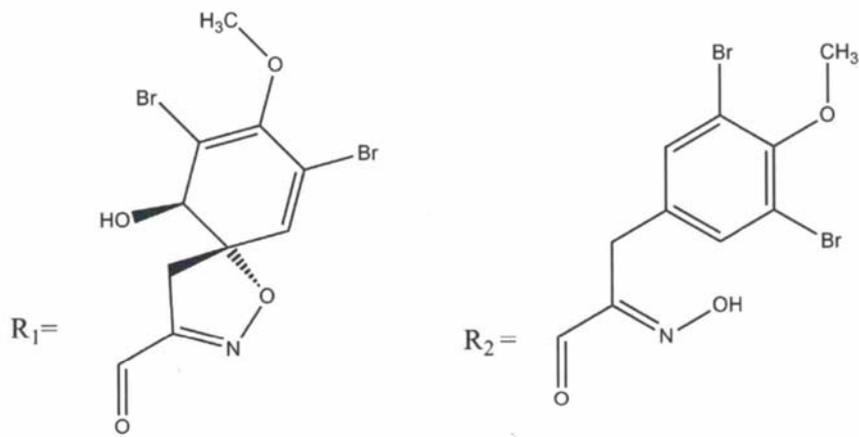


Figura 1



Figura 2

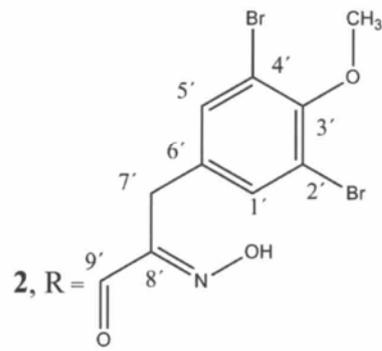
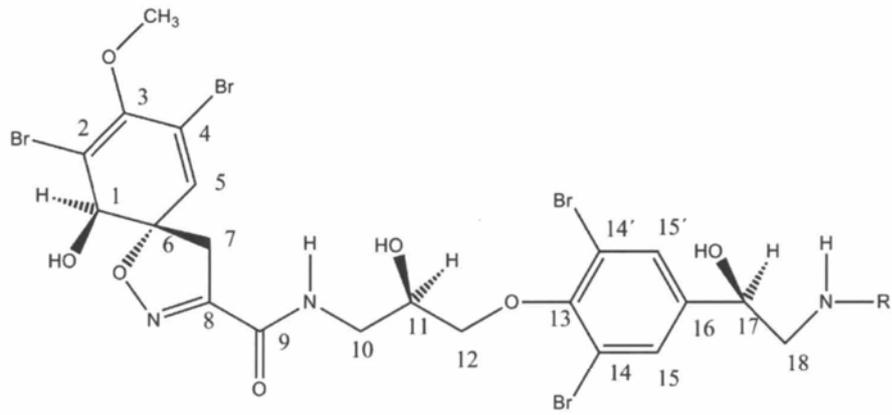


Figura 3

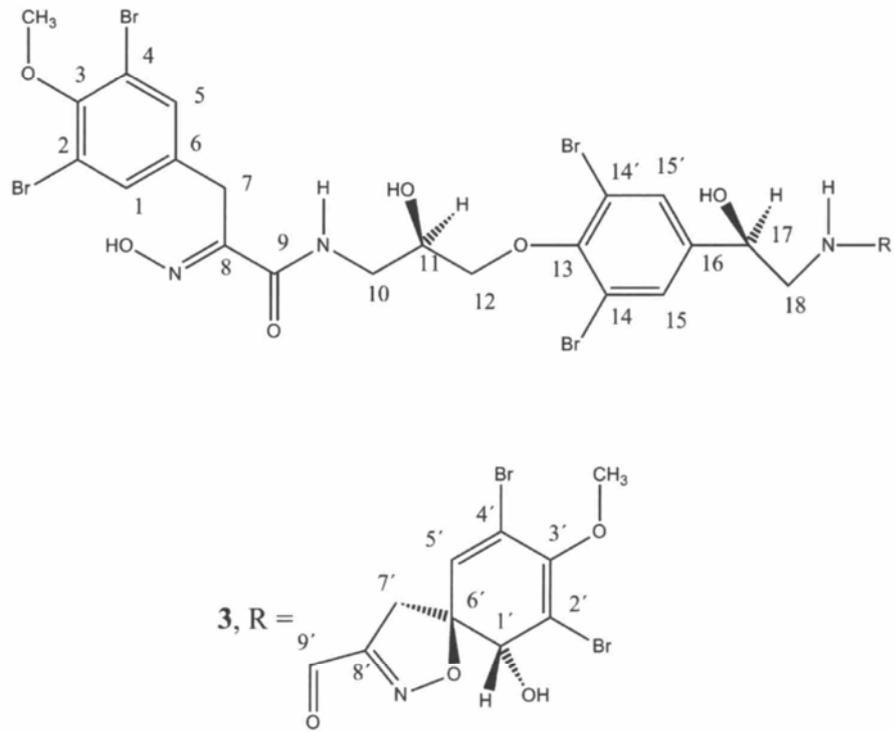


Figura 4

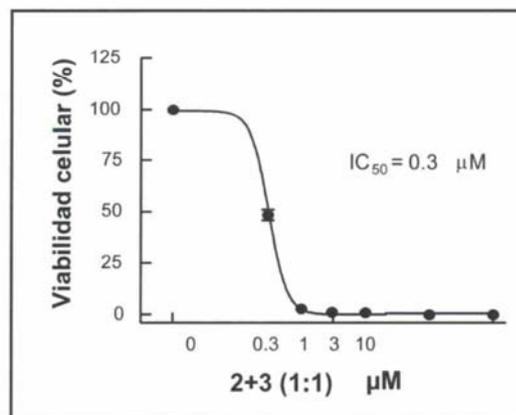


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201700216

22 Fecha de presentación de la solicitud: 02.03.2017

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
A	G M KONIG et al. "Agelorins a and b and 11-epi-fistularin-3, three new antibacterial fistularin-3 derivatives from the tropical marine sponge <i>Agelas oroides</i> ". Heterocycles 1993, vol. 36, páginas 1351-1358. página 1355 compuesto 3	1
A	P CIMINIELLO et al. "Chemistry of verongida sponges viii. bromocompounds from the mediterranean sponges <i>Aplysina aerophoba</i> and <i>Aplysina cavernicola</i> ". Tetrahedron 1997, vol. 53, páginas 6565-6572. página 6567	1
A	S P GUNASEKERA et al. "Fistularin-3 and 11-ketofistularin-3. feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge <i>Aplysina archeri</i> ". Journal Natural Products 1992, vol. 55, páginas 509-512	2

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
05.05.2017

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D261/20 (2006.01)

A61K35/655 (2015.01)

A61P35/02 (2006.01)

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

C07D, 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, ESPACENET, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-2	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-2	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	G M KONIG et al., Heterocycles 1993, vol. 36, páginas 1351-1358	1993
D02	P CIMINIELLO et al., Tetrahedron 1997, vol 53 páginas 6565-6572	1997
D03	S P GUNASEKERA et al., Journal Natural Products 1992, vol. 55, páginas 509-512	1992

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

La solicitud se refiere (reivindicación 1) a un procedimiento para obtener dos compuestos regioisómeros derivados de la (11R, 17R)-11-epi-fistularina-3 al reaccionar con cloruro de p-bromobenzoilo y piridina, estos compuestos se denominan (11R, 17R)-11-epi-fistularina-4 (fórmula 2) y (11R, 17R)-11-epi-fistularina-5 (fórmula 3) y se obtienen como mezcla 1:1. La reivindicación 2 reivindica esta mezcla como producto antileucémico.

El documento D1 divulga, ver página 1355 compuesto 3, la 11-epi-fistularina-3 aislada de la esponja *Agelas oroides* y con actividad antibacteriana y el documento D2 divulga bromocompuestos metabolitos secundarios de *Aplysina aerophoba*, ver página 6567, compuesto 15. Ninguno de ellos divulga productos de reacción de la 11-epi-fistularina-3.

El documento D3 divulga dos compuestos aislados de *Aplysina archeri*, fistularina-3 y 11-cetofistularina-3 con actividad antileucémica.

Los compuestos de fórmulas 2 y 3 de la solicitud no se han encontrado divulgados anteriormente, por tanto son nuevos, así como su actividad, además para un técnico en la materia no es previsible que la mezcla producto de reacción tenga actividad frente a la leucemia en base al estado de la técnica anterior.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 1 y 2 de la solicitud cumplen las condiciones de novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.