

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 105**

51 Int. Cl.:

C07D 493/14 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2014 PCT/AU2014/050018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14169356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2014 E 14784998 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2986615**

54 Título: **Métodos y composiciones para la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

18.04.2013 AU 2013901359

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

31.05.2019

73 Titular/es:

**QBIOTICS LIMITED (100.0%)
7 Penda Street
Yungaburra, QLD 4872, AU**

72 Inventor/es:

**REDDELL, PAUL WARREN;
GORDON, VICTORIA ANNE;
MOSELEY, RYAN;
STEADMAN, ROBERT;
MOSES, RACHAEL LOUISE;
BOYLE, GLEN MATHEW y
PARSONS, PETER GORDON**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 715 105 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

Métodos y composiciones para la cicatrización de heridas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos epoxi-tiglicianos y a su uso para promover la cicatrización de heridas. En realizaciones particulares, los compuestos epoxi-tiglicianos son compuestos epoxi-tigliciaen-3-ona. Métodos para inducir la promoción de la cicatrización de heridas, así como métodos de reducción de cicatrices y mejora de los resultados cosméticos de cicatrización de heridas al reducir los cambios en la pigmentación de la piel y o mejorando el nuevo crecimiento del pelo y se describen métodos para prevenir la cicatrización excesiva. También se describen los compuestos y composiciones para uso en la cicatrización de heridas.

10 Antecedentes de la invención

15 La cicatrización de heridas es un procedimiento complejo en el que la piel u otro órgano o tejido se repara después de una lesión. En la piel normal, la epidermis (capa más externa) y la dermis (capa interna o más profunda) existen en un estado de equilibrio estable, formando una barrera protectora contra el entorno externo. Una vez que se rompe la barrera protectora, el procedimiento fisiológico normal de la cicatrización de heridas se pone en marcha de inmediato. El modelo clásico de la cicatrización de heridas se divide en tres fases secuenciales, aunque superpuestas, a saber: inflamatoria, proliferativa y, finalmente, remodelación.

20 Durante la fase inflamatoria de la cicatrización de heridas hay un reclutamiento activo de neutrófilos y luego monocitos de la vasculatura circundante en la herida. Los neutrófilos son esenciales para el control inicial y la destrucción de infecciones bacterianas y micóticas en la herida. Los monocitos se convierten en macrófagos cuando entran en la herida, donde desempeñan numerosas funciones a lo largo de la resolución de la herida, incluida la fagocitosis inicial y la limpieza de la matriz y los residuos celulares. La liberación de enzimas, citoquinas y factores de crecimiento tanto por los neutrófilos como por los macrófagos en la herida puede ejercer una profunda influencia sobre otras células dentro de la herida y el tejido circundante. Por ejemplo, los macrófagos secretan colagenasas que desbridan la herida; interleucinas y factor de necrosis tumoral (TNF), que estimulan los fibroblastos y promueven la angiogénesis; y factor de crecimiento transformante (TGF), que estimula los queratinocitos. También secretan el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento endotelial vascular que inician la formación de tejido de granulación y, de este modo, inician la transición a las fases de proliferación y remodelación. Una fase inflamatoria rápida y robusta, pero transitoria, a menudo se asocia con buenos resultados de la cicatrización de heridas.

30 La segunda etapa de la cicatrización de heridas implica la proliferación y migración celular y la contracción de la herida. Esto implica acciones tomadas por las células dentro de la herida para lograr el cierre de la brecha de la herida y reponer el tejido perdido. La migración y la proliferación de queratinocitos es fundamental para lograr la reepitelización de la herida, mientras que la reconstitución de la dermis subyacente resulta de la migración, proliferación y diferenciación de los fibroblastos que ayudan a cerrar la herida y contribuyen a la síntesis, agrupación y alineación de las fibras de colágeno.

35 En la etapa final de remodelación, los queratinocitos que migran y proliferan en el borde de la herida se reestratifican para sellar la herida y formar una epidermis continua. Durante esta etapa, también se producen muchos cambios en la dermis que implican la remodelación de la matriz extracelular para restaurar una arquitectura dérmica y una vasculatura normales.

40 En ciertos casos, las heridas pueden tardar en curarse o no curarse en absoluto. Muchos factores afectan la cicatrización de una herida, por ejemplo, la salud general del sujeto herido, la edad del sujeto herido, enfermedades tales como la diabetes u otras enfermedades que pueden afectar la circulación, la presencia de infección, objetos extraños o tejido necrótico, o en casos sónicos, la medicación puede afectar la velocidad de la cicatrización de heridas.

45 Adicionalmente, en algunas heridas, la regulación imperfecta de la resolución de la herida puede dar lugar a fibrosis y formación excesiva de cicatrices para dejar tejido cicatricial que es funcional y estéticamente inferior al tejido normal.

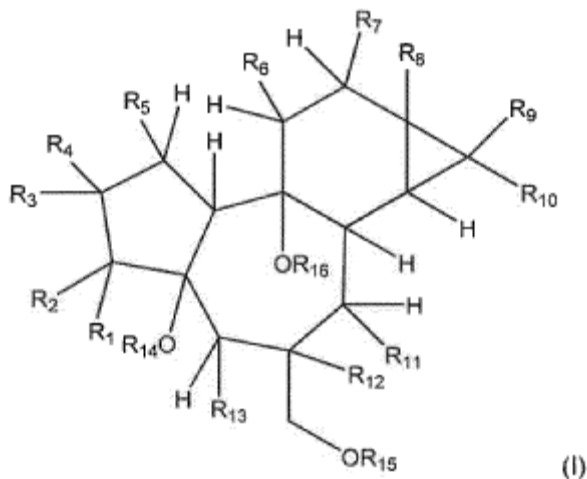
50 Hay mucha investigación para mejorar la cicatrización de heridas y reducir el tejido cicatricial. Sin embargo, existe la necesidad de encontrar agentes que sean capaces de promover la cicatrización de heridas, por ejemplo, aumentar la velocidad de cicatrización de heridas, particularmente en heridas crónicas. También existe la necesidad de agentes que permitan que una herida cicatrice con menos cicatrices de lo que ocurriría naturalmente.

Resumen de la invención

55 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los extractos de plantas que contienen compuestos epoxi-tiglicianos son capaces de promover la cicatrización de heridas y también reducir el tejido cicatricial formado al cicatrizar la herida.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona

un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la promoción de la cicatrización de heridas, en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):



5 en la que

R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);

R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);

R₅ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

10 R₇ es -OH o -OR₁₈;

R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;

R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇

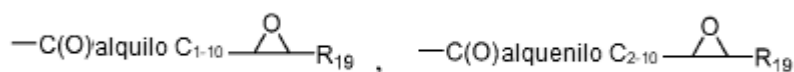
R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;

15 R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;

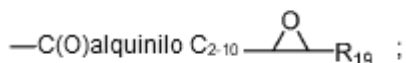
R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆;

20 R₁₈ es alquilo C₁₋₂₀, -alqueno C₂₋₂₀, -alquino C₂₋₂₀, -C(O)alquilo C₁₋₂₀, -C(O)alqueno C₂₋₂₀, -C(O)alquino C₂₋₂₀, -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-cicloalquilo; -C(O)alqueno C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-arilo, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquino C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C₁₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉,



o



y

R₁₉ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₁₀-, -alqueno C₂₋₁₀-, -alquinilo C₂₋₁₀-, cicloalquilo o arilo;

5 en la que cada grupo alquilo, alqueno, alquinilo, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En algunas realizaciones, el compuesto epoxi-tigliano está en forma de un extracto vegetal, especialmente un extracto etanólico. En algunas realizaciones, el extracto vegetal se puede obtener de u obtener de una planta que es una especie de *Fontainea* o una especie de *Hylandia*. En algunas realizaciones, el compuesto epoxi-tigliano se aísla del extracto vegetal. En otras realizaciones, el compuesto epoxi-tigliano es un derivado sintético o semisintético de un compuesto tigliano aislado.

15 En algunas realizaciones, la promoción de la cicatrización de heridas comprende el aumento de la velocidad de la cicatrización de heridas. En algunas realizaciones, la promoción de la cicatrización de heridas comprende la reducción de cicatrices en el tejido de la herida. En algunas realizaciones, la promoción de la cicatrización de heridas comprende tanto el aumento de la velocidad de la cicatrización de heridas y reducción de cicatrices en el tejido de la herida. En algunas realizaciones, la herida es una herida crónica, una herida aguda o una herida existente.

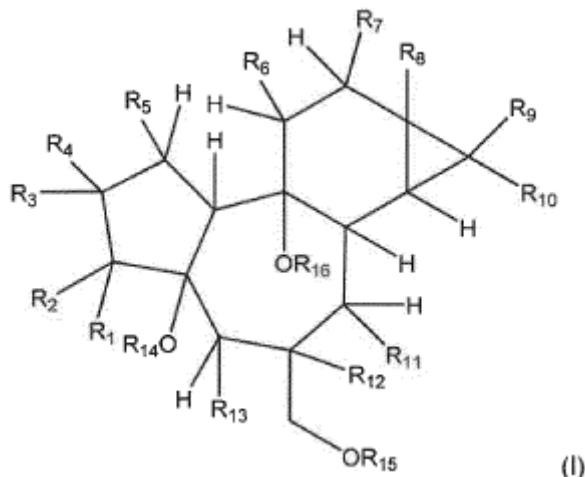
En otro aspecto más de la invención, se proporciona

un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la prevención de una cicatrización excesiva, especialmente en la que la cicatrización excesiva es una cicatriz que loide o hipertrófica; en la que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano se selecciona de:

- 20 12-tigloil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 21);
 12-(3-butenoil)-13-nonanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 22);
 12-benzoil-13-(2-metilbutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 23);
 12,13-dibutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 27)
 12-benzoil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 28);
- 25 12,13-di-nonoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 41);
 12,13-di-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 42);
 12,13-di-pentanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 43);
 12,13-di-tigloil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 44)
 5,20-di-acetil-12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 45);
- 30 12,13-di-(2*E*,4*E*)-hex-2,4-enoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 46);
 12-hexanoil-13-[2-(N-metiltraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 47)
 12-acetil-13-[2-(N-metiltraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 48);
 12,13-di-heptanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 49);
 12-miristoil-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 50);
- 35 12-miristoil-13(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 51);
 12-(2-metilbutanoil)-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 52); y
 12-hidroxi-13-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 53);
 12,13-di-(3-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 60)

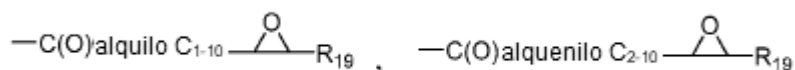
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto adicional, se proporciona un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la reducción de cicatrices causadas por una herida de cicatrización mediante la reducción de cambios en la pigmentación de la piel y/o mejora del nuevo crecimiento del pelo; en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):

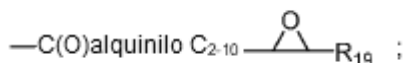


(I)

- 5 en la que
- R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);
- R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;
- R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);
- 10 R₅ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;
- R₇ es -OH o -OR₁₈;
- R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;
- R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;
- R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇
- 15 R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;
- R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;
- R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;
- R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆;
- 20 R₁₈ es alquilo C₁₋₂₀, -alqueno C₂₋₂₀, -alquino C₂₋₂₀, -C(O)alquilo C₁₋₂₀, -C(O)alqueno C₂₋₂₀, -C(O)alquino C₂₋₂₀, -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-cicloalquilo; -C(O)alqueno C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-arilo, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquino C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C₁₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉,
- 25



o



y

R₁₉ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₁₀-, -alquenilo C₂₋₁₀-, -alquinilo C₂₋₁₀-, cicloalquilo o arilo;

5 en la que cada grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción de la invención

Definiciones

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en el arte a la que pertenece la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (esto es, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

15 Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, dimensión, tamaño o cantidad que varía hasta en un 30%, 25%, 20%, 15% o 10% a una cantidad, nivel, valor, dimensión, tamaño o cantidad de referencia.

20 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos enunciados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

25 El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo lineales y ramificados opcionalmente sustituidos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. Cuando sea apropiado, el grupo alquilo puede tener un número específico de átomos de carbono, por ejemplo, alquilo -C₁-C₆, que incluye grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Ejemplos no limitantes de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, s- y t-butilo, pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, hexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo y pentadecilo.

30 El término "alquenilo" se refiere a hidrocarburos lineales o ramificados insaturados, opcionalmente sustituidos, que tienen de 2 a 20 átomos de carbono y que tienen al menos un doble enlace. Cuando sea apropiado, el grupo alquenilo puede tener un número específico de átomos de carbono, por ejemplo, alquenilo C₂-C₆ que incluye grupos alquenilo que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Ejemplos no limitantes de grupos alquenilo incluyen, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, s- y t-butenilo, pentenilo, hexenilo, hept-1,3-dieno, hex-1,3-dieno, no-1,3, 5-trieno y similares.

35 El término "alquinilo" se refiere a hidrocarburos lineales o ramificados insaturados opcionalmente sustituidos, que tienen de 2 a 20 átomos de carbono, que tienen al menos un triple enlace. Cuando sea apropiado, el grupo alquinilo puede tener un número específico de átomos de carbono, por ejemplo, alquinilo C₂-C₆ que incluye grupos alquinilo que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Los ejemplos no limitantes incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo.

40 Los términos "cicloalquilo" y "carbocíclico" se refieren a grupos hidrocarburos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, opcionalmente sustituidos, saturados o insaturados. Cuando sea apropiado, el grupo cicloalquilo puede tener un número específico de átomos de carbono, por ejemplo, cicloalquilo C₃-C₆ es un grupo carbocíclico que tiene 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes pueden incluir ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo y similares.

45 "Arilo" significa un sistema de anillo carbocíclico monocíclico, bicíclico o tricíclico de miembros C₆-C₁₄ que tiene hasta 7 átomos en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo y bifenilo. El arilo puede comprender 1-3 anillos de benceno. Si dos o más anillos aromáticos están presentes, entonces los anillos pueden fusionarse, de modo que los anillos adyacentes compartan un enlace común.

50 Cada alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo y arilo, ya sea una entidad individual o como parte de una entidad más grande, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes opcionales seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, oxo (=O), -OH, -SH, alquilo C₁₋₆O-, alquenilo O C₂₋₆ -,

cicloalquilo C₃₋₆ O-, alquilo C₁₋₆-S-, alqueno C₂₋₆-S-, cicloalquilo C₃₋₆-S-, -CO₂H, -CO₂ alquilo C₁₋₆, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₆), -N(alquilo C₁₋₆)₂, -NH(fenil), -N(fenil)₂, -CN, -NO₂, -halógeno, -CF₃, -OCF₃, -SCF₃, -CHF₂, -OCHF₂, -SCHF₂, -fenilo, -O-fenilo, -C(O)fenilo, -C(O)alquilo C₁₋₆. Los ejemplos de sustituyentes apropiados incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, tert-butilo, vinilo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, butiltio, hidroxilo, hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, flúor, cloro, bromo, yodo, ciano, nitro, -CO₂H, -CO₂CH₃, trifluorometilo, trifluorometoxi, trifluorometiltio, difluorometilo, difluorometiltio, morfolino, amino, metilamino, dimetilamino; fenilo, fenoxi, fenilcarbonilo, bencilo y acetilo.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también están dentro del alcance de la invención ya que pueden ser útiles como intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables o pueden ser útiles durante el almacenamiento o transporte. Las sales farmacéuticamente aceptables apropiadas incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables, tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, maleico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluensulfónico, bencenosulfónico, sulfanílico salicílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

Las sales de base incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio.

Los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluro de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo como sulfato de dimetilo y dietilo; y otros.

También se reconocerá que los compuestos de la invención pueden poseer centros asimétricos y, por lo tanto, son capaces de existir en más de una forma de estereoisómero. De este modo, la invención también se refiere a compuestos en forma isomérica sustancialmente pura en uno o más centros asimétricos, por ejemplo, más de aproximadamente 90% ee, tal como aproximadamente 95% o 97% ee o más de 99% ee, así como mezclas, incluyendo mezclas racémicas de los mismos. Tales isómeros se pueden obtener por aislamiento de fuentes naturales, por síntesis asimétrica, por ejemplo, usando intermedios quirales, o por resolución quiral. Los compuestos de la invención pueden existir como isómeros geométricos. La invención también se refiere a compuestos en formas cis (Z) o trans (E) sustancialmente puras o mezclas de las mismas.

Los compuestos de la presente invención se pueden obtener por aislamiento de una planta o parte de una planta, o por derivación del compuesto aislado, o por derivación de un compuesto relacionado.

Como se usa en este documento, el término "herida" se refiere a la interrupción física de la continuidad o integridad de la estructura del tejido. Las heridas pueden ser agudas o crónicas e incluyen cortes y laceraciones, incisiones o heridas quirúrgicas, punciones, rasguños, raspón, heridas por compresión, abrasiones, heridas por fricción, úlceras de decúbito (por ejemplo, presión o úlceras de decúbito); heridas de efecto térmico (quemaduras por frío y calor), heridas químicas (por ejemplo, quemaduras ácidas o alcalinas) o infecciones patógenas (por ejemplo, virales, bacterianas o fúngicas) que incluyen heridas abiertas o intactas, erupciones cutáneas, manchas y acné, úlceras, heridas crónicas, (incluidas las heridas asociadas con la diabetes, tal como úlceras en la parte inferior de las piernas y pies, úlceras venosas en las piernas y llagas por presión), sitios de receptores y donantes de trasplante/injertos de piel, afecciones de respuesta inmune, por ejemplo, psoriasis y eczema, úlceras estomacales o intestinales, heridas orales, incluyendo úlceras en la boca, cartílago o hueso dañado, heridas por amputación y lesiones corneales.

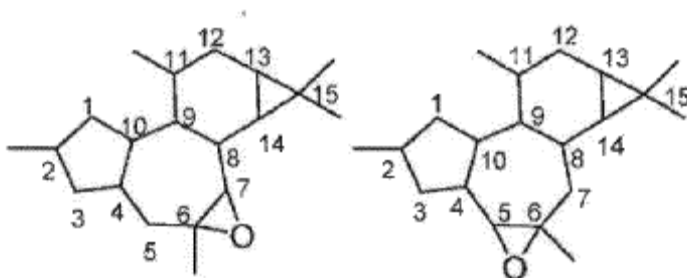
Como se usa en este documento, el término "herida crónica" se refiere a una herida que no se ha podido cicatrizar dentro de un período de tiempo normal para la cicatrización en un sujeto por lo demás sano. Las heridas crónicas pueden ser aquellas que no se cicatrizan debido a la salud del sujeto, por ejemplo, cuando el sujeto tiene mala circulación o una enfermedad tal como la diabetes, o cuando el sujeto toma un medicamento que inhibe el procedimiento de cicatrización normal. La cicatrización también se puede ver afectada por la presencia de una infección, tal como una infección bacteriana, micótica o parasitaria. En algunos casos, una herida crónica puede permanecer sin cicatrizar durante semanas, meses o incluso años. Los ejemplos de heridas crónicas incluyen, pero no se limitan, úlceras diabéticas, llagas por presión y úlceras tropicales.

El término "promover la cicatrización de heridas" como se usa en este documento, se refiere a mejorar la cicatrización de heridas en comparación con la cicatrización de heridas que se observaría en una herida no tratada. Promover la cicatrización de heridas incluye el aumento de la velocidad de la cicatrización de heridas, por ejemplo, la herida puede curarse a una velocidad que es de horas, días o semanas más rápido que si la herida se dejara sin tratar. La promoción de la cicatrización de heridas también puede abarcar la reducción del tejido cicatricial en la cicatrización o herida cicatrizada en comparación con la esperada cuando una herida se deja sin tratar.

El término "cicatrización de heridas" se refiere a la restauración de la integridad del tejido, ya sea en parte o en su totalidad.

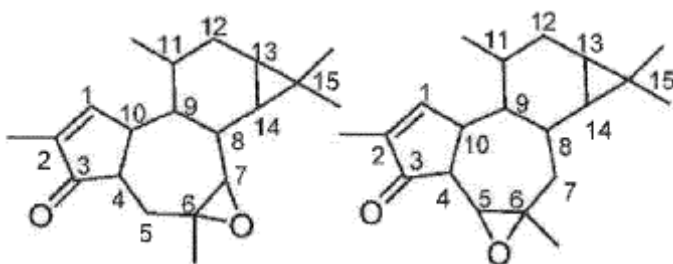
El término "reducción de cicatrices" o "tejido cicatricial reductor" tal como se menciona en este documento se refiere a un resultado cosmético mejorado y/o tejido anormal reducido causado por la cicatrización de la herida en comparación con si la herida se deja sin tratar. En algunas realizaciones, reducir el tejido cicatricial incluye reducir o minimizar el tejido anormal, reducir o minimizar los cambios en la pigmentación de la piel y/o mejorar el nuevo crecimiento del pelo en comparación con cuando la herida se deja sin tratar.

El término "compuesto epoxi-tigliano" se refiere a un compuesto que tiene una de las siguientes estructuras cíclicas de carbono básicas:



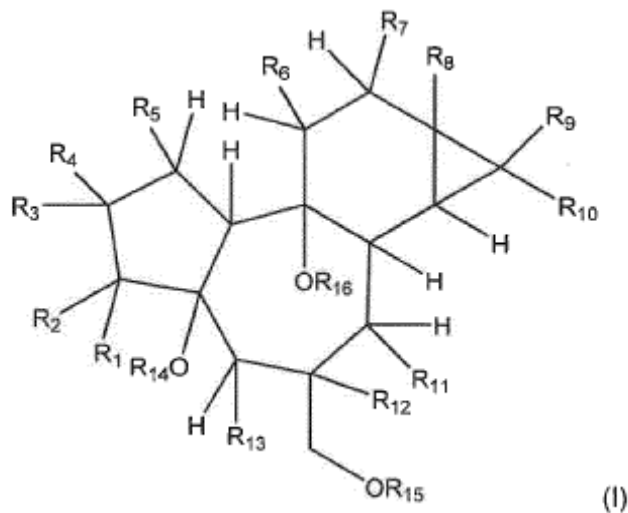
Los compuestos tienen un sistema de triciclo [9.3.0.0] tetradecano con un anillo de ciclopropano fusionado adjunto al anillo de seis miembros. El epóxido se fusiona con el anillo de siete miembros en la posición 5,6 o 6,7.

El término "compuesto epoxi-tigliceno-3-ona" se refiere a un compuesto que tiene una estructura epoxi-tigliano definida anteriormente donde el anillo de cinco miembros tiene una estructura 1,2-eno-3-ona:



Métodos de la cicatrización de heridas.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la promoción de la cicatrización de heridas, en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):



en la que

R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);

R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);

5 R₆ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₇ es -OH o -OR₁₈;

R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;

R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇

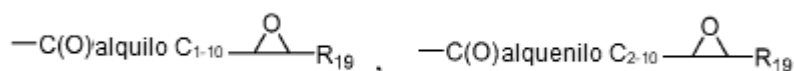
10 R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;

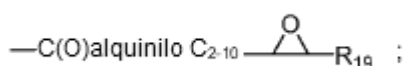
R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆;

15 R₁₈ es alquilo C₁₋₂₀, -alqueno C₂₋₂₀, -alquino C₂₋₂₀, -C(O)alquilo C₁₋₂₀, -C(O)alqueno C₂₋₂₀, -C(O)alquino C₂₋₂₀, -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-cicloalquilo; -C(O)alqueno C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-arilo, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquino C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C₁₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉,



o



25 y

R₁₉ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₁₀-, -alqueno C₂₋₁₀-, -alquino C₂₋₁₀-, cicloalquilo o arilo;

en la que cada grupo alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 La herida que se va a curar puede estar presente en cualquier órgano o tejido, incluidos los órganos o tejidos internos o tejidos externos, tal como la piel. La herida puede ser el resultado de una lesión, mordedura o quemadura. El órgano o tejido puede ser uno cualquiera o más de piel, músculo, hígado, riñones, pulmones, corazón, páncreas, bazo, estómago, intestinos, vejiga, ovarios, testículos, útero, cartílago, tendón, ligamento, huesos y similares. En realizaciones particulares, la herida está en la piel y/o músculo.

En algunas realizaciones, el compuesto epoxi-tigliano

35 de fórmula (I) se administra poco después de incurrir la herida. En otras realizaciones, la herida es una herida crónica que no se ha podido curar durante días, semanas, meses o años. En otras realizaciones más, la herida es una herida existente que no se ha podido curar a un ritmo normal o que no ha respondido a otras terapias.

40 Los compuestos de fórmula (I) también se pueden aplicar a una herida que está cicatrizando o ha cicatrizado con cicatrización excesiva. Ejemplos de tales heridas son aquellas que producen o han producido cicatrices queloides o cicatrices hipertróficas.

En algunas realizaciones, la herida está infectada con una infección bacteriana. La infección bacteriana puede ser causada por una bacteria Gram positiva o Gram negativa, especialmente una bacteria Gram positiva. Los ejemplos no limitantes de bacterias controladas por los compuestos de la invención incluyen bacterias del género *Bacillus*, tal como *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. firmis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. pantothenicus*, *B. alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis* y *B. sphaericus*; *Staphylococcus* tal como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*; *Streptococcus*, for example, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. alagactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. anginosus*, *S. salivarius*, *S. milleri*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. uberis* y *S. avium*; *Aerococcus* spp., *Gemella* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Kurthia* spp., *Lactobacillus* spp., *Erysipidothrix* spp., *Arachnia* spp., *Actinomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Rothia* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp. e *Mycobacterium* spp.

En algunas realizaciones, la herida está infectada con una infección fúngica. La infección fúngica puede ser causada por hongos filamentosos o levaduras. Ejemplos no limitativos de hongos que están controlados por los compuestos de la invención incluyen hongos del género tal como *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Trichiophylon* spp., *Cladosporium* spp., *Ulocladium* spp., *Curvularia* spp., *Aureobasidium* spp., *Candida albicans*, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Malessezia pachydermatis*, *Malessezia* spp. y *Trichosporon* spp.

En algunas realizaciones, la herida está infectada tanto por infecciones bacterianas como fúngicas, incluso en biopelículas.

El sujeto que tiene una herida que se va a curar puede ser cualquier sujeto incluyendo mamíferos, aves, peces y reptiles. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano, un animal de compañía, un animal de laboratorio, un animal de granja o de trabajo, un ave de granja, un animal de carreras o un animal salvaje cautivo, tal como los que se encuentran en zoológicos. Los ejemplos de sujetos apropiados incluyen, pero no se limitan a, humanos, perros, gatos, conejos, hámsteres, cobayas, ratones, ratas, caballos, ganado, ovejas, cabras, ciervos, cerdos, monos, marsupiales, gallinas, gansos, canarios, periquitos, cocodrilos, serpientes, lagartos y similares. En realizaciones particulares, el sujeto es un sujeto mamífero tal como un humano, perro, gato, caballo, ganado, oveja, cabra, cerdo, ciervo, rata, cobaya, canguro, conejo o ratón.

En algunas realizaciones, la administración del compuesto epoxi-tigliano de fórmula (I) promueve la cicatrización de una herida al aumentar la velocidad de la cicatrización de heridas. En algunas realizaciones, la administración del compuesto epoxi-tigliano de fórmula (I) promueve la cicatrización al reducir la cicatrización o la cantidad de tejido cicatricial que se formaría en ausencia de tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento mejora el resultado cosmético o el resultado o la apariencia de la herida una vez que se ha cicatrizado, incluida la mejora de la pigmentación de la piel y la mejora del nuevo crecimiento del pelo en comparación con una herida que no ha sido tratada.

En realizaciones particulares de la promoción de la cicatrización de heridas, la terapia es preferiblemente tópica en o alrededor del sitio o se administra intralesionalmente para proporcionar un efecto localizado.

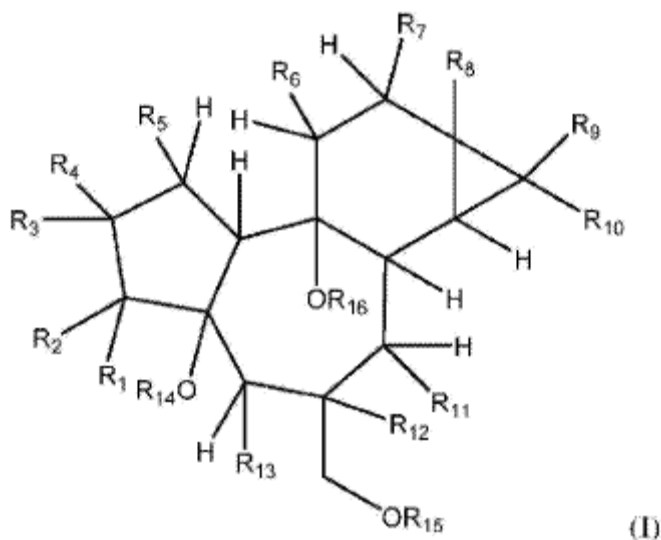
Una "cantidad eficaz" significa una cantidad necesaria al menos en parte para lograr la respuesta deseada, por ejemplo, para iniciar la cicatrización de una herida o para aumentar la velocidad de cicatrización de una herida. La cantidad varía según la salud y la condición física del individuo que se va a tratar, el grupo taxonómico del individuo que se va a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que se pueda determinar a través de pruebas de rutina. Una cantidad eficaz en relación con un paciente humano, por ejemplo, puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.1 ng por kg de peso corporal a 1 g por kg de peso corporal por dosis. La dosis está preferiblemente en el intervalo de 1 µg a 1 g por kg de peso corporal por dosis, tal como en el intervalo de 0.5 mg a 1 g por kg de peso corporal por dosis. En una realización, la dosis está en el intervalo de 1 mg a 500 mg por dosis. En otra realización, la dosis está en el intervalo de 1 mg a 250 mg por dosis. En otra realización más, la dosis está en el intervalo de 1 mg a 100 mg por dosis, tal como hasta 50 mg por dosis. En otra realización más, la dosis está en el intervalo de 1 µg a 1 mg por kg de peso corporal por dosis. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, semanalmente, mensualmente u otros intervalos de tiempo apropiados, o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación.

En algunas realizaciones, el compuesto epoxi-tigliano de fórmula (I) o un extracto vegetal que contiene al menos un compuesto epoxi-tigliano de fórmula (I) se puede administrar por separado, ya sea de forma simultánea o secuencial, o en la misma composición que otro agente farmacéuticamente activo que es útil en la cicatrización de heridas. Por ejemplo, los compuestos epoxi-tiglicianos de fórmula (I) se pueden administrar en combinación con un antibiótico y/o un agente antiinflamatorio. Los antibióticos apropiados incluyen antibióticos beta-lactámicos tales como penicilina, ampicilina, amoxicilina, flucloxacilina, dicloxacilina, metacilina, carbenicilina y norocilina; cefalosporinas, como cefalexina, cefacetilo, cefadroxilo, cefaloglicina, cefalonio, cefalordidina, cefatrizina, ceclor, cefproxil, cefuzonam, cefmetozol, loracarbef, cefminox, cefdinir, cefpodoxima y cefpiroma; carbapenemas tales como imipenem, meropenem, ertapenem, daripenem, panipenem y biapenem; aminoglucósidos tales como gentamicina,

estreptomina, neomicina, kanamicina, vancomicina, eritromicina y asitromicina; oxazolidinonas tales como linezolid y posizolid, lincosamidas tales como clindamicina, quinolinas tales como ácido oxolínico, ciprofloxacina, enoxacina, ofloxacina, lomefloxacina, levofloxacina y difloxacina; y sulfonamidas tales como sulfametoxazol, sulfoadiazina y sulfacetamida, o mezclas tales como amoxiclav (amoxicilina y ácido clavulínico). Los agentes antiinflamatorios apropiados incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como meloxicam, piroxicam, oxicam, aspirina, difunisal, ibuprofeno, dexibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, indometacina, tolmetina, ácido mefenámico, numisulida y similares, y corticosteroides tal como la hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, budesonida, betametasona y dexametasona.

5 Los compuestos epoxi-tigianos de fórmula (I) se pueden usar en combinación con otras terapias de la cicatrización de heridas tales como apósitos y ungüentos, lociones y geles. Por ejemplo, los compuestos epoxi-tigianos se pueden usar en combinación con apósitos y apósitos de plata, ungüentos, lociones y geles que comprenden agentes terapéuticos tales como el yodo, el aloe vera, paw paw, o mieles médicamente activas tales como la miel de manuka u otros agentes biológica o fisiológicamente activos tales como agentes antivirales, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos y vitaminas, tales como A, C, D y E y sus ésteres. Los compuestos epoxi-tigianos de fórmula (I) también se pueden usar en combinación con apósitos que proporcionan una estructura molecular para la herida. 10 Tales apósitos pueden incluir películas poliméricas y películas poliméricas reticuladas, tales como ácido hialurónico y estructuras relacionadas, incluyendo ácido hialurónico reticulado.

El compuesto epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):



20 en la que

R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);

R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);

R₆ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

25 R₇ es -OH o -OR₁₈;

R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;

R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇

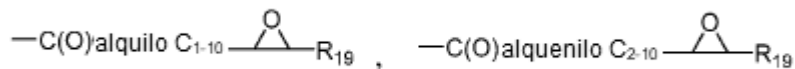
R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;

30 R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;

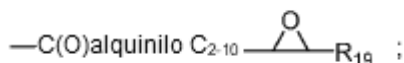
R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆;

- 5 R_{18} es alquilo C_{1-20} , -alquenilo C_{2-20} , -alquinilo C_{2-20} , -C(O)alquilo C_{1-20} , -C(O)alquenilo C_{2-20} , -C(O)alquinilo C_{2-20} , -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C_{1-10} -cicloalquilo; -C(O)alquenilo C_{2-10} -cicloalquilo, -C(O)alquinilo C_{2-10} -cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C_{1-10} -arilo, -C(O)alquenilo C_{2-10} -arilo, -C(O)alquinilo C_{2-10} -arilo, -C(O)alquilo C_{1-10} -C(O) R_{19} , -C(O)alquenilo C_{2-10} -C(O) R_{19} , -C(O)alquinilo C_{2-10} -C(O) R_{19} , -C(O)alquilo C_{1-10} -CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquenilo C_{2-10} -CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquinilo C_{2-10} -CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C_{1-10} -SR₁₉, -C(O)alquenilo C_{2-10} -SR₁₉, -C(O)alquinilo C_{2-10} -SR₁₉, -C(O)alquilo C_{1-10} -C(O)OR₁₉, -C(O)alquenilo C_{2-10} -C(O)OR₁₉, -C(O)alquinilo C_{2-10} -C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C_{1-10} -C(O)SR₁₉, -C(O)alquenilo C_{2-10} -C(O)SR₁₉, -C(O)alquinilo C_{2-10} -C(O)SR₁₉,



o



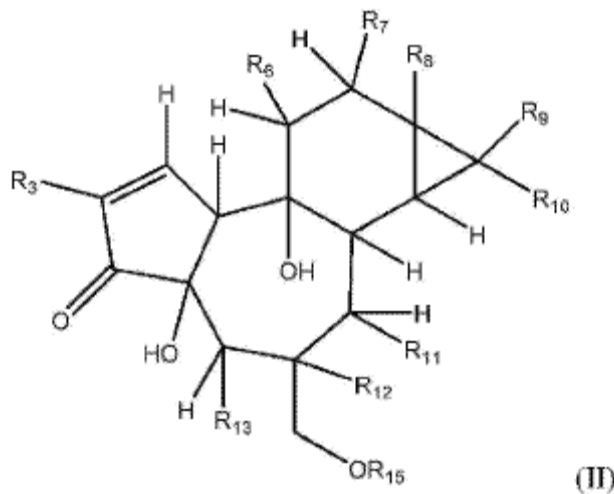
10

y

R_{19} es hidrógeno, -alquilo C_{1-10} -, -alquenilo C_{2-10} -, -alquinilo C_{2-10} -, cicloalquilo o arilo;

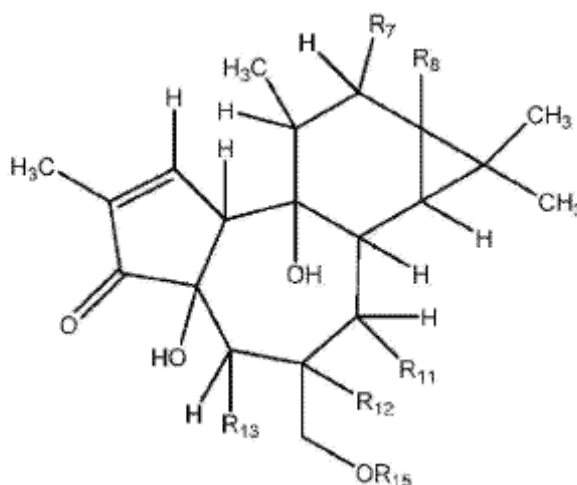
en la que cada grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) es un epoxi-tigliaen-3-ona compuesto de fórmula (II):



en la que R_3 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{15} son como se definen para la fórmula (I).

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) o (II) es un compuesto de fórmula (III):



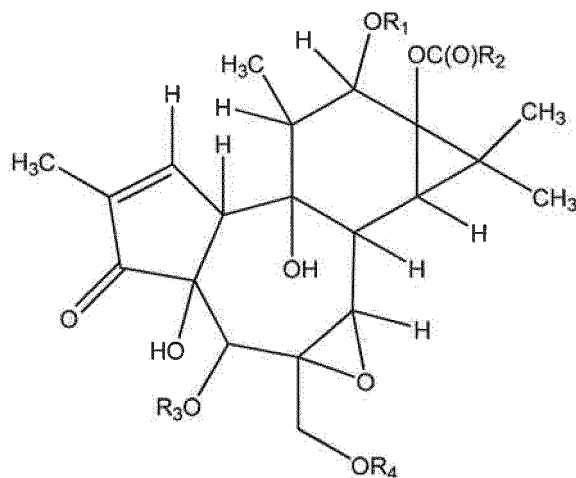
en la que R₇, R₈, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₅ son como se definen para la fórmula (I).

En realizaciones particulares de fórmula (I), fórmula (II) o fórmula (III), uno o más de lo siguiente se aplica:

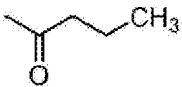
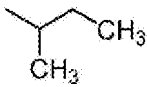
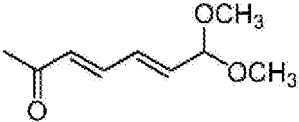
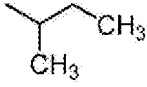
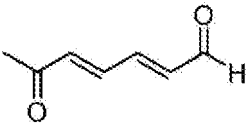
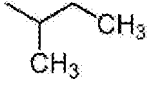
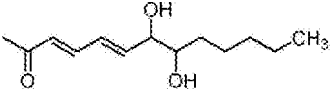
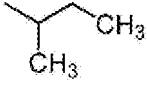
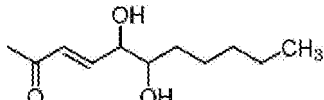
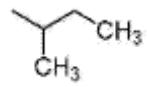
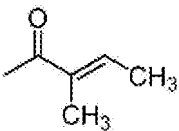
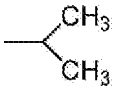
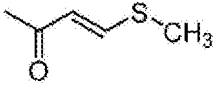
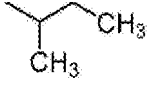
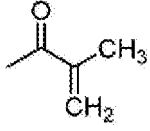
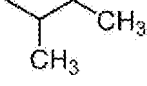
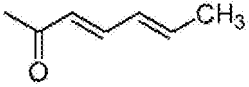
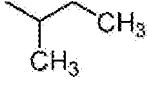
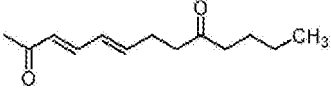
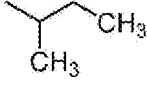
- 5 R₁ es hidrógeno y R₂ es OH o -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆, o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo; especialmente cuando R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo;
- R₃ es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃, especialmente -alquilo C₁₋₃, más especialmente metilo;
- R₄ es hidrógeno o -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆ y R₅ es hidrógeno o -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆ o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido; especialmente cuando R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace;
- 10 R₆ es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃, especialmente -alquilo C₁₋₃, más especialmente metilo;
- R₇ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₁₅, -OC(O)alqueno C₂₋₁₅, -OC(O)alquino C₂₋₁₅, -OC(O)arilo en la que el grupo arilo está opcionalmente sustituido, -OC(O)alquilo C₁₋₁₅-arilo, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)H, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)H, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-S-alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-S-alquilo C₁₋₆, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)O-alquilo C₁₋₆ o -OC(O)alquilo C₂₋₁₀C(O)O-alquilo C₁₋₆; especialmente -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₁₅, -OC(O)alqueno C₂₋₁₂, -OC(O)alquino C₂₋₁₂, -OC(O)arilo en la que el grupo arilo está opcionalmente sustituido, -OC(O)alquilo C₁₋₁₂-arilo, -OC(O)alquilo C₁₋₆C(O)H, -OC(O)alqueno C₂₋₆C(O)H, -OC(O)alquilo C₁₋₆C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alquilo C₁₋₆CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alqueno C₂₋₆CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alquilo C₁₋₆S-alquilo C₁₋₃, -OC(O)alqueno C₂₋₆S-alquilo C₁₋₃, -OC(O)alquilo C₁₋₆C(O)O-alquilo C₁₋₃ o -OC(O)alquilo C₂₋₆C(O)O-alquilo C₁₋₃;
- 15 R₈ es -OC(O)alquilo C₁₋₁₅, -OC(O)alqueno C₂₋₁₅, -OC(O)alquino C₂₋₁₅ o -OC(O)arilo cuando el grupo arilo está opcionalmente sustituido, especialmente -OC(O)alquilo C₁₋₁₀, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀, -OC(O)alquino C₂₋₁₀ o -OC(O)arilo cuando el grupo arilo está opcionalmente sustituido; más especialmente -OC(O)alquilo C₁₋₁₀, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀ y -OC(O)arilo cuando el grupo arilo está opcionalmente sustituido;
- 20 R₉ y R₁₀ son independientemente -alquilo C₁₋₃, especialmente cuando R₉ y R₁₀ son ambos metilo;
- R₁₁ y R₁₂ forman juntos un epóxido y R₁₃ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆, especialmente -OH o -C(O)alquilo C₁₋₃; o
- R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y R₁₁ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆, especialmente -OH; y
- 30 R₁₄ es hidrógeno, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆, especialmente hidrógeno; R₁₅ es hidrógeno, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆, especialmente hidrógeno o -C(O)alquilo C₁₋₃; y
- R₁₆ es hidrógeno, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆, especialmente hidrógeno.

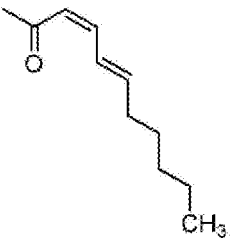
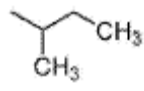
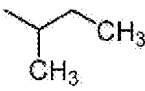
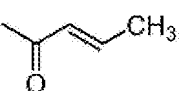
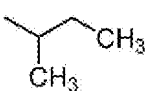
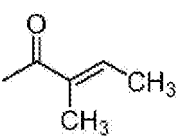
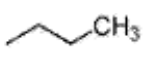
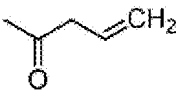

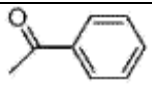
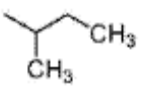
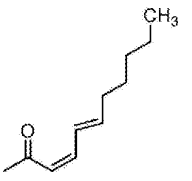
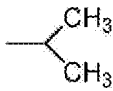
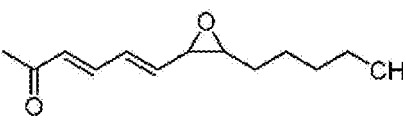
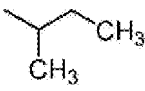
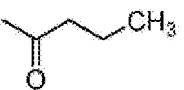

En realizaciones particulares, el compuesto epoxi-tigliano se selecciona de uno de los siguientes compuestos en las tablas 1 a 6:

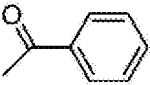



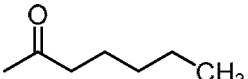

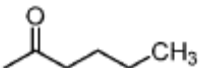

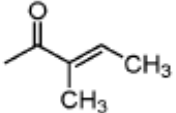
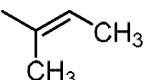
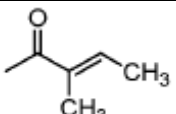
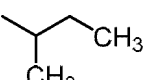
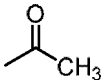
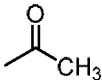
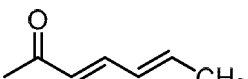
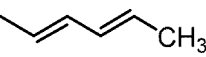
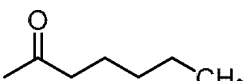
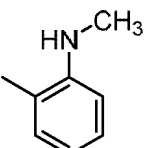
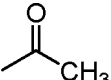
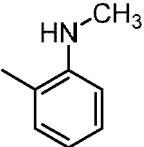
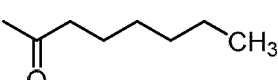
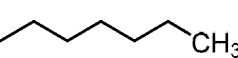
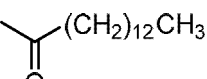
35 Tabla 1



Compuesto	R1	R2	R3	R4
1			H	H
2			H	H
3			H	H
4			H	H
5			H	H
6			H	H
7			H	H

8			H	H
9			H	H
10			H	H
11			H	H
12			H	H
13			H	H
14			H	H
15			H	H
16			H	H
17			H	H

18			H	H
19	-H		H	H
20			H	H
21			H	H
22			H	H
23			H	H
25			H	H
26			H	H
27			H	H

28			H	H
41			H	H
42			H	H
43			H	H
44			H	H
45				
46			H	H
47			H	H
48			H	H
49			H	H
50		-CH ₃	H	H

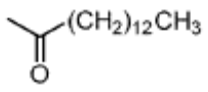
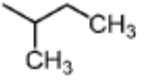
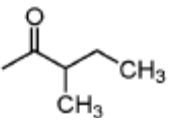

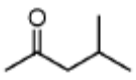
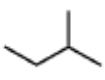
51			H	H
52		-CH ₃	H	H
53	-H		H	H
60			H	H

Tabla 2:

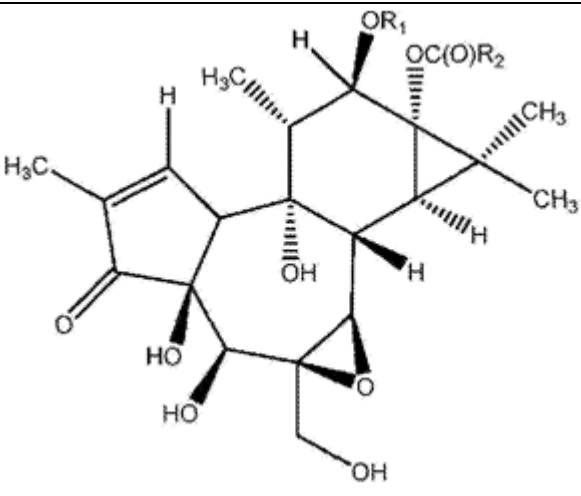
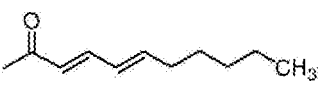
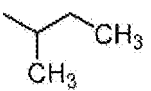
		
Compuesto	R ₁	R ₂
24		

Tabla 3:

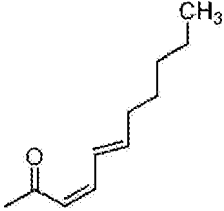
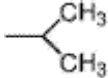
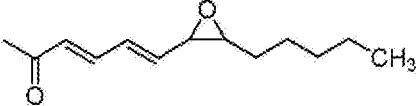
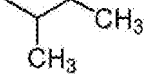


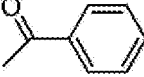

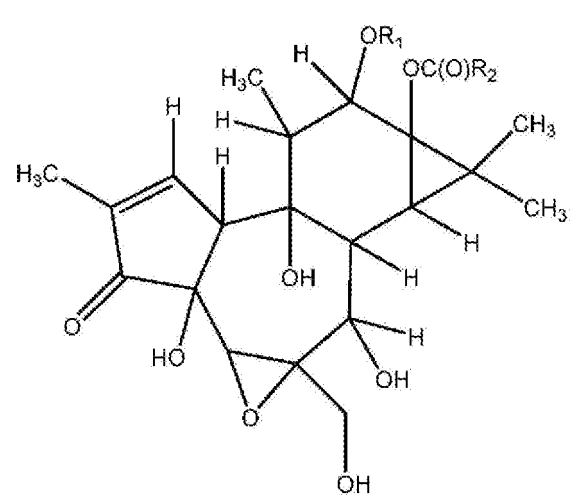
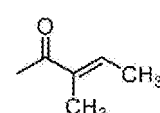
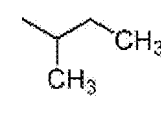
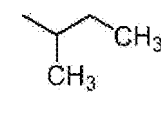
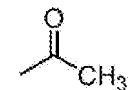
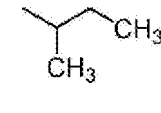
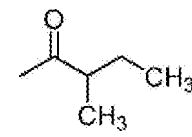
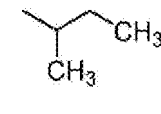
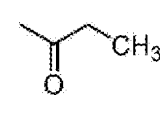
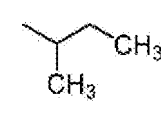
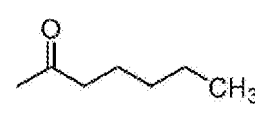
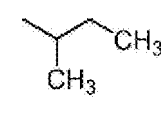
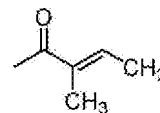
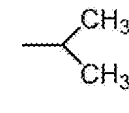
Compuesto	R ₁	R ₂
54		
55		
56		
57		

Tabla 4:

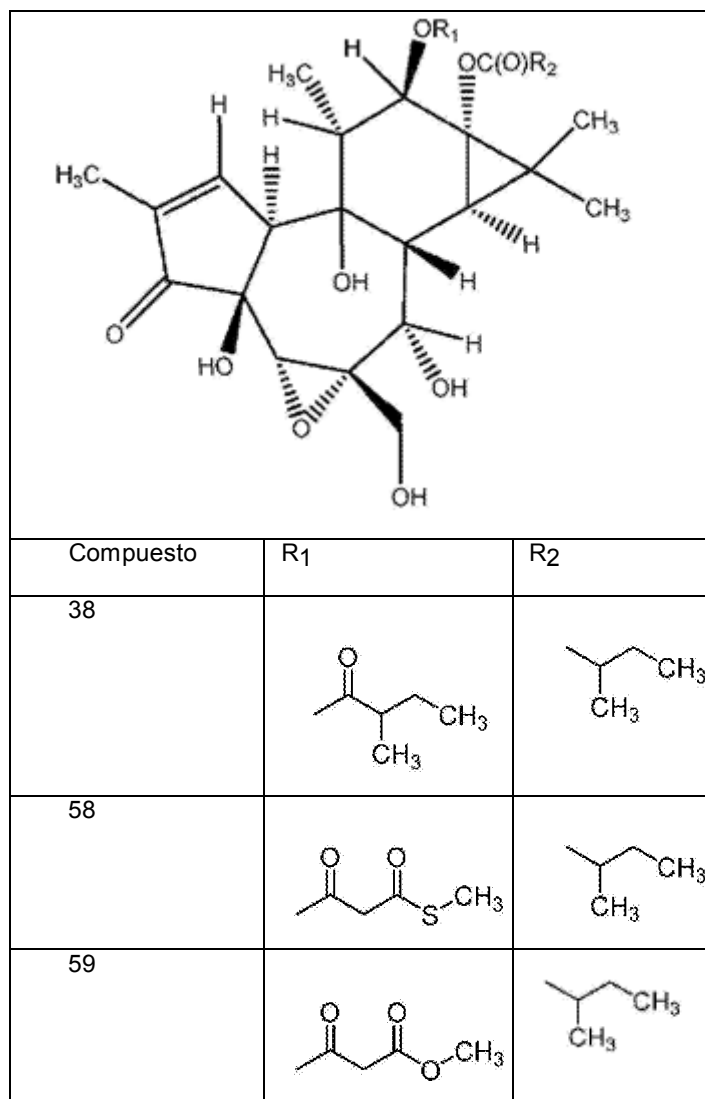
		
Compuesto	R ₁	R ₂
29		
30	-H	
31		
32		
33		
34		
35		

36		
39		
40		

Tabla 5:

Compuesto	R1	R2
37		

Tabla 6:



Los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de un compuesto puro o en forma de un extracto vegetal.

5 En los casos en que se describe que los compuestos tienen estereoquímica, la estereoquímica representada es una estereoquímica relativa y se basa en el conocimiento de las vías de biosíntesis y el análisis químico.

En algunas realizaciones, el extracto vegetal es de una planta del género *Fontainea* o *Hylandia*, especialmente la especie es *Fontainea pancheri*, *Fontainea australis*, *Fontainea borealis*, *Fontainea fugax*, *Fontainea oraria*, *Fontainea picosperma*, *Fontainea rostrata*, *Fontainea subpapuana*, *Fontainea venosa* o *Hylandia dockrillii*, especialmente *Fontainea picosperma*, *Fontainea australis*, *Fontainea rostrata* o *Hylandia dockrillii*.

10 Las partes de la planta pueden incluir fruta, semilla, corteza, tallo, hoja, flor, raíces, endosperma, exocarpio y madera, especialmente cuando el extracto se obtiene de la semilla.

15 Los extractos de las plantas se pueden obtener por métodos estándar, por ejemplo, la biomasa obtenida de semillas, hojas, frutos, endospermo, exocarpio, tallo o corteza de la planta se somete a una extracción inicial con solvente, tal como con un solvente polar, por ejemplo, etanol. La extracción inicial se concentra luego y se diluye con agua y se somete a extracción con un segundo solvente, por ejemplo, acetato de etilo. Las muestras de solvente de la segunda extracción se agrupan y se someten a separación por fraccionamiento de HPLC preparativo. Las fracciones se analizan mediante HPLC analítica y se agrupan según el tiempo de retención de los compuestos encontrados en las muestras. Las fracciones se agrupan se pesan, se someten a un bioensayo y se analizan mediante HPLC analítica. Se realiza un fraccionamiento adicional usando una o más HPLC preparativa para aislar compuestos
20 específicos. Cada compuesto es bioensayado y su estructura identificada por UV, RMN y técnicas de espectrometría de masas.

Otros compuestos de la invención se pueden obtener mediante la derivación de compuestos aislados de plantas o partes de plantas, especialmente del género *Fontainea*, especialmente de la especie *Fontainea picrosperma*, especialmente las semillas de *Fontainea picrosperma*.

- 5 Los derivados de los compuestos naturales se pueden obtener mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los grupos hidroxilo se pueden oxidar a cetonas, aldehídos o ácidos carboxílicos por exposición a agentes oxidantes tal como el ácido crómico, reactivo de Jones, KMnO_4 , perácidos tales como mCPBA (ácido metacloroperbenzoico) o dioxiranos tal como dimetildioxirano (DMDO) y metil(trifluorometil) dioxirano (TFDO). Los agentes oxidantes se pueden elegir de modo que otros grupos funcionales en la molécula sean o no sean oxidados.
- 10 Por ejemplo, un alcohol primario se puede oxidar selectivamente a un aldehído o ácido carboxílico en presencia de alcoholes secundarios usando reactivos tales como $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ -benceno. Los alcoholes secundarios se pueden oxidar selectivamente a cetonas en presencia de un alcohol primario usando Cl_2 -piridina o NaBrO_3 -nitrato de amonio cérico. Los alcoholes se pueden oxidar en presencia de enlaces dobles y triples y sin epimerización en estereocentros adyacentes usando el reactivo de Jones con o sin Celite (o cloruro de amonio). Alternativamente, los reactivos elegidos pueden ser menos selectivos dando como resultado la oxidación en más de un grupo funcional.
- 15 Los grupos hidroxilo también se pueden derivar por eterificación o acilación. Por ejemplo, los éteres se pueden preparar mediante la formación de un ion alcóxido en presencia de una base y haciendo reaccionar el alcóxido con un haluro de alquilo apropiado, haluro de alqueno, haluro de alquino o haluro de arilo. De manera similar, la acilación se puede lograr mediante la formación de un ion alcóxido y la reacción con un ácido carboxílico apropiado o ácido carboxílico activado (tal como un anhídrido o cloruro de acilo).
- 20 Los grupos acilo se pueden hidrolizar para proporcionar alcoholes por hidrólisis ácida o básica como se conoce en la técnica y esos alcoholes se pueden derivar adicionalmente como anteriormente.

Las cetonas se pueden reducir a alcoholes secundarios mediante agentes reductores tales como hidruro de litio y aluminio y otros hidruros metálicos sin reducir los dobles enlaces, incluidas las cetonas α -insaturadas.

- 25 Los enlaces dobles y los enlaces triples se pueden reducir a enlaces sencillos usando reducción catalítica, por ejemplo, H_2/Pd . Los dobles enlaces también se pueden oxidar a epóxidos usando agentes oxidantes como los perácidos, por ejemplo, mCPBA o dioxiranos, como el DMDO y el TFDO. Los dobles enlaces también pueden estar sujetos a reacciones de adición para introducir sustituyentes tales como grupos halo, grupos hidroxilo o alcoxi.
- 30 Un experto en el arte se podría determinar las condiciones apropiadas para obtener derivados de compuestos aislados, por ejemplo, por referencia a textos relacionados con la metodología de síntesis, ejemplos de los cuales son Smith M.B. and March J., *March's Advanced Organic Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons Inc., 2001 and Larock R.C., *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers Ltd., 1989. Adicionalmente, las manipulaciones selectivas de grupos funcionales pueden requerir la protección de otros grupos funcionales. Los grupos protectores apropiados para prevenir reacciones secundarias no deseadas se proporcionan en Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons Inc., 3rd Edition, 1999.

- 35 Compuestos de la invención.

En otro aspecto de la invención, hay nuevos compuestos que incluyen:

- 12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 5);
- 12-acetil-13-(2-metil)butanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 6);
- 12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 7);
- 40 12-butanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 8);
- 12-[(2E,4E)-(6,6-dimetoxihexa-2,4-dienoil)]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 9);
- 12-[(2E,4E)-6-oxohexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 10);
- 45 12-[(2E,4E)-6,7-dihidroxidodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 11);
- 12-[(2E)-4,5-dihidroxi-deca-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 12);
- 12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 13);
- 50 12-[(2E)-3-metilprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 14);

ES 2 715 105 T3

- 12-(2-metilprop-2-enoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 15);
- 12-[(2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 16);
- 5 12-[(2*E*,4*E*)-8-oxododeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 17);
- 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 18);
- 13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 19);
- 12-[(2*E*)-but-1-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 20);
- 10 12-tigloil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 21);
- 12-(3-butenoil)-13-nonanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 22);
- 12-benzoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 23);
- 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 25);
- 15 12-[(2*E*,4*E*)-6,7-(anti)-epox-dodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 26);
- 12,13-dibutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 27);
- 12-benzoil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 28);
- 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 29);
- 20 13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 30);
- 12-acetil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 31);
- 12,13-di-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 32);
- 12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 33);
- 12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 34);
- 25 12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 35);
- 12-[(2*E*)-3-metiltioprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 36);
- 12-[[2-(metilsulfanil)carbonil]-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 39);
- 30 12-[(2-metoxicarbonil)-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 40);
- 12,13-di-nonoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 41);
- 12,13-di-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 42);
- 12,13-di-pentanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 43);
- 35 12,13-di-tigloil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 44)
- 5,20-diacetil-12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 45);
- 12,13-di-(2*E*,4*E*)-hex-2,4-enoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 46);
- 12-hexanoil-13-[2-(*N*-metilantraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 47)
- 12-acetil-1,3-[2-(*N*-metilantraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 48);
- 40 12,13-di-heptanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 49);

12-miristoil-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 50);
 12-miristoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 51);
 12-(2-metilbutanoil)-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 52); y
 13-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 53);

5 12,13-di-(3-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,1-tigliaen-3-one (Compuesto 60)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto más de la invención, uno cualquiera de los compuestos 5 a 53 o 60 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede estar en forma de una composición farmacéutica junto con un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Composiciones

Si bien los compuestos epoxi-tiglicianos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se pueden administrar en forma pura, puede ser más conveniente administrar los compuestos epoxi-tiglicianos en forma de una composición farmacéutica junto con un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 La forma de dosificación y las velocidades de uso farmacéutico y las composiciones se pueden determinar fácilmente por un experto en el arte.

20 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, trociscos, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos, apósitos impregnados (oclusivos), cremas, geles y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir dispositivos de inyección o implantación diseñados específicamente para, o modificados a, liberación controlada de la composición farmacéutica. La liberación controlada del agente terapéutico se puede efectuar revistiendo el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa como la hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada se puede ver afectada mediante el uso de otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas.

25 En las composiciones de esta invención también se pueden incorporar portadores farmacéuticamente aceptables y portadores aceptables para administración sistémica.

30 Adecuadamente, la composición farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable o un excipiente aceptable. Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una sustancia de relleno sólido o líquido, diluyente o encapsulante que se puede usar de manera segura. Dependiendo de la vía de administración particular, se pueden usar una variedad de portadores, bien conocidos en la técnica. Estos portadores o excipientes se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina u otros agentes gelificantes, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, alcoholes y/o polioles, ácido alginico, soluciones reguladoras de fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y agua libre de pirógenos.

35 Se puede emplear cualquier vía de administración apropiada para proporcionar a un paciente humano o no humano con la composición farmacéutica de la invención. Por ejemplo, se pueden emplear oral, tópico, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenoso, intraarticular, intramuscular, intradérmico, subcutáneo, inhalatorio, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmico y similares.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención apropiadas para administración se pueden presentar en unidades discretas tales como jeringas, viales, tubos, cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de uno o más compuestos o extractos farmacéuticamente activos de la invención, como un polvo o gránulos o como una solución o suspensión en un líquido acuoso, una solución de ciclodextrina, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite o como una solución o suspensión en una crema o gel o como una suspensión de micro- o nano-partículas que incorporan un compuesto de la invención, incluidas, pero no se limitan a, micro- o nanopartículas de sílice o polilactida. Tales composiciones se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar uno o más compuestos farmacéuticamente activos de la invención con el portador que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima los agentes de la invención con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, moldeando el producto para la presentación deseada.

50 En polvos, el portador es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido.

En comprimidos, el componente activo se mezcla con el portador que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones apropiadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

- Los portadores apropiados para polvos y comprimidos incluyen carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como portador que proporciona una cápsula en la que el componente activo, con o sin portadores, está rodeado por un portador, que de este modo está asociado con él. Del mismo modo, se incluyen pastillas y comprimidos para deshacer en la boca. Los comprimidos, los polvos, las cápsulas, las píldoras, las pastillas y los comprimidos para deshacer en la boca se pueden usar como formas sólidas apropiadas para la administración oral.
- Para preparar los supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente, como por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte luego en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y, por lo tanto, solidifica.
- Las formulaciones apropiadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen además del ingrediente activo, tales portadores que se conocen en la técnica como apropiados.
- Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua-propilenglicol. Por ejemplo, las preparaciones líquidas para inyección parenteral se pueden formular como soluciones en 1,2-propanodiol acuoso, dimetilsulfóxido (DMSO), soluciones acuosas de gamma ciclodextrina o 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, solución salina o solución de polietilenglicol, con o sin solución reguladora. Un intervalo preferido de pH es 3.5-4.5. Las soluciones reguladoras apropiados estandarizan la preparación a pH 3.5-4.5 e incluyen, pero no se limitan a, solución reguladora de acetato y solución reguladora de citrato.
- Los compuestos de fórmula (I) se pueden formular de este modo para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua) y se pueden presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, envases de infusión de pequeño volumen o en multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la solución, para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.
- Las soluciones acuosas apropiadas para uso oral se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, aromas, agentes estabilizantes y espesantes apropiados, según se desee.
- Las suspensiones acuosas apropiadas para uso oral se pueden hacer dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio u otros agentes de suspensión bien conocidos.
- También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizantes, soluciones reguladoras, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.
- Para la administración tópica a la epidermis u otro órgano, los compuestos según la invención se pueden formular como geles, ungüentos, emulsiones, pastas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Los geles se pueden preparar usando agentes espesantes apropiados y añadiéndolos a composiciones acuosas/alcohólicas del compuesto. Los agentes espesantes o gelificantes apropiados son conocidos en la técnica, tales como el polímero de polivinil carboxi, Carbomer 940. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes apropiados. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y en general también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes.
- Las formulaciones apropiadas para administración tópica también incluyen soluciones o suspensiones que se pueden administrar por vía tópica en forma de un baño o solución de remojo o un pulverizador. Estas formulaciones se pueden aplicar adecuadamente para combatir irritaciones de la piel, picaduras de insectos y heridas en los pies.
- Las formulaciones apropiadas para la administración tópica en la boca incluyen comprimidos para deshacer en la boca que comprenden un agente activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido apropiado.

Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un gotero, pipeta o pulverizador. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma única o multidosis. En el último caso de un gotero o pipeta, esto se puede lograr si el paciente administra un volumen apropiado y predeterminado de la solución o suspensión. En el caso de una pulverización, esto se puede lograr, por ejemplo, por medio de una bomba de pulverización de atomización dosificadora. Para mejorar el suministro y la retención nasal, los compuestos según la invención se pueden encapsular con ciclodextrinas, o formularse con sus agentes que se espera que aumenten el suministro y la retención en la mucosa nasal.

La administración al tracto respiratorio también se puede lograr por medio de una formulación de aerosol en la que el ingrediente activo se proporciona en un paquete presurizado con un propelente apropiado tal como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano dióxido de carbono, u otro gas apropiado. El aerosol también puede contener convenientemente un surfactante tal como lecitina. La dosis de fármaco se puede controlar mediante la provisión de una válvula dosificada.

Alternativamente, los ingredientes activos se pueden proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto de fórmula (I) en una base en polvo apropiada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP).

Convenientemente, el portador de polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición del polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina o envases tipo blíster a partir de los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

En las formulaciones destinadas a la administración al tracto respiratorio, incluidas las formulaciones intranasales, el compuesto generalmente tendrá un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 1 a 10 micras o menos. Dicho tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante micronización.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que ilustran algunos aspectos preferidos de la presente invención. Sin embargo, se debe entender que la particularidad de la siguiente descripción de la invención no es reemplazar la generalidad de la descripción precedente de la invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una representación fotográfica del cierre de rasguños en células de fibroblastos neonatales humanos tratadas con el control de vehículo solo, 24 horas después del rasguño.

La figura 2 es una representación fotográfica del cierre de rasguños en células de fibroblastos neonatales humanos tratadas con 30 ng/mL del compuesto 1, 24 horas después del rasguño.

La figura 3 es una representación gráfica del ensayo de invasión de matrigel de células de fibroblastos neonatales humanos tratadas con 10 ng/mL o 30 ng/mL del compuesto 1 en comparación con el control de vehículo solo. Las células se contaron después de 24 horas de incubación. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

La figura 4 es un análisis de transferencia Western de células de fibroblastos neonatales humanos tratadas con el compuesto 1 y muestra la activación y posterior inhibición de la expresión de las moléculas de señalización clave implicadas en la reparación y cicatrización de heridas.

La figura 5 es una representación fotográfica de los efectos de la exposición de los fibroblastos (cultivados en presencia de TGF- β 1) a un intervalo de concentraciones del compuesto 1 en la diferenciación a los miofibroblastos, caracterizada por el aumento de la expresión de la actina α del músculo liso y formación de fibras de estrés.

La figura 6 es una representación fotográfica de los efectos de la exposición de los fibroblastos (cultivados en presencia de TGF- β 1) a un intervalo de concentraciones del compuesto 37 en la diferenciación a los miofibroblastos, caracterizada por el aumento de la expresión de actina α del músculo liso y formación de fibras de estrés.

Ejemplos

Ejemplo 1: extractos de plantas

Todos los extractos de plantas se prepararon cortando el material vegetal y extrayéndolo con etanol en una proporción aproximada de 1 parte de material vegetal a entre 2 y 5 partes de etanol (p/p). El extracto se dejó reposar durante la noche a 4°C y luego el sobrenadante se decantó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

La presencia de compuestos epoxi-tiglicianos en los extractos de plantas se confirmó mediante LCMSMS usando un HPLC Shimadzu acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo ABI3200. Se empleó una columna haloamida C18 para separar los compuestos en las mezclas, usando mezclas de acetonitrilo/agua como sistema solvente.

ES 2 715 105 T3

La mayoría de las muestras se procesaron con el método KinC18Gen, usando una columna C18 Kinetix de 4.6 mm x 100 mm 2.6 micras C18:

Acetonitrilo:	55%	60%	75%	100%	100%	55%
Minutos:	0	2.5	15	15.1	17.5	17.6

Algunas de las muestras se procesaron con el método Amide Long usando una columna de haloamida RP 4.6 mm x 150 mm, 2.7 micras, de Advanced Materials Technology:

Acetonitrilo:	45%	58%	95%	95%	45%	45%
Minutos:	0	13	20	24	24.1	27

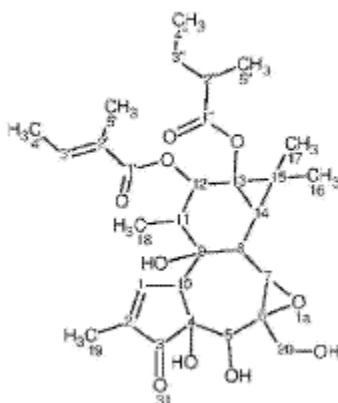
5 Ejemplo 2: Aislamiento y elucidación de compuestos epoxi-tigliano

Los compuestos se purificaron a partir de las semillas de *Fontainea picrosperma* mediante extracción y cromatografía en gel de sílice seguido de HPLC preparativa (columna C18, combinaciones de solventes metanol/agua) usando los métodos generales que se describen a continuación.

10 Aproximadamente 1-2 kg de material vegetal (hojas, frutos, semillas, tallos, raíces, flores, corteza o madera) se tritura finamente, se extrae con 2 partes de etanol (p/v) tres veces, los extractos combinados se evaporan y el residuo se repartió entre agua y un solvente orgánico inmiscible (generalmente, espíritu de petróleo, pe 40-60 (PE) o acetato de etilo EtOAc).

15 El residuo de la evaporación del solvente orgánico se somete a cromatografía en gel de sílice en mezclas de solventes de polaridad creciente, comenzando con PE o heptano y avanzando hasta EtOAc y luego metanol. Las fracciones de gel de sílice luego se purifican adicionalmente mediante HPLC preparativa en columnas C18 por lo general usando gradientes de metanol-agua. Las últimas fracciones se analizan para determinar la bioactividad, se agrupan según el tiempo de retención de los compuestos encontrados por HPLC analítica y se someten a una HPLC preparativa adicional para obtener compuestos puros. Cada compuesto es bioensayado y su estructura se confirma por técnicas de UV, RMN y de espectrometría de masas.

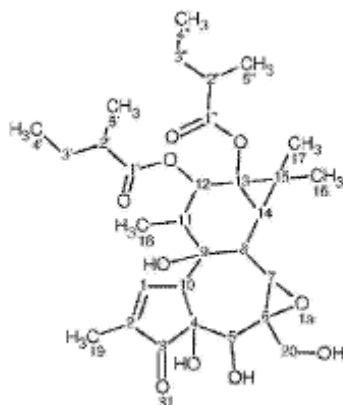
20 Compuesto 1: 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



25 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, J=6.4 Hz), 0.92 (3H (4''), t, J=7.3 Hz), 1.11 (3H (5''), d, J=6.8 Hz), 1.21 (3H (16), s), 1.24 (3H (17), s), 1.26 (1H (14), d, J=6.8 Hz), 1.43 (1H (3''), m, J=14.1, 7.3, 7.2 Hz), 1.69 (1H (3''), m), 1.73 (3H (19), dd, J=2.9, 1.5 Hz), 1.77 (3H (4'), dd, J=7.1, 1.2 Hz), 1.8 (3H (5'), d, J=1.5 Hz), 1.94 (1H (11), m), 2.37 (1H (2''), qt, J=7.0, 6.8 Hz), 3.17 (1H (8), d), 3.26 (1H (7), s), 3.69 (1H, OH, br.s), 3.80. (1H (20), d, J=12.7 Hz), 3.83 (1H (20), d, J=12.2.Hz), 4.06 (1H (10), t, J=2,7 Hz), 4.22 (1H (5), s), 5.42 (1H (12), d, J=9.8 Hz), 6.02 (1H, OH, br.s). 6.79 (1H (3'), m, J=7.2, 7.0, 1.2 Hz), 7.71 (1H, (1), dd).

30 ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 12.2 (5'), 14.4 (4'), 15.1 (18), 16.1 (5''), 17.2 (16), 23.6 (17), 26.1 (3''), 26.6 (15), 36.0 (8), 36.1 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 48.9 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.3 (5), 72.4 (4), 76.7 (12), 77.2 (9), 128.4 (2'), 133.4 (2), 137.6 (3'), 164.7 (1), 167.4 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

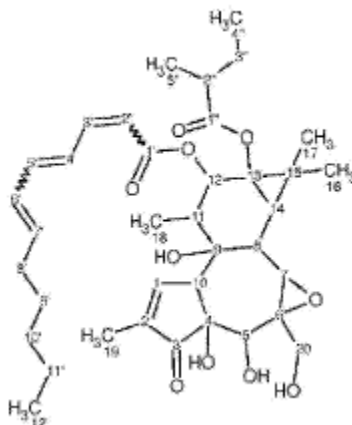
Compuesto 2: 12,13-di-(,2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 0.89 (3H (4''), $J=7.3$ Hz), 0.91 (3H (4'), t, $J=7.8$ Hz), 1.11 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.12 (3H (5'), d, $J=6.8$ Hz), 1.21 (3H (17), s), 1.22 (3H (16), s), 1.26 (1H (14), d, $J=6.8$ Hz), 1.44 (1H (3'), td, $J=13.9, 7.3$ Hz), 1.44 (1H (3''), td, $J=13.9, 7.3$ Hz), 1.63 (1H (3') dd, $J=7.8, 5.9$ Hz), 1.69 (1H (3''), dd, $J=13.9, 7.1$ Hz), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.7, 1.2$ Hz), 1.90 (1H (11), dd, $J=10.0, 6.6$ Hz), 2.36 (1H (2'), q, $J=7.0$ Hz), 2.36 (1H (2''), q, $J=7.0$ Hz), 3.16 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.61 (1H (OH), m), 3.78 (1H (20), m, $J=12.7$ Hz), 3.85 (1H (20), d, $J=12.2$ Hz), 4.06 (1H (10), t, $J=2.7$ Hz), 4.22 (1H (5), s), 5.40 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 5.98 (1H (9-OH), m), 7.71 (1H (1), dd, $J=2.4, 1.5$ Hz),

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4'), 11.6 (4''), 15.0 (18), 16.1 (5''), 170 (5'), 17.2 (17), 23.7 (16), 26.2 (3''), 26.5 (15), 26.7 (3'), 36.0 (8), 36.0 (14), 41.2 (2''), 41.8 (2'), 45.5 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.2 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.7 (1), 175.9 (1'), 178.8 (1''), 209.9 (3),

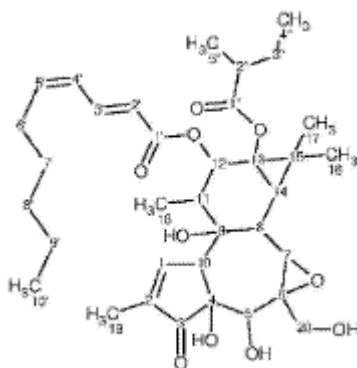
Compuesto 3: 12-[(2E,4E,6E)-dodeca-2,4,6-trienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.86 (3H (18), d, $J=7.0$ Hz), 0.87 (3H (12'), m, $J=7.0$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.24 (3H (16), s), 1.26 (2H (10'), m), 1.27 (1H (14), m), 1.29 (2H (11'), m), 1.39 (2H (9'), m), 1.45 (1H (3''), dd, $J=14.1, 7.0$ Hz), 1.71 (1H (3''), m), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.2$ Hz), 1.95 (1H (11), dq), 2.12 (2H (8'), q), 2.38 (1H (2''), sxt, $J=7.0$ Hz), 3.17 (1H (8), d, $J=6.7$ Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.57 (1H, (4-OH), s), (3.78 (1H (20), m), 3.86 (1H (20), m), 4.06 (1H (10), d, $J=2.7$ Hz), 4.22 (1H (5), s), 5.41 (1H (12), d), 5.79 (1H (2'), d, $J=15.2$ Hz), 5.92 (1H (7'), dt, $J=15.2, 7.2$ Hz), 6.04 (1H (OH), m), 6.11 (1H (6'), dd, $J=15.1, 10.7$ Hz), 6.19 (1H (4'), dd, $J=14.8, 11.2$ Hz), 6.51 (1H (5'), dd, $J=14.9, 1.0.7$ Hz), 7.23 (1H (3'), dd, $J=15.5, 1.0.9$ Hz), 7.72 (1H (1), dd, $J=2.4, 1.3$ Hz).

25 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (12'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 22.5 (11'), 23.6 (17), 26.2 (3''), 26.7 (15), 28.6 (9'), 31.4 (10'), 33.0 (8'), 36.0 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 48.9 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 76.7 (9), 77.1 (12), 119.5 (2'), 127.5 (4'), 129.7 (6'), 133.5 (2), 141.1 (7'), 141.7 (5'), 145.3 (3'), 164.8 (1), 166.6 (1'), 170.0 (1''), 210.0 (3).

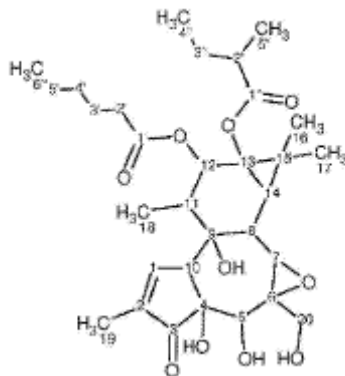
Compuesto 4: 12-[(2E,4Z)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 0.87 (3H (10'), s), 0.93 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.13 (3H (5''), d, $J=7.1$ Hz), 1.23 (3H (16), s), 1.25 (3H (17), s), 1.27 (1H (14), d, $J=1.6$ Hz), 1.27 (2H (9'), m), 1.30 (2H (8'), m), 1.40 (2H (7'), m), 1.46 (1H (3''), dd, $J=14.2, 6.9$ Hz), 1.71 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.95 (1H (11), d, $J=3.3$ Hz), 2.11 (1H (20-OH), m), 2.26 (2H (6'), m), 2.38 (1H (2''), q, $J=7.0$ Hz), 3.18 (1H (8), d, $J=6.6$ Hz), 3.28 (1H (7), s), 3.53 (1H (4-OH), d, $J=0.9$ Hz), 3.77 (1H (20), m), 3.81 (1H (5-OH), d, $J=2.9$ Hz), 3.87 (1H (20), dd, $J=12.4, 7.6$ Hz), 4.06 (1H (10), d, $J=2.7$ Hz), 4.22 (1H (5), d, $J=1.7$ Hz), 5.43 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.83 (1H (2'), d, $J=15.2$ Hz), 5.86 (1H (5'), ddd, $J=10.8, 7.9, 7.8$ Hz), 6.03 (1H (9-OH), m), 6.10 (1H (4'), td, $J=11.2, 0.7$ Hz), 7.56 (1H (3'), ddd, $J=15.3, 11.7, 1.1$ Hz), 7.72 (1H (1), dd, $J=2.5, 1.4$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (10'), 15.2 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 22.5 (9'), 23.7 (16), 26.2 (3''), 26.7 (15), 28.3 (6'), 29.0 (7'), 31.4 (8'), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.8 (12), 77.1 (9), 120.8 (2), 126.4 (4'), 133.5 (2), 140.0 (3'), 142.2 (5'), 164.8 (1), 166.6 (1'), 179.0 (1''), 210.0 (3).

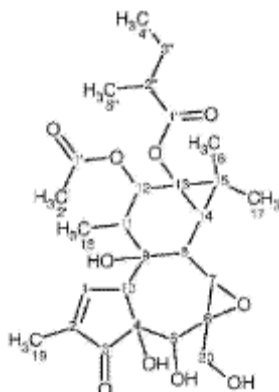
Compuesto 5: 12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.5$ Hz), 0.87 (3H (6'), t, $J=7.0$ Hz), 0.91 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.11 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.21 (3H (16), s), 1.21 (3H (17), s), 1.25 (1H (14), d, $J=6.6$ Hz), 1.43 (1H (3''), m, $J=14.1, 7.4, 7.1$ Hz), 1.60 (2H (3'), quin, $J=7.4$ Hz), 1.70 (1H (3''), ddd, $J=13.9, 7.3, 7.1$ Hz), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.9 (1H (11), dq, $J=10.0, 6.5$ Hz), 2.27 (2H (2'), dt, $J=7.4, 3.7$ Hz), 1.29 (2H (4'), m, $J=7.5, 7.2, 3.9$ Hz), 1.29 (2H (5'), m, $J=7.5, 7.2, 3.9$ Hz), 2.36 (1H (2''), sxt, $J=7.0$ Hz), 3.14 (1H (8), d, $J=6.6$ Hz), 3.25 (1H (7), s), 3.64 (1H (OH), s), 3.83 (1H (OH), dd, $J=12.5, 7.9$ Hz), 3.79 (2H (20), dd, $J=12.5, 5.7$ Hz), 3.94 (1H (OH), d, $J=2.5$ Hz), 4.06 (1H (10), t, $J=2.6$ Hz), 4.22 (1H (5), s), 5.37 (1H (12), d, $J=10.0$ Hz), 5.95 (1H (OH), br. s.) 7.7 (1H (1), dd, $J=2.4, 1.3$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 13.9 (6'), 15.0 (18), 16.1 (5''), 17.1 (16), 22.3 (5'), 23.6 (17), 24.9 (3'), 26.2 (3''), 26.6 (15), 31.1 (4'), 34.5 (2'), 35.96 (8), 36.04 (14), 41.2 (2''), 45.6 (11), 48.9 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.4 (5), 72.4 (4), 76.5 (12), 77.1 (9), 133.4 (2), 164.6 (1), 173.3 (1'), 178.8 (1''), 209.9 (3),

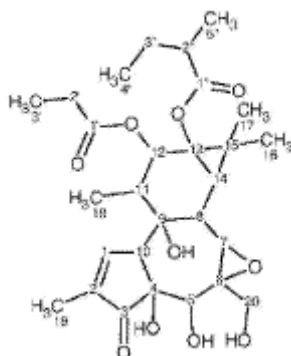
25 Compuesto 6: 12-acetil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.6$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.21 (3H (16), s), 1.23 (3H (17), s), 1.25 (1H (14), d, $J=6.8$ Hz), 1.44 (1H (3''), m, $J=14.1, 7.3, 7.2$ Hz), 1.71 (1H (3''), dd), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.0$ Hz), 1.91 (1H (11), m), 2.04 (3H (2'), s), 2.36 (1H (2''), m, $J=7.0, 6.8$ Hz), 3.14 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.78 (1H (20), d, $J=12.7$ Hz), 3.85 (1H (20), d, $J=12.7$ Hz), 4.04 (1H (10), t, $J=2.7$ Hz), 4.21 (1H (5), s), 5.33 (1H (12), d, $J=9.8$ Hz), 7.7 (1H (1), s).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.1 (16), 21.0 (2'), 23.7 (17), 26.2 (3''), 26.7 (15), 36.0 (8), 36.1 (14), 41.2 (2''), 45.7 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.8 (9), 77.1 (12), 133.5 (2), 164.6 (1), 170.6 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

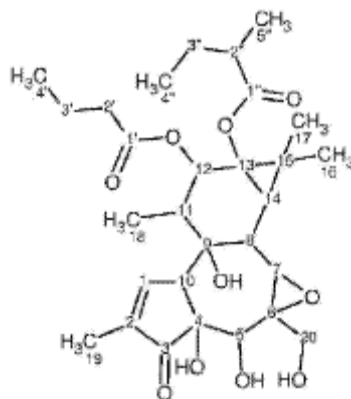
10 Compuesto 7: 12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.6$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.3$ Hz), 1.13 (3H (3'), t), 1.21 (3H (16), s), 1.22 (3H (17), s), 1.25 (1H (14), dd, $J=10.3, 6.8$ Hz), 1.44 (1H (3''), m, $J=14.0, 7.0, 6.6$ Hz), 1.70 (1H (3''), dd, $J=14.2, 6.8$ Hz), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.5$ Hz), 1.91 (1H (11), m), 2.31 (2H (2'), m), 2.37 (1H (2''), dd, $J=13.7, 6.8$ Hz), 3.15 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.78 (1H (20), d, $J=12.2$ Hz), 3.84 (1H (20), d, $J=12.7$ Hz), 4.05 (1H (10), m), 4.21 (1H (5), s), 5.35 (1H (12), d, $J=9.8$ Hz), 5.92 (1H (OH), br.s.), 7.71 (1H (1), m).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.3 (3'), 9.7 (19), 11.6 (4''). 15.1 (18), 16.1 (5''), 17.1 (16), 23.7 (17), 26.2 (3''), 26.7 (15), 27.8 (2'), 36.0 (8), 36.1 (14), 41.2 (2''), 45.7 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.8 (12), 77.1 (9), 133.5 (2), 164.6 (1), 173.9 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

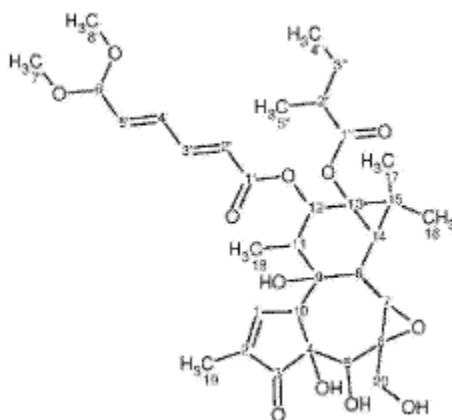
20 Compuesto 8: 12-butanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, *J*=6.4 Hz), 0.92 (3H (4''), t, *J*=7.6 Hz), 0.94 (3H (4'), t, *J*=7.3 Hz), 1.12 (3H (5''), d), 1.22 (3H (16), s), 1.23 (3H (17), s), 1.26 (1H (14), d, *J*=6.8 Hz), 1.45 (1H (3''), dq, *J*=14.0, 7.1 Hz), 1.64 (2H (3'), m, *J*=14.6, 7.2, 7.1 Hz), 1.71 (1H (3''), dd, *J*=13.7, 6.8 Hz), 1.75 (3H (19), d, *J*=2.9 Hz), 1.90 (1H (11), dd, *J*=10.0, 6.6 Hz), 2.27 (2H (2'), m), 2.37 (1H (2''), qt, *J*=7.0, 6.8 Hz), 3.15 (1H (8), d, *J*=6.4 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.77 (1H (20), m, *J*=12.2 Hz), 3.86 (1H (20), m, *J*=12.7 Hz), 4.05 (1H (10), d, *J*=2.4 Hz), 4.21 (1H (5), s), 7.71 (1H (1), dd, *J*=2.4, 1.0 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''). 13.5 (4'), 15.1 (18), 16.1 (5''). 17.1 (16), 18.7 (3''), 23.7 (17), 26.2 (3''), 26.6 (15), 36.0 (8), 36.1 (14), 36.4 (2'), 41.2 (2''), 45.6 (11), 48.9 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.6 (12). 77.1 (9), 133.5 (2), 164.7 (1), 173.1 (1'), 178.8 (1''), 209.9 (3).

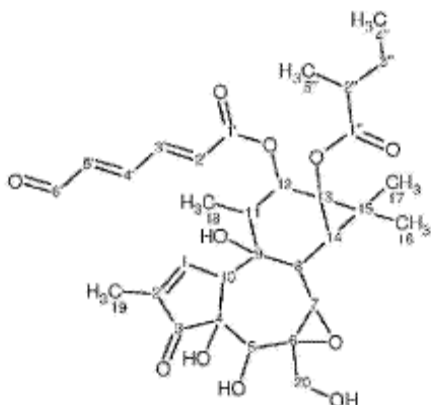
Compuesto 9:12-[(2*E*,4*E*)-(6,6-dimetoxihexa-2.4-dienoyl)]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d, *J*=6.4 Hz), 0.92 (3H (4''), t, *J*=7.3 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=6.8 Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.24 (3H (16), s), 1.27 (1H (14), dd, *J*=11.2, 6.8 Hz), 1.44 (1H (3''), m), 1.72 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.9, 1.5 Hz), 1.96 (1H (11), dd, *J*=10.0, 6.6 Hz), 2.37 (1H (2''), m), 3.17 (1H (8), d, *J*=6.8 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.31 (3H (7'), s), 3.31 (3H (8'), s), 3.79 (1H (20), m, *J*=12.2 Hz), 3.86 (1H (20), m), 4.06 (1H (10), br. s.), 4.22 (1H (5), d, *J*=2.4 Hz), 4.89 (1H (6'), dd, *J*=4.4, 1.0 Hz), 5.42 (1H (12), d, *J*=9.8 Hz), 5.91 (1H (2'), d, *J*=15.7 Hz), 5.98 (1H (5'), dd, *J*=15.7, 4.4 Hz), 6.47 (1H (4'), dd, 15.6, 11.2 Hz), 7.21 (1H (3'), dd, *J*=15.6, 11.2 Hz), 7.71 (1H (1), s).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 23.6 (16), 26.2 (3''), 26.8 (15), 36.0 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.8 (11), 48.9 (10), 52.7 (7'), 52.7 (8'), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 77.1 (9), 77.1 (12), 101.3 (6'), 122.8 (2'), 131.0 (4'), 133.5 (2), 137.9 (5'), 143.4 (3'), 164.7 (1), 166.1 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

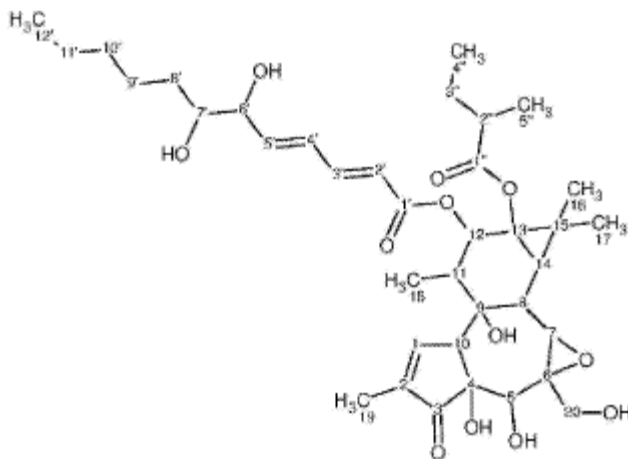
Compuesto 10:12-[(2*E*,4*E*)-6-oxohexa-2.4-dienoyl]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 0.93 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.13 (3H (5''), d, $J=7.1$ Hz), 1.24 (3H (17), s), 1.25 (3H (16), s), 1.28 (1H (14), m), 1.46 (1H (3''), td, $J=14.1, 7.3$ Hz), 1.70 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.2$ Hz), 1.99 (1H (11), dddd, $J=9.8, 6.5, 6.4, 6.1$ Hz), 2.38 (1H (2''), d, $J=6.8$ Hz), 3.19 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.28 (1H (7), s), 3.77 (1H (20), m, $J=12.5$ Hz), 3.87 (1H (20), d, $J=13.0$ Hz), 4.06 (1H (10), d, $J=2.7$ Hz), 4.22 (1H (5), s), 5.46 (1H (12), d, $J=9.8$ Hz), 6.28 (1H (2'), d, $J=15.4$ Hz), 6.40 (1H (5'), dd, $J=15.4, 7.8$ Hz), 7.14 (1H (4'), dd, $J=14.9, 11.2$ Hz), 7.36 (1H (3'), dd, $J=15.4, 11.2$ Hz), 7.71 (1H (1), dd, $J=2.6, 1.3$ Hz), 9.66 (1H (6'), d, $J=7.6$ Hz).

10 $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 15.2 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 23.6 (17), 26.2 (3''), 26.9 (15), 36.0 (8), 36.3 (14), 41.2 (2''), 45.8 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.1 (7), 65.3 (13), 71.6 (5), 72.3 (4), 77.1 (9), 78.2 (12), 129.4 (2'). 133.6 (2), 137.2 (5'), 140.8 (3'), 146.9 (4'), 164.4 (1), 165.0 (1'), 178.9 (1''), 192.8 (6'), 209.8 (3).

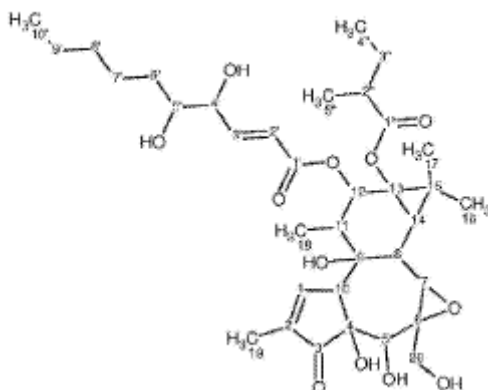
Compuesto 11: 12-[(2E,4E)-6,7-dihydroxidodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,3,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, $J=2.0$ Hz), 0.87 (3H (12'), d, $J=2.0$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.3$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.24 (3H (16), s), 1.28 (1H (14), d, $J=6.4$ Hz), 1.28 (2H (11'), d, $J=6.4$ Hz), 1.44 (2H (8'), d, $J=6.8$ Hz), 1.46 (1H (3''), d, $J=6.8$ Hz), 1.47 (2H (9'), d, $J=2.9$ Hz), 1.69 (1H (3''), m), 1.76 (3H (19), m), 1.95 (1H (11), dd, $J=9.5, 6.6$ Hz), 2.38 (1H (2''), dq, $J=13.7, 6.8$ Hz), 3.17 (1H (8), d, $J=6.4$ Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.49 (1H (7'), br. s.), 3.60 (1H (OH), s), 3.82 (2H (20),), 4.03 (1H (6'), m), 4.06 (1H (10), br. s.), 4.22 (1H (5), d, $J=2.9$ Hz), 5.42 (1H (12), d, $J=9.8$ Hz), 5.88 (1H (2'), d, $J=15.2$ Hz), 6.08 (1H (OH), t, $J=6.1$ Hz), 6.11 (1H (5'), t, $J=6.1$ Hz), 6.43 (1H (OH), m), 6.47 (1H (4'), m), 7.21 (1H (OH), dd, $J=13.2, 2.0$ Hz), 7.24 (1H (3'), s), 7.71 (1H (1), s),

20 $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (12'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 22.6 (11'), 23.6 (17), 25.3 (9'), 26.2 (3''), 26.8 (15), 31.7 (10'), 33.1 (8'), 36.0 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.8 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 74.5 (7'), 75.1 (6'), 77.1 (9), 77.1 (12), 133.5 (2), 121.8 (2'), 129.7 (4'), 141.6 (5'), 143.8 (3'), 164.6 (1), 166.2 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

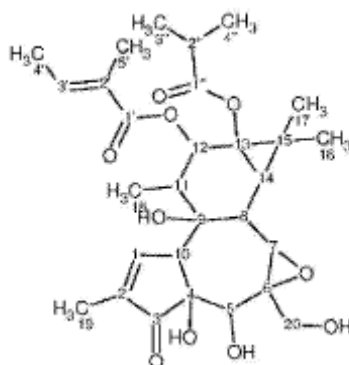
25 Compuesto 12: 12-[(2E)-4,5-dihidroxi-deca-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d), 0.87 (3H (10'), t), 0.93 (3H (4''), t, *J*=7.5 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=7.0 Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.23 (3H (16), s), 1.26 (2H (9'), m), 1.27 (1H (14), m), 1.28 (2H (8'), m), 1.30 (1H (7'), m), 1.42 (2H (6'), m), 1.44 (1H (3''), m), 1.46 (1H (7''), m), 1.70 (1H (3''), m), 1.74 (3H (19), d, *J*=1.6 Hz), 1.95 (1H (11), m), 2.37 (1H (2''), m), 3.16 (1H (8), d, *J*=6.5 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.75 (1H (5'), m), 3.77 (1H (20), m), 3.85 (1H (20), d, *J*=19.3 Hz), 4.05 (1H (10), br. s.), 4.21 (1H (5), s), 4.32 (1H (4'), m), 5.41 (1H (12), d, *J*=9.5 Hz), 6.11 (1H (2'), dd, *J*=8.8, 1.8 Hz), 6.92 (1H (3'), dd, *J*=4.9, 1.6 Hz), 7.71 (1H (1), dd),

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14 (10'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 22.5 (9'), 23.7 (17), 25.5 (7'), 26.2 (3''), 26.8 (15), 31.7 (8'), 32.0 (6'), 36.0 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.8 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.6 (5), 72.3 (4), 73.9 (4'), 74.1 (5'), 77.1 (12), 77.3 (9), 122.5 (2'), 133.6 (2), 145.9 (3'), 164.6 (1), 165.5 (1'), 179 (1''), 209.9 (3).

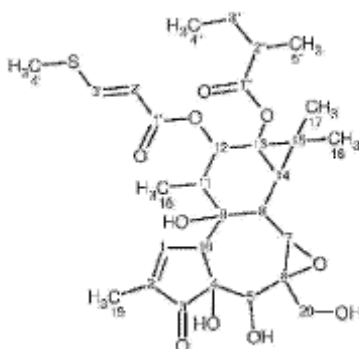
Compuesto 13: 12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,1,3,20-hexahidroxi-4-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, *J*=6.4 Hz), 1.14 (3H (4''), d, *J*=7.3 Hz), 1.17 (3H (3''), d, *J*=6.8 Hz), 1.22 (3H (16), s), 1.24 (3H (17), s), 1.28 (1H (8), m), 1.74 (3H (19), s), 1.77 (3H (4'), d, *J*=7.3 Hz), 1.95 (1H (11), dd, *J*=10.0, 6.6 Hz), 2.56 (1H, (2''), m, *J*=7.3, 7.1, 7.0 Hz), 3.16 (1H (14), d, *J*=6.4 Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.82 (2H (20), m), 4.06 (1H (10), br. s.), 4.22 (1H (5), d, *J*=2.4 Hz), 5.41 (1H (12), d, *J*=9.8 Hz), 6.80 (1H (3'), m), 7.71 (1H (1), s),

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 12.2 (5'), 14.4 (4'), 15.1 (18), 17.2 (17), 18.5 (3''), 18.6 (4''), 23.7 (16), 26.5 (15), 34.1 (2''), 36.0 (8), 36.1 (14), 45.8 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.4 (5), 72.4 (4), 76.6 (12), 77.2 (9), 128.4 (2'), 133.4 (2), 137.6 (3'), 164.7 (1), 167.5 (1'), 179.3 (1''), 209.9 (3).

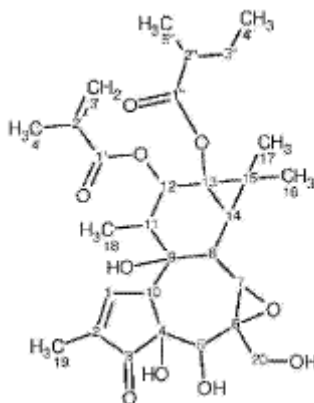
Compuesto 14: 12-[(2E)-3-metiltioprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d, *J*=6.4 Hz), 0.92 (3H (4''), 1, *J*=7.3 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=6.8 Hz), 1.23 (3H (17), s), 1.24 (3H (16), s), 1.27 (1H (14), d, *J*=6.8 Hz), 1.44 (1H (3''), m), 1.71 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), s), 1.94 (1H (11), m), 2.14 (1H (OH), t, *J*=5.9 Hz), 2.32 (3H (4'), s), 2.38 (1H (2''), m), 3.16 (1H (8), d, *J*=6.8 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.55 (1H (4-OH), s), 3.78 (1H (20), dd, *J*=12.7, 5.9 Hz), 3.84 (1H (5-OH), s), 3.85 (1H (20), s), 4.05 (1H (10), m), 4.21 (1H (5), d, *J*=2.4 Hz), 5.41 (1H (12), d, *J*=9.8 Hz), 5.61 (1H (2'), d, *J*=14.7 Hz), 6.02 (1H (9-OH), m), 7.69 (1H (3'), d, *J*=14.7 Hz), 7.71 (1H (1), s),

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''). 14.3 (4'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 23.7 (17), 26.2 (3''), 26.7 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.4 (4), 76.8 (12), 77.1 (9), 112.8 (2'), 133.5 (2), 147.5 (3'), 164.5 (1'), 164.8 (1), 178.9 (1''), 210.0 (3).

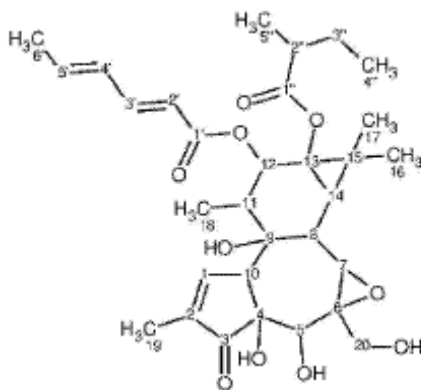
Compuesto 15: 12-(2-metilprop-2-enoil)-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d), 0.92 (3H (4''), t, *J*=7.3 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=6.8 Hz), 1.23 (3H (17), br. s.), 1.25 (3H (16), s), 1.27 (1H (14), dd, *J*=11.2, 6.4 Hz), 1.45 (1H (3''), m), 1.72 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.9, 1.0 Hz), 1.92 (3H (4'), s), 1.95 (1H (11), m), 2.38 (1H (2''), m), 3.18 (1H (8), d), 3.28 (1H (7), s), 3.54 (1H (OH), d, *J*=1.0 Hz), 3.78 (1H (20), m), 3.87 (1H (20), dd), 4.06 (1H (10), m), 4.22 (1H (5), d, *J*=2.0 Hz), 5.42 (1H (12), s), 5.56 (1H (3'), dt, *J*=2.9, 1.5 Hz), 6.05 (1H (3'), m), 7.72 (1H (1), dd, *J*=2.4, 1.5 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 18.5 (4'), 23.7 (16), 26.2 (3''), 26.7 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 77.1 (9), 77.3 (12), 125.8 (3'), 133.5 (2), 136.2 (2'), 164.7 (1), 166.8 (1'), 178.9 (1''), 209.9 (3).

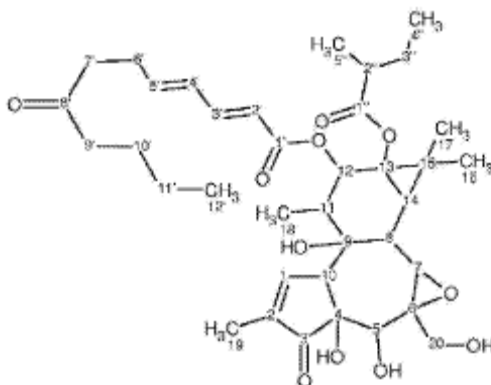
Compuesto 16: 12-[(2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, *J*=6.5 Hz), 0.93 (3H (4''), t), 1.13 (3H (5''), m, *J*=6.8 Hz), 1.23 (3H (16), br. s.), 1.26 (3H (17), s), 1.27 (1H (14), m), 1.45 (1H (3''), s), 1.70 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.8, 1.2 Hz), 1.86 (3H (6'), dd, *J*=7.3, 1.7 Hz), 1.96 (1H (11), dd, *J*=9.8, 6.2 Hz), 2.37 (1H (2''), m), 3.18 (1H (8), d, *J*=6.7 Hz), 3.28 (1H (7), s), 3.78 (1H (20), m), 3.87 (1H (20), m), 4.06 (1H (10), br. s.), 4.21 (1H (5), br. s.), 5.44 (1H (12), d, *J*=10.1 Hz), 5.83 (1H (2'), d, *J*=15.0 Hz), 5.94 (1H (5'), m), 6.14 (1H (4'), m), 7.59 (1H (3'), ddd, *J*=15.3, 11.7, 1.2 Hz), 7.72 (1H (1), dd, *J*=2.2, 1.3 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.1 (6'), 15.2 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 23.7 (16), 26.2 (3''), 26.7 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.4 (4), 76.8 (12), 77.1 (9), 120.7 (2'), 127.3 (4'), 133.5 (2), 136.2 (5'), 139.6 (3'), 164.8 (1), 166.6 (1'), 179.0 (1''), 210.0 (3).

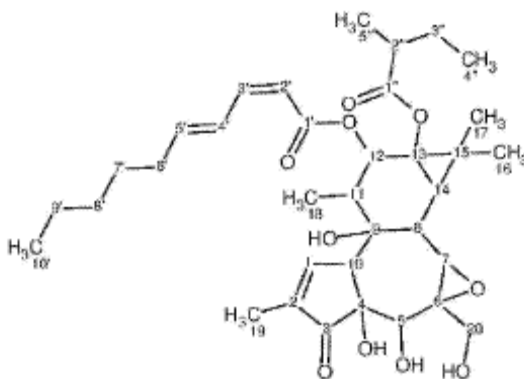
Compuesto 17: 12-[(2*E*,4*E*)-8-oxododeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, *J*=5.3 Hz), 0.88 (3H (12'), t, *J*=7.3 Hz), 0.92 (3H (4''), t, *J*=7.4 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=7.0 Hz), 1.22 (3H (16), br. s.), 1.23 (3H (17), s), 1.26 (1H (14), d, *J*=5.4 Hz), 1.28 (2H (11'), d, *J*=2.8 Hz), 1.43 (1H (3''), br. s.), 1.53 (2H (10'), m), 1.71 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.9, 1.3 Hz), 1.95 (1H (11), m), 2.37 (1H (2''), m), 2.38 (2H (9'), d, *J*=7.2 Hz), 2.42 (2H (6'), m), 2.52 (2H (7'), s), 3.17 (1H (8), d, *J*=6.6 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.53 (1H (OH), s), 3.81 (1H (20), br. s.), 3.86 (1H (20), m), 4.05 (1H (10), m), 4.22 (1H (5), d, *J*=2.4 Hz), 5.41 (1H (12), d, *J*=9.8 Hz), 5.76 (1H (2'), d, *J*=15.4 Hz), 6.09 (1H (5'), t, *J*=6.8 Hz), 6.15, (1H (4'), d, *J*=10.6 Hz), 7.16 (1H (3'), dd, *J*=15.4, 10.6 Hz), 7.71 (1H (1), dd, *J*=2.6, 1.3 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 13.8 (12'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 22.3 (11'), 23.7 (16), 25.9 (10'), 26.2 (3''), 26.7 (15), 26.9 (6'), 36.1 (8), 36.1 (14), 41.2 (2''), 41.3 (7'), 42.7 (9'), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 77.1 (12), 77.2 (9), 119.6 (2'), 129.1 (4'), 133.5 (2), 142.8 (5'), 145.0 (3'), 164.8 (1), 166.6 (1'), 179.0 (1''), 209.7 (8'), 210.1 (3).

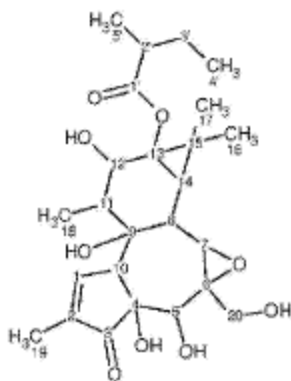
Compuesto 18: 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.86 (3H (10'), t, $J=6.9$ Hz), 0.87 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.94 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.14 (3H (5''), d, $J=7.1$ Hz), 1.22 (3H (16), s), 1.23 (3H (17), s), 1.25 (1H (14), br. s.), 1.27 (2H (8'), br. s.), 1.28 (2H (9'), br. s.), 1.41 (2H (7''), m), 1.46 (1H (3''), m), 1.71 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.94 (1H (11), dd, $J=10.0, 6.4$ Hz), 2.16 (2H (6'), s), 2.39 (1H (2''), m, $J=7.2, 7.0$ Hz), 3.16 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.53 (1H (4-OH), d, $J=0.6$ Hz), 3.77 (1H (20), dd, $J=12.7, 5.7$ Hz), 3.83 (1H (5-OH), d, $J=3.1$ Hz), 3.86 (1H (20), m, $J=12.6, 7.7$ Hz), 4.05 (1H (10), t, $J=2.7$ Hz), 4.21 (1H (5), d, $J=2.9$ Hz), 5.43 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.51 (1H (2'), d, $J=11.4$ Hz), 6.06 (1H (5'), ddd, $J=15.1, 7.2, 6.8$ Hz), 6.55 (1H (3''), t, $J=11.6$ Hz), 7.29 (1H (4'), ddd, $J=15.1, 7.2, 6.8$ Hz), 7.72 (1H (1), dd, $J=2.3, 1.3$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (10'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.1 (16), 22.5 (9'), 23.7 (17), 26.2 (3''), 26.6 (15), 28.3 (7'), 31.4 (8'), 33.0 (6'), 36.0 (14), 36.1 (8), 41.2 (2''), 45.8 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.1 (12), 77.1 (9), 115.0 (2'), 126.9 (4'), 145.9 (3'), 146.1 (5'), 133.5 (2), 164.8 (1), 165.9 (1'), 178.9 (1''), 210.0 (3).

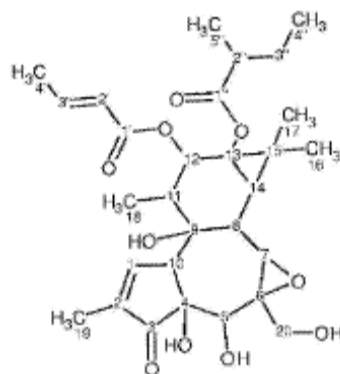
Compuesto 19:13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.92 (3H (4'), t, $J=7.6$ Hz), 1.07 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 1.16 (3H (5'), d, $J=6.8$ Hz), 1.20 (3H (16), s), 1.24 (1H (14), m), 1.26 (3H (17), s), 1.45 (1H (3'), ddd, $J=13.8, 7.1, 7.0$ Hz), 1.71 (1H (3'), dt, $J=13.7, 7.3$ Hz), 1.76 (1H (11), d, $J=15.7$ Hz), 1.77 (3H (19), dd, $J=2.7, 1.2$ Hz), 2.41 (1H (2'), m, $J=7.0, 6.8$ Hz), 3.08 (1H (8), d, $J=7.3$ Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.79 (1H (10), d, $J=2.9$ Hz), 3.81 (2H (20), m), 3.90 (1H (12), d, $J=9.8$ Hz), 4.20 (1H (5), s), 7.70 (1H (1), dd, $J=2.4, 1.5$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.8 (19), 11.7 (4'), 16.6 (5'), 16.2 (18), 17.2 (17), 23.4 (16), 26.5 (3'), 27.9 (15), 34.8 (14), 36.5 (8), 41.0 (2'), 47.3 (11), 50.7 (10), 62.4 (6), 65.0 (20), 66.0 (7), 68.4 (13), 71.5 (5), 72.1 (4), 77.6 (9), 78.3 (12), 133.9 (2), 163.8 (1), 180.1 (1'), 209.7 (3).

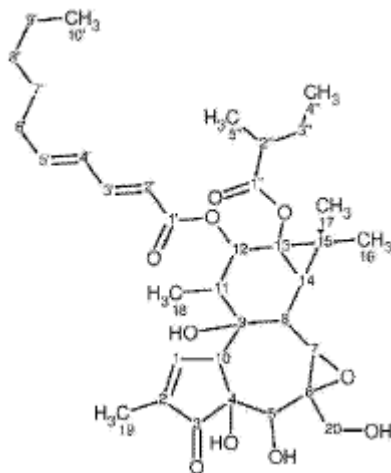
Compuesto 20: 20:12-[(2E)-but-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, *J*=6.4 Hz), 0.92 (3H (4''), t, *J*=7.5 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=7.1 Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.24 (3H (16), s), 1.26 (1H (14), d, *J*=6.7 Hz), 1.45 (1H (3''), dd, *J*=14.5, 6.4 Hz), 1.72 (1H (3''), dd, *J*=14.1, 6.8 Hz), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.8, 1.3 Hz), 1.87 (3H (4'), dd, *J*=6.9, 1.7 Hz), 1.94 (1H (11), dd, *J*=9.8, 6.4 Hz), 2.37 (1H (2''), dd, *J*=13.8, 6.8 Hz), 3.16 (1H (8), d, *J*=6.5 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.78 (1H (20), d, *J*=12.2 Hz), 3.87 (1H (20), m), 4.05 (1H (10), m), 4.21 (1H (5), s), 5.40 (1H (12), d, *J*=9.9 Hz), 5.81 (1H (2'), dddd, *J*=15.5, 1.6, 1.5, 1.2 Hz), 6.92 (1H (3'), dd, *J*=15.5, 7.0 Hz), 7.71 (1H (1), m).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 18.1 (4'), 23.7 (16), 26.2 (3''), 26.7 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.7 (12), 77.1 (9), 122.6 (2'), 133.6 (2), 145.0 (3'), 164.8 (1), 166.1 (1'), 178.9 (1''), 210.2 (3).

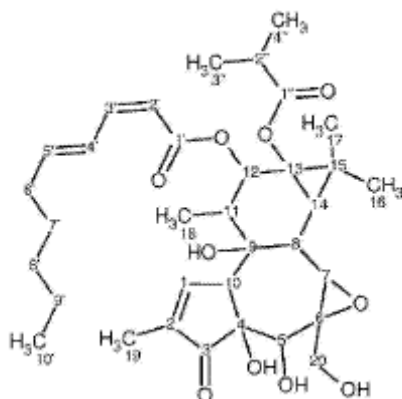
Compuesto 24: 12-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d, *J*=5.6 Hz), 0.87 (3H (10'), d, *J*=11.7 Hz), 0.93 (3H (4''), t, *J*=7.5 Hz), 1.12 (3H (5''), d, *J*=7.0 Hz), 1.22 (3H (16), s), 1.24 (3H (17), s), 1.26 (1H (14), m), 1.26 (2H (8'), br. s.), 1.29 (2H (9'), m), 1.45 (1H (3''), m), 1.41 (2H (7'), m), 1.73 (1H (3''), m), 1.75 (3H (19), dd, *J*=2.9, 1.3 Hz), 1.95 (1H (11), dd, *J*=9.7, 6.4 Hz), 2.15 (2H (6'), m), 2.38 (1H (2''), m), 3.17 (1H (8), d, *J*=6.6 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.55 (1H (OH), m), 3.78 (1H (20), dd, *J*=12.0, 4.6 Hz), 3.87 (1H (20), m), 4.05 (1H (10), m), 4.22 (1H (5), m), 5.41 (1H (12), d, *J*=9.9 Hz), 5.75 (1H (2'), d, *J*=15.4 Hz), 6.13 (1H (5'), dd, *J*=6.7, 6.2 Hz), 6.16 (1H (4'), s), 7.20 (1H (3'), dd, *J*=1.5, 9.9 Hz), 7.72 (1H (1), dt, *J*=2.5, 1.3 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (10'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (17), 22.4 (9'), 23.6 (16), 26.2 (3''), 26.7 (15), 28.4 (7'), 31.3 (8'), 33.0 (6'), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.7 (12), 77.1 (9), 118.8 (2'), 128.3 (4'), 133.5 (2), 145.3 (5'), 145.6 (3'), 164.8 (1), 166.6 (1'), 178.9 (1''), 210.0 (3).

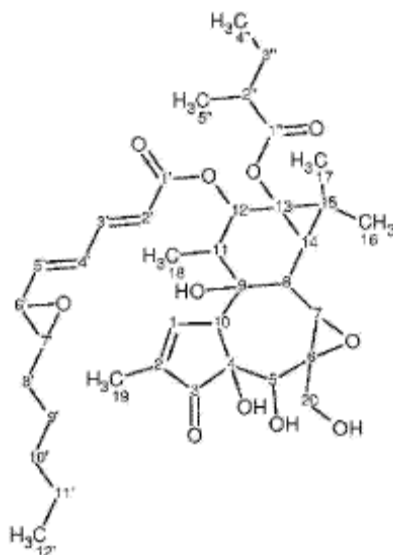
Compuesto 25: 12-[(2*Z*,4*E*)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.85 (3H (18), d), 0.86 (3H (10'), t), 1.16 (3H (4''), d), 1.19 (3H (3''), d, $J=7.0$ Hz), 1.22 (3H (16), s), 1.22 (3H (17), s), 1.25 (2H (8'), m), 1.27 (1H (14), (d, $J=3.1$ Hz), 1.29 (2H (9'), m), 1.4] (2H (7'), br. s.), 1.75 (3H (19), s), 1.94 (1H (11), dd, $J=10.0, 6.4$ Hz), 2.16 (2H (6'), s), 2.58 (1H (2''), dt, $J=1.4, 7.0$ Hz), 3.16 (1H (8), d, $J=6.7$ Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.55 (1H (OH), br. s), 3.78 (1H (20), d, $J=12.5$ Hz), 3.86 (1H (20), d, $J=13.1$ Hz), 4.05 (1H (10), d, $J=5.4$ Hz), 4.21 (1H (5), s), 5.41 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.51 (1H (2'), d, $J=11.2$ Hz), 6.06 (1H (5'), dd, $J=15.3, 7.0$ Hz), 6.55 (1H (3'), t, $J=11.4$ Hz), 7.29 (1H (4'), dd, $J=15.3, 7.0$ Hz), 7.71 (1H (1), s),

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 14.7 (10'), 15.1 (18), 17.1 (16), 18.6 (3''), 18.6 (4''), 22.5 (9'), 23.7 (17), 26.6 (15), 28.4 (7'), 31.4 (8'), 33.0 (6'), 34.2 (2''), 36.0 (14), 36.1 (8), 45.7 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.5 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 76.0 (12), 77.2 (9), 115.0 (2'), 126.9 (4'), 133.5 (2), 145.9 (3'), 146.2 (5'), 164.8 (1), 165.9 (1'), 179.3 (1''), 210.0 (3).

Compuesto 26: 12-[(2E,4E)-6,7-(anti)-epoxi-dodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,3,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tiglaen-3-ona



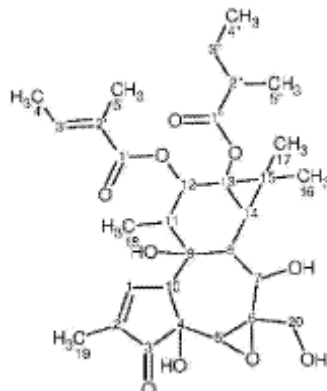
15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, $J=4.4$ Hz), 0.86 (3H (12'), br. s.), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.3$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.22 (3H (17), br. s.), 1.24 (3H (16), s), 1.27 (1H (14), d, $J=7.3$ Hz), 1.28 (2H (11'), m), 1.29 (2H (10'), m), 1.44 (2H (9'), m), 1.57 (2H (8'), m), 1.72 (2H (3''), dd, $J=13.9, 7.1$ Hz), 1.75 (3H (19), d, $J=1.5$ Hz), 1.95 (1H (11), m), 2.37 (1H (2''), m), 2.85 (1H (7'), tt, $J=5.6, 2.0$ Hz), 3.15 (1H (6'), d, $J=7.8$ Hz), 3.17 (1H (8), s), 3.28 (1H (7), s), 3.52 (1H (OH), d, $J=2.9$ Hz), 3.76 (1H (OH), m), 3.79 (1H (20), d, $J=2.9$ Hz), 3.87 (1H (20), m), 4.05 (1H (10), d, $J=2.0$ Hz), 4.22 (1H (5), d), 5.42 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 5.83 (1H (5'), d, $J=15.2, 7.8$ Hz), 5.87 (1H (2'), d, $J=15.7$ Hz), 6.00 (1H (OH), m), 6.47 (1H (4'), dd, $J=14.7, 11.2$ Hz), 7.20 (1H (3'), dd, $J=15.2, 11.2$ Hz), 7.71 (1H (1), br. s.).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.0 (12'), 15.1 (18), 16.2 (5''), 17.2 (16), 22.5 (11'), 23.7 (17), 25.5 (9'), 26.2 (3''), 26.8 (15), 31.5 (10'), 31.9 (8'), 36.1 (8), 36.2 (14), 41.2 (2''), 45.9 (11), 49.0 (10), 57.5 (6'), 61.6 (7'), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.4 (13), 71.7 (5), 72.3 (4), 77.1 (9), 77.1 (12), 121.6 (2'), 130.9 (4'), 133.5 (2), 139.7 (5'), 143.3 (3'), 164.7 (1), 166.2 (1'), 179.0 (1''), 210.1 (3).

25

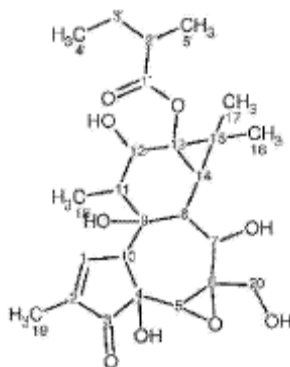
ES 2 715 105 T3

Compuesto 29: 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



- 5 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.83 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.6$ Hz), 1.13 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.20 (1H (14), d, $J=5.9$ Hz), 1.22 (3H (17), s), 1.23 (3H (16), s), 1.45 (1H (3''), tt, $J=14.2, 7.3$ Hz), 1.72 (1H (3''), dd), 1.77 (3H (5'), dd, $J=7.1, 1.2$ Hz), 1.80 (3H (4'), d, $J=1.5$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.5$ Hz), 2.11 (1H (11), dq), 2.29 (1H (8), d, $J=5.4$ Hz), 2.38 (1H (2''), m, $J=7.0, 6.8$ Hz), 2.47 (1H (20-OH), t, $J=6.8$ Hz), 2.98 (1H (4-OH), s), 3.53 (1H (10), m), 3.73 (1H (5), d, $J=1.0$ Hz), 3.81 (1H (20), dd, $J=12.7, 6.8$ Hz), 3.92 (1H (2.0), m, $J=12.7, 6.8$ Hz), 4.46 (1H (7), d, $J=5.4$ Hz), 5.10 (1H (7-OH), d, $J=5.4$ Hz), 5.39 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.55 (1H (9-OH), m), 6.80 (1H (3'), m, $J=7.1, 6.8, 1.5$ Hz), 7.58 (1H (1), s),
- 10 $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 12.2 (4'), 14.0 (18), 14.4 (5'), 16.2 (5''), 17.0 (17), 23.5 (16), 26.2 (15), 26.2 (3''), 34.7 (14), 35.,2 (8), 41.3 (2''), 43.7 (11), 57.3 (10), 62.6 (5), 64.2 (20), 67.0 (6), 67.0 (13), 71.3 (4), 75.8 (12), 77.3 (7), 79.1 (9), 128.3 (2'), 134.7 (2), 137.8 (3'), 159.7 (1), 167.4 (1'), 179.7 (1''), 205.7 (3).

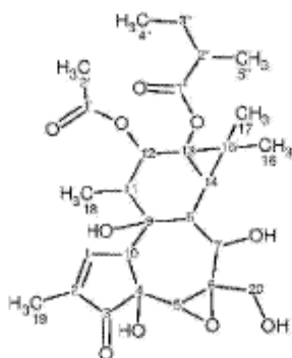
Compuesto 30: 13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



- 15 $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.91 (3H (4'), t, $J=7.6$ Hz), 1.02 (3H (18), d, $J=6.4$ Hz), 1.15 (1H (14), d, $J=5.9$ Hz), 1.15 (3H (5'), d, $J=7.3$ Hz), 1.19 (3H (16), s), 1.22 (3H (17), s), 1.46 (1H (3'), ddd, $J=14.1, 7.0, 6.8$ Hz), 1.70 (1H (3''), dt, $J=13.7, 7.3$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.5$ Hz), 1.93 (1H (11), dq, $J=9.8, 6.6, 6.5$ Hz), 2.24 (1H (8), d, $J=5.9$ Hz), 2.40 (1H (2'), m, $J=7.0, 6.8$ Hz), 2.84 (1H (20-OH), br. s.), 3.44 (1H (4-OH), s), 3.50 (1H (10), t, $J=2.4$ Hz), 3.76 (1H (5), s), 3.84 (1H (20), dd, $J=12.2, 3.9$ Hz), 3.88 (1H (12), dd, $J=10.0, 3.7$ Hz), 3.92 (1H (20), d, $J=12.2, 5.9$ Hz), 4.46 (1H (7), d, $J=4.4$ Hz), 4.57 (1H (OH), m), 5.20 (1H (OH), m), 7.60 (1H (1), s).
- 20 $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.7 (4'), 14.6 (18), 16.5 (5'), 16.7 (16), 23.6 (17), 26.4 (15), 26.5 (3'), 33.8 (14), 35.5 (8), 41.1 (2'), 45.5 (11), 57.8 (10), 62.6 (5), 64.1 (20), 66.9 (6), 68.0 (13), 71.3 (4), 76.8 (12), 77.3 (7), 78.8 (9), 134.4 (2), 160.2 (1), 180.0 (1'), 206.2 (3).

Compuesto 31: 12-acetil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona

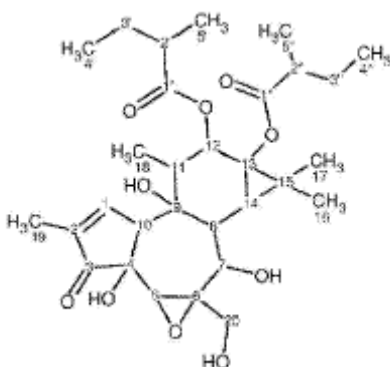
ES 2 715 105 T3



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.17 (3H (16), s), 1.18 (1H (14), s), 1.22 (3H (1.7), s), 1.44 (1H (3''), m, $J=14.1, 7.3, 7.1$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.2$ Hz), 2.04 (3H (2'), s), 2.09 (1H (11), dq, $J=10.2, 6.5$ Hz), 2.31 (1H (8), d, $J=5.6$ Hz), 2.37 (1H (2''), sxt, $J=7.0$ Hz), 2.88 (1H (20-OH), m), 3.52 (1H (10), d, $J=2.6$ Hz), 3.59 (1H (4-OH), s), 3.81 (1H (5), d, $J=0.9$ Hz), 3.83 (1H (20), d, $J=12.4$ Hz), 3.96 (1H (20), d), 4.39 (1H (7), d, $J=5.1$ Hz), 5.04 (1H (7-OH), d, $J=5.5$ Hz), 5.3 (1H (12), d, $J=10.1$ Hz), 6.48 (1H (9-OH), br. s.), 7.58 (1H (1), s).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''). 14.0 (18), 16.2 (5''), 16.7 (16), 20.9 (2'), 23.3 (17), 26.1 (3''), 26.2 (15), 34.6 (14), 35.1 (8), 41.3 (2''), 43.4 (11), 57.3 (10), 62.4 (5), 63.7 (20), 65.6 (13% 67.3 (6), 71.3 (4), 76.1 (12), 77.2 (7), 79.0 (9), 134.6 (2), 159.8 (1), 170.6 (1'), 179.7 (1''), 206.1 (3).

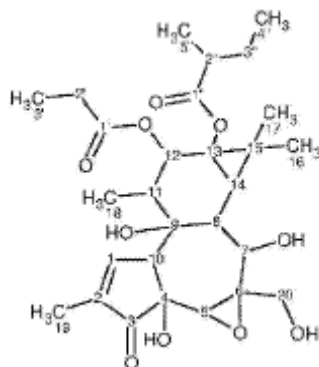
Compuesto 32: 12,13-di-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.89 (3H (4'), m, $J=7.6$ Hz), 0.91 (3H (4''), d, $J=7.5$ Hz), 1.11 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.12 (3H (5'), d, $J=7.0$ Hz), 1.17 (3H (16), s), 1.18 (1H (14), d, $J=5.7$ Hz), 1.19 (3H (17), s), 1.42 (1H (3'), m), 1.46 (1H (3''), dt, $J=6.8, 3.3$ Hz), 1.62 (1H (3'), dt, $J=8.2, 6.9$ Hz), 1.68 (1H (3''), d, $J=7.1$ Hz), 1.80 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.3$ Hz), 2.10 (1H (11), dd, $J=10.2, 6.6$ Hz), 2.33 (1H (8), d, $J=5.4$ Hz), 2.35 (1H (2'), m), 2.38 (1H (2''), d, $J=4.3$ Hz), 3.14 (1H (20-OH), br. s.), 3.54 (1H (10), dd, $J=2.4, 2.2$ Hz), 3.83 (1H (20), d, $J=13.0$ Hz), 3.85 (1H (5), d, $J=1.0$ Hz), 3.96 (1H (4-OH), s), 3.98 (1H (20), m, $J=12.8$ Hz), 4.37 (1H (7), d, $J=5.3$ Hz), 5.03 (1H (7-OH), d, $J=5.5$ Hz), 5.36 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.46 (1H (9-OH), s), 7.59 (1H (1), s).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 11.6 (4'), 13.9 (18), 16.1 (5''), 16.8 (5'), 16.9 (16), 23.5 (17), 26.0 (15), 26.2 (3''), 26.7 (3'), 34.6 (14), 35.1 (8), 41.3 (2''), 41.7 (2'), 43.3 (11), 57.2 (10), 62.2 (5), 63.2 (20), 65.6 (13), 67.6 (6), 71.3 (4), 75.4 (12), 77.2 (7), 79.1 (9), 134.6 (2), 160.0 (1), 175.9 (1'), 179.6 (1''), 206.3 (3).

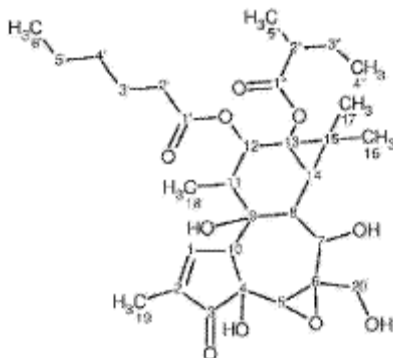
Compuesto 33: 12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.83 (3H (18), d), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.13 (3H (3'), t, $J=7.6$ Hz), 1.18 (3H (16), s), 1.19 (1H (14), s), 1.22 (3H (17), s), 1.44 (1H (3''), m, $J=14.1, 7.5, 7.1$ Hz), 1.71 (1H (3''), ddd, $J=13.9, 7.3, 7.1$ Hz), 1.81, (3H (19), dd, $J=2.8, 1.3$ Hz), 2.08 (1H (1), dd, $J=10.2, 6.5$ Hz), 2.29 (1H (8), m), 2.31 (2H (2''), m), 2.37 (1H (2''), d, $J=7.0$ Hz), 2.72 (1H (20-OH), t, $J=6.7$ Hz), 3.34 (1H (4-OH), s), 3.53 (1H (10), d, $J=2.4$ Hz), 3.78 (1H (5), d), 3.82 (1H (20), dd, $J=12.7, 5.9$ Hz), 3.94 (1H (20), dd, $J=12.7, 5.9$ Hz), 4.42 (1H (7), d, $J=5.6$ Hz), 5.06 (1H (7-OH), d, $J=5.6$ Hz), 5.32 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.49 (1H (9-OH), s), 7.58 (1H (1), d, $J=1.3$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.3 (3'), 10.3 (19), 11.6 (4''). 14.0(18), 16.2 (5''), 16.8 (16), 23.5 (17), 26.1 (3''), 26.2 (15), 27.8 (2'), 34.6 (14), 35.1 (8), 41.3 (2''), 43.4 (11), 57.3 (10), 62.5 (5), 63.8 (20), 65.6 (13), 67.2 (6), 71.3 (4), 75.9 (12), 77.3 (7), 79.1 (9), 134.6 (2), 159.8 (1), 173.9 (1'), 179.7 (1''), 206.0(3).

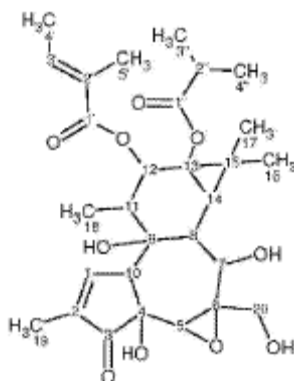
Compuesto 34: 12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.83 (3H (18), d), 0.88 (3H (6'), t, $J=6.9$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.1$ Hz), 1.18 (3H (16), s), 1.19 (1H (14), s), 1.21 (3H (17), s), 1.29 (2H (4'), m), 1.30 (2H (5'), m, $J=7.6, 7.3, 3.6$ Hz), 1.44 (1H (3''), dt, $J=14.1, 7.0$ Hz), 1.61 (2H (3'), m), 1.70 (1H (3''), m, $J=14.1, 7.3, 7.1$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.3$ Hz), 2.08 (1H (11), dq, $J=10.3, 6.5$ Hz), 2.3 (1H (8), d, $J=3.8$ Hz), 2.28 (2H (2'), m), 2.37 (1H (2''), q, $J=7.0$ Hz), 2.73 (1H (20-OH), m), 3.35 (1H (4-OH), br. s.), 3.53 (1H (10), t, $J=2.5$ Hz), 3.78 (1H (5), d, $J=1.1$ Hz), 3.82 (1H (20), d, $J=12.6$ Hz), 3.94 (1H (20), d, $J=12.5$ Hz), 4.42 (1H (7), d, $J=3.9$ Hz), 5.06 (1H (7-OH), d, $J=5.4$ Hz), 5.34 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.48 (1H (9-OH), s), 7.58 (1H (1), d, $J=1.5$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 13.9 (18), 13.9 (6'), 16.1 (5''), 16.8 (16), 22.3 (5'), 23.5 (17), 24.9 (3'), 26.1 (15), 26.2 (3''), 31.1 (4'), 34.5 (2'), 34.6 (14), 35.2 (8), 41.3 (2''), 43.3 (11), 57.3 (10), 62.5 (5), 64.0 (20), 65.6 (13), 67.1 (6), 71.3 (4), 75.6 (12), 77.2 (7), 79.1 (9), 134.6 (2), 159.8 (1), 173.3 (1'), 179.6 (1''), 206.0 (3).

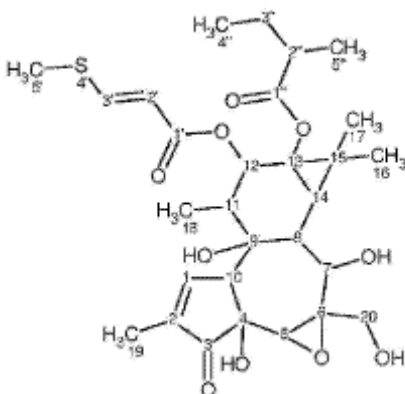
Compuesto 35: 12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hesahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d), 1.15 (3H (3''), d, $J=7.0$ Hz), 1.17 (3H (4''), d, $J=7.0$ Hz), 1.21 (1H (14), m), 1.21 (3H (16), s), 1.21 (3H (17), s), 1.77 (3H (4'), dd, $J=7.1$, 1.1 Hz), 1.80 (3H (5'), d, $J=1.3$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.9$, 1.4 Hz), 2.13 (1H (11), dd, $J=9.6$, 6.3 Hz), 2.32 (1H (8), d, $J=6.1$ Hz), 2.58 (1H (2''), spt, $J=7.0$ Hz), 3.46 (1H (4-OH), s), 3.54 (1H (10), d, $J=2.5$ Hz), 3.81 (1H (5), d, $J=1.2$ Hz), 3.82 (1H (20), m), 3.96 (1H (20), d, $J=13.0$ Hz), 4.42 (1H (7), d, $J=4.9$ Hz), 5.07 (1H (7-OH), d, $J=5.5$ Hz), 5.37 (1H (12), d, $J=10.2$ Hz), 6.52 (1H (9-OH), s), 6.80 (1H (3'), dq, $J=7.0$, 1.4 Hz), 7.58 (1H (1), dd, $J=2.0$, 1.4 Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 12.2 (5'), 14.0 (18), 14.4 (4'), 16.9 (16), 18.5 (3''), 18.6 (4''), 23.5 (17), 26.0 (15), 34.2 (2''), 34.6 (14), 35.2 (8), 43.6 (11), 57.3 (10), 62.4 (5), 63.7 (20), 65.7 (13), 67.3 (6), 71.3 (4), 75.7 (12), 77.2 (7), 79.1 (9), 128.3 (2'), 134.6 (2), 137.8 (3'), 159.9 (1), 167.5 (1'), 180.1 (1''), 206.0 (3).

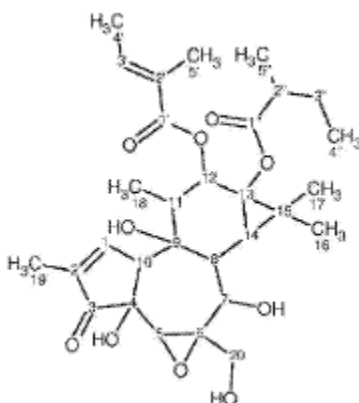
Compuesto 36: 12-[(2E)-3-metiltioprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.92 (3H (4''), t, $J=7.0$ Hz), 0.84 (3H (18), d, $J=6.5$ Hz), 1.13 (3H (5'') d, $J=7.0$ Hz), 1.18 (1H (14), s), 1.20 (3H (16), s), 1.22 (3H (17), s), 1.44 (1H (3''), dt, $J=13.9$, 7.0 Hz), 1.72 (1H (3''), d, $J=13.8$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.7$, 1.2 Hz), 2.12 (1H (11), dd, $J=9.4$, 5.6 Hz), 2.31 (1H (8), d, $J=6.0$ Hz), 2.32 (3H (5'), s), 2.38 (1H (2''), q, $J=7.0$ Hz), 3.36 (1H (4-OH), s), 3.53 (1H (10), d, $J=2.3$ Hz), 3.78 (1H (5), d, $J=0.9$ Hz), 3.82 (1H (20), d, $J=12.6$ Hz), 3.94 (1H (20), d), 4.43 (1H (7), d, $J=4.6$ Hz), 5.08 (1H (7-OH), d), 5.37 (1H (12), d, $J=10.2$ Hz), 5.61 (1H (2'), d, $J=14.9$ Hz), 6.53 (1H (9-OH), s), 7.58 (1H (1), d, $J=1.9$ Hz), 7.68 (1H (3'), d, $J=14.9$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 14.0 (18), 14.3 (5'), 16.2 (5''), 16.9 (16), 23.5 (17), 26.2 (15), 26.2 (3''), 34.7 (14), 35.2 (8), 41.3 (2''), 43.6 (11), 57.3 (10), 62.5 (5), 64.0 (20), 65.6 (13), 67.1 (6), 71.3 (4), 75.8 (12), 77.3 (7), 79.1 (9), 112.7 (2'), 134.6 (2), 147.7 (3'), 159.8 (1), 164.5 (1'), 179.8 (1''), 206.0(3).

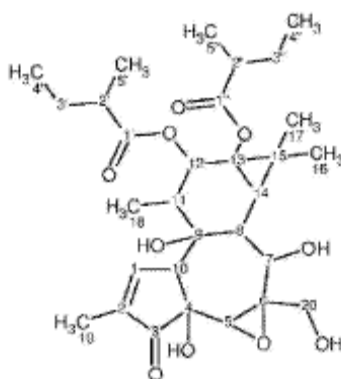
Compuesto 37: 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (2H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=6.9$ Hz), 1.19 (1H (14), s), 1.20 (1H (16), s), 1.21 (1H (17), s), 1.44 (1H (3''), dt, $J=14.1, 7.0$ Hz), 1.72 (1H (3''), dq), 1.77 (3H (4'), dd, $J=7.1, 1.1$ Hz), 1.8 (3H (5'), t, $J=1.3$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.5$ Hz), 2.13 (1H (11), q, $J=2.9$ Hz), 2.33 (1H (8), d, $J=5.7$ Hz), 2.38 (1H (2''), q, $J=7.0$ Hz), 2.99 (1H (20-OH), br. s.), 3.55 (1H (10), t, $J=2.6$ Hz), 3.70 (1H (4-OH), br. s.), 3.83 (1H (20), dd, $J=12.8, 4.9$ Hz), 3.84 (1H (5), d, $J=1.1$ Hz), 3.98 (1H (20), dd, $J=12.8, 7.3$ Hz), 4.39 (1H (7), d, $J=5.5$ Hz), 5.06 (1H (7-OH), d, $J=5.5$ Hz), 5.39 (1H (12), d, $J=10.2$ Hz), 6.53 (1H (9-OH), br. s.), 6.8 (1H (3'), dd, $J=7.1, 1.5$ Hz), 7.59 (1H (1), dd, $J=2.0, 1.5$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 12.2 (5''), 14.0 (1.8), 14.4 (4'), 16.2 (5''), 17.0 (16), 23.5 (17), 26.1 (15), 26.1 (3''), 34.7 (14), 35.2 (8), 41.2 (2''), 43.7 (11), 57.2 (10), 62.3 (5), 63.5 (20), 65.7 (13), 67.5 (6), 71.3 (4), 75.9 (12), 77.2 (7), 79.1 (9), 128.3 (2'), 134.6 (2), 137.7 (3'), 159.9 (1), 167.4 (1'), 179.7 (1''), 206.1 (3).

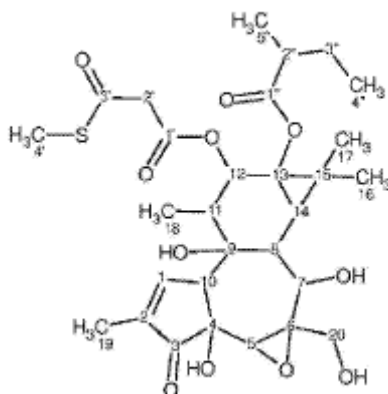
Compuesto 38: 12-[[2-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona]]



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.89 (3H (4'), t, $J=7.4$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5'), d, $J=7.0$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.19 (1H (14), d, $J=1.5$ Hz), 1.20 (3H (16), s), 1.21 (3H (17), s), 1.45 (1H (3'), dd, $J=14.1, 6.8$ Hz), 1.45 (1H (3''), dd, $J=14.1, 6.8$ Hz), 1.62 (1H (3'), dd, $J=8.3, 7.5$ Hz), 1.68 (1H (3''), dd, $J=14.1, 6.9$ Hz), 1.81 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.3$ Hz), 2.08 (1H (11), dd, $J=10.3, 6.5$ Hz), 2.30 (1H (8), d, $J=5.5$ Hz), 2.36 (1H (2'), m), 2.36 (1H (2''), m), 2.62 (1H (10-OH), t, $J=6.8$ Hz), 3.22 (1H (4-OH), s), 3.53 (1H (10), br. s.), 3.76 (1H (5), d, $J=1.1$ Hz), 3.82 (1H (20), dd, $J=12.5, 6.3$ Hz), 3.93 (1H (20), dd, $J=12.6, 7.0$ Hz), 4.44 (1H (7), d, $J=5.5$ Hz), 5.06 (1H (7-OH), d, $J=5.6$ Hz), 5.36 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.48 (1H (9-OH), s), 7.58 (1H (1), d, $J=2.0$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4'), 11.6 (4''), 13.9 (18), 16.1 (5''), 16.9 (5'), 17.0 (16), 23.5 (17), 26.0 (15), 26.2 (3''), 26.7 (3'), 34.6 (14), 35.2 (8), 41.3 (2'), 41.8 (2''), 43.3 (11), 57.3 (10), 62.5 (5), 63.9 (20), 65.6 (13), 67.2 (6), 71.3 (4), 75.4 (12), 77.3 (7), 79.1 (9), 134.7 (2), 159.8 (1), 175.9 (1'), 179.6 (1''), 205.9 (3).

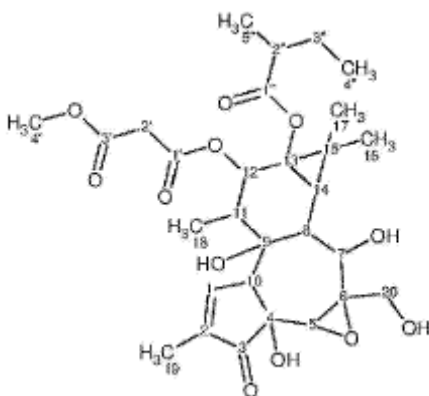
25 Compuesto 39: 12-[[2-(2-metilsulfanil)carbonoil]-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona



5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.13 (3H (5''), d, $J=7.0$ Hz), 1.16 (3H (16), s), 1.20 (1H (14), d, $J=5.9$ Hz), 1.23 (17), br. s.), 1.45 (1H (3''), td, $J=14.1, 7.2$ Hz), 1.70 (1H (3''), td, $J=14.0, 7.2$ Hz), 1.82 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.3$ Hz), 2.05 (1H (OH), d, $J=3.40$ Hz), 2.09 (1H (11), dd, $J=10.3, 6.5$ Hz), 2.27 (1H (8), d, $J=5.9$ Hz), 2.34 (3H (4'), s), 2.38 (1H (2''), t, $J=7.0$ Hz), 2.85 (1H (4-OH), s), 3.52 (1H (10), dd, $J=2.6, 2.3$ Hz), 3.57 (2H (2'), d, $J=4.5$ Hz), 3.70 (1H (5), d, $J=1.1$ Hz), 3.81 (1H (20), dd, $J=12.2, 6.2$ Hz), 3.89 (1H (20), m), 4.46 (1H (7), d, $J=5.7$ Hz), 5.02 (1H (7-OH), d, $J=5.9$ Hz), 5.35 (1H (12), d, $J=10.3$ Hz), 6.47 (1H (9-OH), m), 7.56 (1H (1), dd, $J=2.0, 1.3$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 12.1 (4'), 14.0 (18), 16.2 (5''), 16.6 (16), 23.5 (17), 26.2 (3''), 26.5 (15), 34.8 (14), 35.2 (8), 41.3 (2''), 43.3 (11), 49.5 (2'), 57.4 (10), 62.7 (5), 64.4 (20), 65.3 (13), 66.8 (6), 71.3 (4), 77.2 (7), 77.9 (12), 79.1 (9), 134.7 (2), 159.5 (1), 165.7 (1'), 179.8 (1''), 190.9 (3'), 205.6 (3).

Compuesto 40: 12-[(2-metoxicarbonil)-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tiglaen-3-ona



15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (3H (18), d), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.6$ Hz). 1.13 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.17 (3H (16), s), 1.21 (1H (14), d, $J=5.9$ Hz), 1.23 (3H (17), s), 1.45 (1H (3''), dt, $J=14.2, 6.8$ Hz), 1.70 (1H (3''), dd, $J=14.2, 6.8$ Hz), 1.82 (3H (19), dd, $J=2.7, 1.2$ Hz), 2.09 (1H (11), dd, $J=10.3, 6.4$ Hz), 2.27 (1H (8), d, $J=4.9$ Hz), 2.38 (1H (2''), m, $J=14.1, 7.0, 6.8$ Hz), 2.72 (1H (4-OH), s), 3.37 (2H (2'), s), 3.53 (1H (10), d, $J=2.4$ Hz), 3.70 (1H (5), d, $J=1.0$ Hz), 3.72 (3H (4'), s), 3.80 (1H (20), m), 3.90 (1H (20), m), 4.46 (1H (7), d, $J=2.4$ Hz), 5.02 (1H (7-OH), d, $J=5.9$ Hz), 6.49 (1H (9-OH), s), 7.56 (1H (1), d, $J=2.0$ Hz).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 10.3 (19), 11.6 (4''), 13.9 (18), 16.2 (5''), 16.7 (16), 23.5 (17), 26.2 (3''), 26.5 (15), 34.8 (14), 35.2 (8), 41.3 (2''), 41.4 (2'), 43.3 (11), 52.5 (4'), 57.4 (10), 62.7 (5), 64.7 (20), 65.3 (13), 66.6 (6), 71.3 (4), 77.2 (7), 77.7 (12), 79.1 (9), 134.8 (2), 159.4 (1), 166.1 (1'), 166.1 (3'), 179.8 (1''), 205.5 (3).

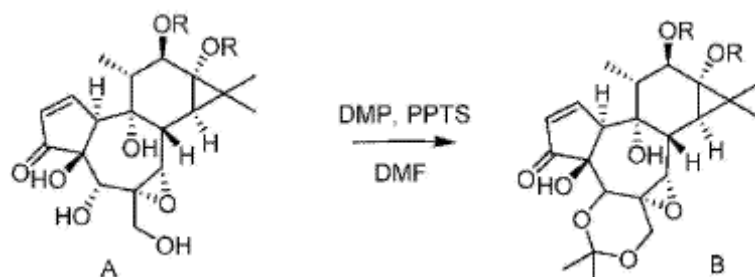
Ejemplo 3: Preparación de derivados de tigiano

25 Se prepararon semisintéticamente varios compuestos mediante hidrólisis de los ésteres C-12 y C-13 de una mezcla de los 5,20-acetonidos de compuestos de tigiano tales como el compuesto 1 y compuestos relacionados, seguido de reesterificación en C-12 y C-13 con reactivos estándar usando los siguientes métodos.

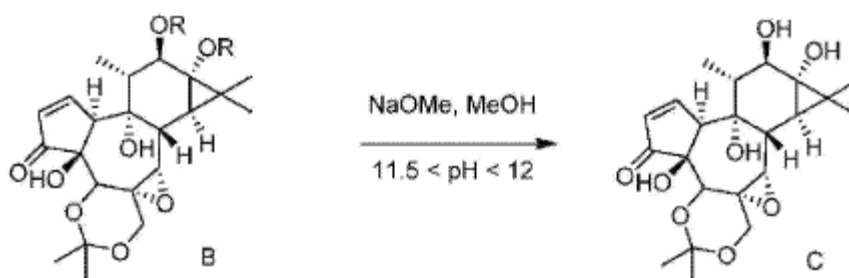
La mezcla en bruto de ésteres de tigiano para la síntesis de análogos de tigiano se preparó pulverizando de forma gruesa 150 g de semilla de *Fontainea picrosperma* que luego se extrajo agitando con acetona en un matraz de 1 L.

Después de 4 h, esta suspensión se filtró al vacío y la torta de filtración se lavó con acetona hasta que la TLC (PE: EtOAc: 4: 6) mostró la ausencia de ésteres de tigiano. Los filtrados reunidos se evaporaron, proporcionando una mezcla en bruto de ésteres. Las grasas se eliminaron luego mediante una cromatografía en columna de gravedad corta en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo; PE/EtOAc 8: 2 → 4: 6 como eluyente) para producir 8.2 g (5.5%) de la mezcla de ésteres en bruto.

La mezcla de ésteres se protegió, se desesterificó y se reesterificó en las posiciones C-12 y C-13 como se ilustra en las siguientes reacciones usando grupos acilo variables para proporcionar los compuestos 21, 22, 23, 27, 28, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 y 60.



- 10 A. Se añadió una solución de 10 mL de la mezcla de ésteres A en dimetilformamida (DMF) a una solución de 50 mL de piridinio-p-toluensulfonato (PPTS, 4.1 g, exceso) en DMF (10 mL) y se agitó a temperatura ambiente, durante 2 minutos. Luego se añadieron 120 mL de 2,2-dimetoxipropano (DMP) y la solución se agitó durante 24 horas. La reacción se diluyó con una solución de NaCl (150 mL) y se lavó con acetato de etilo (EtOAc, 50 mL). La fase orgánica se lavó con una solución de NaCl, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 8: 2 → 6:4 como eluyente) para proporcionar 5.2 g (3.5%) de 5.20 de la mezcla de ésteres de acetónido B. El material de partida sin reaccionar se hizo reaccionar nuevamente en las mismas condiciones para proporcionar una mezcla de éster adicional B



- 20 Se preparó recientemente una solución de NaOMe 0.21N añadiendo lentamente pequeños trozos de sodio (9.7 g) a metanol agitado (calidad HPLC, 2 L). Bajo agitación vigorosa, se añadieron rápidamente 128 mL de esta solución a 6.4 g de la mezcla B de ésteres de 5,20 acetónidos. El pH de la solución resultante se debe mantener en el intervalo de 11.5-12,0 por adición juiciosa de NaOMe 0.21 M, cuidando de no sobrepasar el pH 12.5. Después de agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se neutralizó con ácido acético, se filtró y se evaporó a aprox. 1/20 del volumen original. Se añadió EtOAc (20 mL) y la solución se lavó con H_2SO_4 2N (100 mL). El lavado ácido se extrajo de nuevo con EtOAc y las soluciones de EtOAc reunidas se lavaron con solución de NaCl (2 x 300 mL). Después de secar (Na_2SO_4), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 6:4 → 4: 6 como eluyente) para proporcionar 1.4 g de polvo de color blanco.

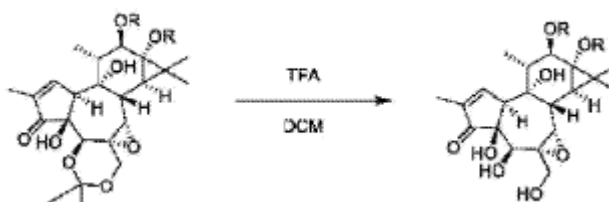
Síntesis de análogos de tigiano con patrón de esterificación simétrica; Métodos de ejemplo modificados de esterificación de Steglich

- 30 1.



A una solución de acetónido de deacil-tigiano (100 mg; 0,23 mMol) en THF (5 mL), se le añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (15 mg; 0,12 mMol) y la solución se calentó a 60 °C (temperatura del baño de aceite). Por separado, a una solución del ácido carboxílico esterificante (10 Eq) en THF (10 mL/g), se le añadió N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 10 Eq); después de agitar durante aproximadamente 15 minutos, la suspensión se filtró a través de un tapón de algodón y se añadió gota a gota a la solución en THF de acetónido de deacil-tigiano. Después de agitar 24 horas a 60 °C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (\approx 200 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (\approx 50 mL), salmuera (2 x \approx 50 mL) y después con una solución sat. de NaHCO₃ (\approx 50 mL) y salmuera (2 x \approx 50 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 \rightarrow 6:4 como eluyente) para proporcionar 111 mg (80%) de un polvo de color blanco.

3.2 Desprotección



Método A (TFA en CH₂Cl₂)

El diéster de acetónido (100 mg) se añadió a una solución recién preparada de ácido trifluoroacético (TFA) en CH₂Cl₂ (2% V/V; 200 μ L, 2 μ L/mg). Después de agitar durante 6-12 h a temperatura ambiente, la reacción se trató lavando con una mezcla de una solución sat. de NaHCO₃ (\approx 10 mL) y salmuera (\approx 40 mL), y luego con salmuera sola (2x \approx 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 8: 2 \rightarrow 2: 8 como eluyente) para proporcionar los análogos de tigiano (rendimiento aprox.: 60-70%),

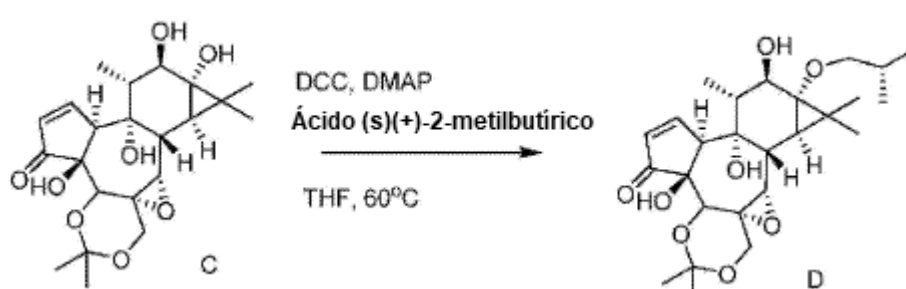
Método B (HClO₄ en MeOH)

El diéster de acetónido (100 mg) se añadió a una solución recién preparada de HClO₄ en MeOH [intervalo de pH: 1.5-2.0]. Después de agitar a temperatura ambiente, durante 6-24 horas, la reacción se trató mediante neutralización con acetato de sodio, filtración y evaporación a aprox. del volumen original, se añadió EtOAc (10 mL) y la solución se lavó con H₂SO₄ 2N (30 mL) y luego con salmuera (30 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc - \rightarrow 4; 6 como eluyente) para proporcionar el diéster con un rendimiento de aprox. 60-70%.

Este método se usó para producir los compuestos 27, 41, 42, 43, 44, 46, 49 y 60.

Síntesis de diésteres no simétricos, métodos de ejemplo:

1.



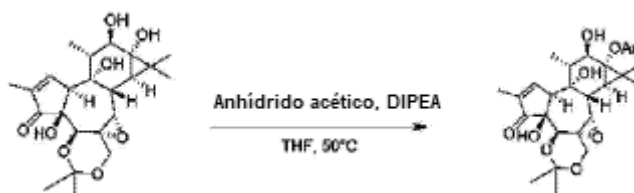
A una solución de 12,13-deacil-5,20-acetónido (C) (1.4 g; 3,4 mMol) en 10 mL de tetrahydrofurano (THF), se añadieron 740 mL de metilamina 34 mMol (TEA) y la solución se calentó a 60 °C, por separado, a una solución de ácido (S)-(+)-2-metilbutírico (3,702 mL; 34 mMol) en THF (20 mL), se le añadió N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 7,015 g; 34 mMol). Después de agitar durante aproximadamente 15 minutos, la suspensión se filtró y se añadió a la solución calentada del diol de partida (C). Después de agitar 24 horas a 60 °C, la reacción se diluyó con EtOAc (\approx 200 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (\approx 50 mL), solución de NaCl (2 x \approx 50 mL) y luego con solución de NaHCO₃ (\approx 50 mL) y solución de NaCl (2 x \approx 50 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 \rightarrow 6:4 como eluyente) para proporcionar 12-deacil-5,20-acetónido-13-[(S)-(+)-2-metilbutirato (D) como polvo de color blanco.

2.



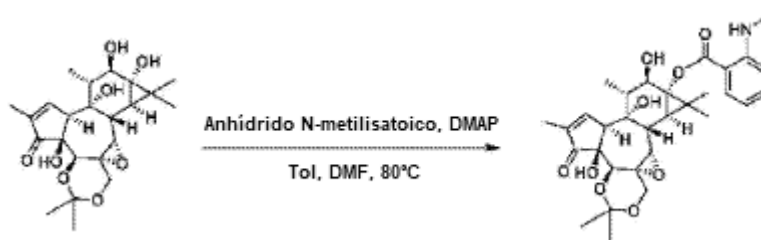
5 A una solución de 12,13-deacil-5,20-acetónido C (100 mg; 0,25 mMol) en THF (5 mL), se le añadieron ácido (S)-(+)-2-metilbutírico (109 μ L; 1,00 mMol) y N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 206,33 mg; 1,00 mMol). La solución se agitó a 60 °C (temperatura del baño de aceite) durante 24 h, y luego se trató por dilución con EtOAc (\approx 20 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (\approx 50 mL), salmuera (2 x \approx 50 mL), NaHCO₃ sat. (\approx 50 mL) y salmuera (2 x \approx 50 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9.1 \rightarrow 6:4 como eluyente) para proporcionar 106.2 mg (60%) de 12-deacil-5,20-acetónido-13-((S)-2-metilbutirato) D como polvo de color blanco.

10 3.



15 A una solución de 12,13-deacil-5,20-acetónido C (100 mg; 0,25 mMol) en THF (5 mL). Se añadieron diisopropiletilamina (DIPEA) (131 μ L; 0,75 mMol) y anhídrido acético (94 μ L; 0,75 mMol). Después de agitar durante 72 horas a temperatura ambiente, se añadió EtOAc (10 mL) y la solución se lavó con H₂SO₄ 2N (2 x 20 mL) y salmuera (20 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc - \rightarrow 4: 6 como eluyente) para proporcionar 12-deacil-13-acetil-5,20-acetónido 104 mg (87%) como un polvo de color blanco.

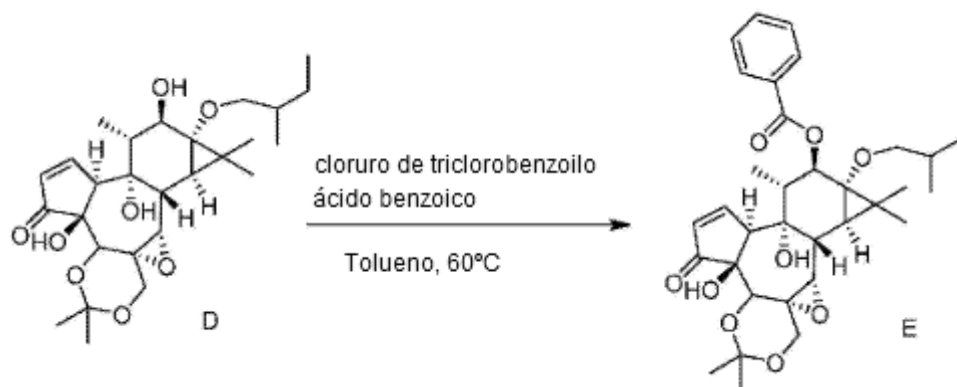
4.



20 A una solución de deacil-5,20-acetónido (100 mg; 0,25 mMol) en tolueno (5 mL)/dimetilformamida (2 mL), se le añadieron anhídrido N-metilisatoico (266 mg; 1,50 mMol) y dimetilaminopiridina (DMAP) (31 mg; 0,25 mMol). Después de agitar 24 h a 80 °C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (\approx 10 mL) y lavado secuencial con [H₂SO₄ 2N (\approx 20 mL) + salmuera (\approx 60 mL)] (x2), y [NaHCO₃ sat. (\approx 20 mL) + salmuera (\approx 60 mL)] (x2). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 \rightarrow 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-deacil-13-[(N-metil)-antranilato-5,20-acetónido, 114 mg (80%) como un polvo de color blanco.

Acilación de 13-monoésteres: métodos de ejemplo

1.



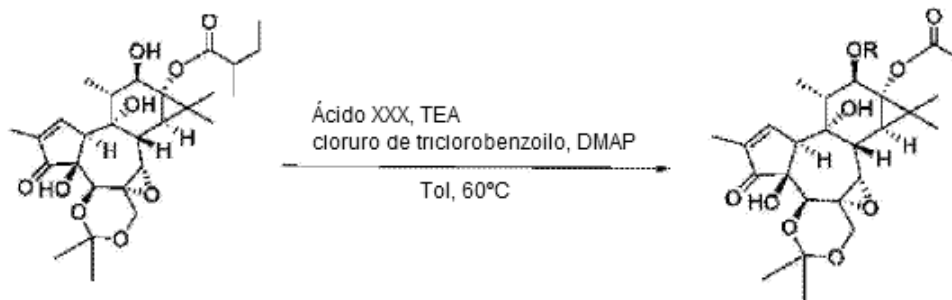
5 A una solución de 12-decil-5,20-acetónido-13-[(S)-(+)-2-metilbutirato (D) (1062 mg; 2,04 mMol) en tolueno (10 mL), se le añadió dimetilaminopiridina (DMAP) (249 mg; 2,04 mMol). Por separado, a una solución del ácido benzoico 1224 mg; 10,02 mMol) en tolueno (20 mL), se le añadió trietilamina (1,397 mL; 10,02 mMol) y la solución se agitó durante aproximadamente 2 minutos para completar la disolución; luego se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (1,566 mL; 10,02 mMol) (Solución 1). Después de agitar la composición que contenía el compuesto D durante 6 horas, la suspensión se filtró y se vertió en la solución 1. Después de agitar durante 24 a 48 horas a 60 °C, la reacción se diluyó con EtOAc (≈10 mL) y se lavó con solución de MH_2SO_4 (≈40 mL), solución de NaCl (2 x ≈40 mL), y luego con solución de NaHCO_3 (≈40 mL) y solución de NaCl (2 x ≈40 mL). Después de secar (Na_2SO_4), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 → 7:3 como eluyente) para proporcionar el 5,20-acetónido-12-benzoato-13 [(S)-(+)-2-metilbutirato E como un polvo de color blanco,

2.



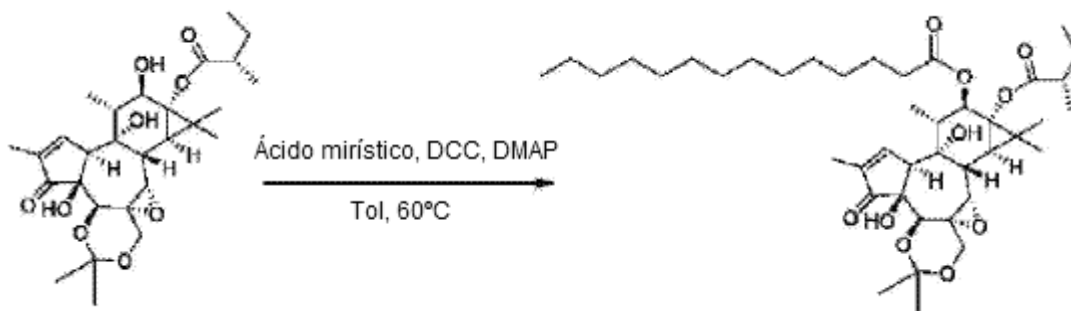
15 A una solución de decil-13- (N-metil-antranoil)-5,20-acetónido (100 mg; 0,18 mMol) en tetrahidrofurano (THF, 5 mL), se añadieron secuencialmente anhídrido acético (51 mg; 0,54 mMol) y dimetilaminopiridina (DMAP) (2,2 mg; 0,018 mMol). Después de agitar 6 h a 50 °C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (aprox. 10 mL) y lavado secuencial con H_3SO_4 2N (2x aprox. 40 mL), NaHCO_3 sat. (2x aprox. 40 mL) y salmuera (2x aprox. 40 mL). Después de secar (Na_2SO_4), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 95:05 → 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-acetil-13- (N-metil) antranilato-5,20-acetónido, 105 mg (95%) como un polvo de color blanco.

3.



5 A una solución de 12-deacil-5,20-acetónido-13-[(S)-2-metilbutirato] (100 mg; 0,19 mMol) en tolueno (5 mL), se le añadió dimetilaminopiridina (DMAP) (23 mg; 0,19 mMol). Por separado, a una solución de ácido tíglico (95 mg; 0,95 mMol) en tolueno (5 mL), se le añadió trietilamina (132 μ L; 0,95 mmol) y la solución se agitó durante aproximadamente 2 minutos para completar la solución; luego se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (148 μ L; 0,95 mMol) y, después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, la suspensión se filtró (tapón de algodón) y se añadió gota a gota a la solución del diterpenoide monoéster en tolueno. Después de agitar 24-48 horas a 60°C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (aprox. 10 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (aprox. 40 mL), salmuera (2 x \approx 40 mL), y luego con NaHCO₃ (aprox. 40 mL) y salmuera (2 x \approx 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 \rightarrow 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-tigloil-13-metilbutiril-5,20-acetónido, 59 mg (50%) como un polvo de color blanco.

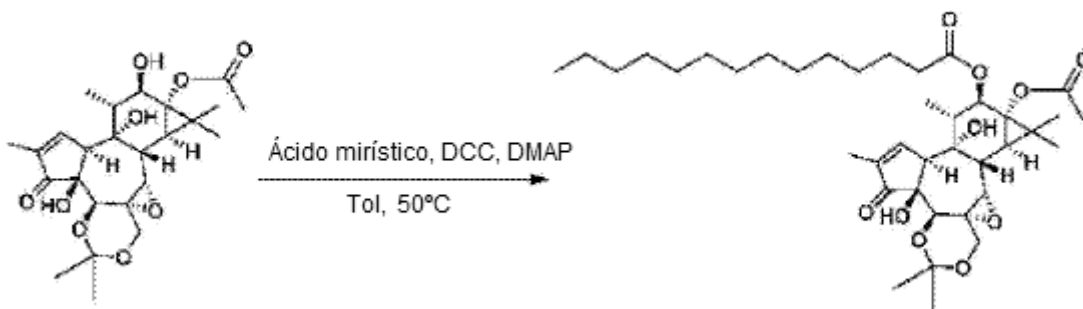
4.



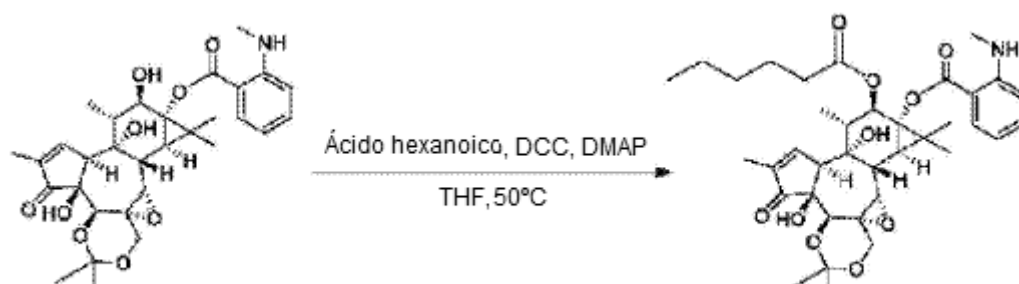
15 Una solución de 12-deacil-5,20-acetónido-13-(S)-2-metilbutirato (100 mg; 0,19 mMol) en tolueno (10 mL) se calentó a 60 °C y ácido mirístico (217 mg; 0,95 mMol), N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (196 mg; 0,95 mMol) y dimetilaminopiridina (DMAP) (23 mg; 0,19 mMol) se añadieron secuencialmente. Después de agitar 12 horas a 60°C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (\approx 10 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (2x \approx 40 mL), NaHCO₃ sat. (2x \approx 40 mL) y salmuera (2x \approx 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 \rightarrow 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-miristoil-13-(2-metilbutanoil)-5, 20-acetónido, 121 mg (70%) como un polvo de color blanco.

20

5.



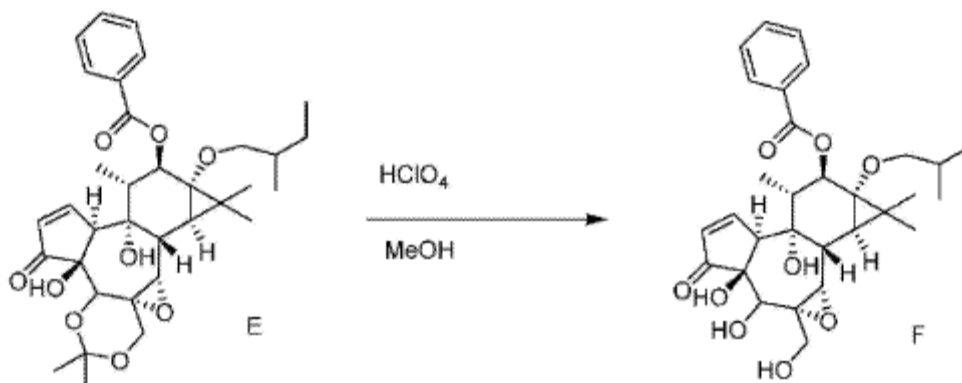
- Una solución de 12-deacil-5,20-acetónido-13-acetato (100 mg; 0,25 mMol) en tolueno (10 mL) se calentó a 60 °C (temperatura del baño de aceite) y se añadieron luego ácido mirístico (286 mg; 1,00 mMol), N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (206 mg; 1,00 mMol) y dimetilaminopiridina (DMAP) (31 mg; 0,25 mMol). Después de agitar 12 horas a 60 °C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (aprox. 10 mL) y se lavó con H₂SO₄ 2N (2x aprox. 40 mL), NaHCO₃ sat.(2x aprox.40 mL) y salmuera (2x aprox. 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 → 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-miristil-13-acetil-5,20-acetónido, 121 mg (70%) como un polvo de color blanco.
- 6.



- 10 A una solución calentada (60 °C, temperatura de baño de aceite) de deacil-13-(N-metilantanoil)-5,20- acetónido (100 mg; 0,18 mMol) en tolueno (10 mL), se le añadieron secuencialmente ácido hexanoico (84 mg; 0,72 mMol), diciclohexilcarbodiimida (DCC, 149 mg; 0,72 mMol) y dimetilaminopiridina (DMAP 22 mg; 0,18 mMol). Después de agitar 12 h a 60 °C, la reacción se trató por dilución con EtOAc (aprox. 10 mL) y lavado secuencial con H₂SO₄ 2N (2x aprox. 40 mL), NaHCO₃ sat.(2x aprox. 40 mL) y salmuera (2x aprox., 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 9:1 → 7:3 como eluyente) para proporcionar 12-hexanoil-13-(N-metilantanoil)-5, 20-acetónido, 108 mg (90%) como un polvo de color blanco.
- 15

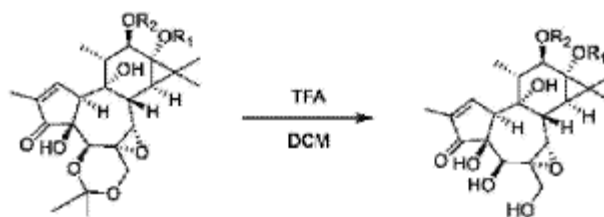
Desprotección

1.



- 20 El 5,20-acetónido-12-benzoato-13-[(S)-(+)-2-metilbutirato E (637 mg; 1.02 mMol) se añadió a una solución recién preparada de HClO₄ en MeOH [1.5 <pH <2.0]. Después de agitar durante 6-24 horas, la reacción se neutralizó con acetato de sodio, se filtró y se evaporó a aprox. 1/20 del volumen original. Se añadió EtOAc (10 mL) y la solución se lavó con H₂SO₄ 2N (30 mL) y luego con solución de NaCl (30 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc → 4:6 como eluyente) para proporcionar el 12-benzoato-13-[(S)-(+)-2-metilbutirato F (Compuesto 23) como polvo de color blanco.
- 25

2.



- 5 Reacción con 12-acetil-13-N-metilantranoil-5,20-acetónido como representante: En una solución de 12-acetil-13-N-metilantranoil-5,20-acetónido (100 mg; 0,16 mMol) en CH₂Cl₂ (10 mL), se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (300 μ L; 3% V/V). Después de agitar aproximadamente 12 horas, la reacción se trató lavando con [NaHCO₃ (\approx 10 mL) + salmuera (\approx 40 mL)] y luego con salmuera (2x \approx 40 mL). Después de secar (Na₂SO₄), filtrar y evaporar, el residuo se purificó por cromatografía en columna por gravedad en gel de sílice (PE/EtOAc 8:2 \rightarrow 2:8 como eluyente) para proporcionar 12-acetil-13- (N-metilantranoil)-tigliano, 69 mg (75%) como un polvo de color blanco.

Los compuestos 21, 22, 23, 28, 45, 47, 48, 50, 51, 52 y 53 se prepararon mediante estos métodos.

Compuesto 21

- 10 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.84 (3H, d, $J=6.6$ Hz), 0.93 (3 H, t, $J=7.4$ Hz), 1.21 (3 H, s), 1.23 (3 H, s), 1.29 (1 H, d, $J=6.7$ Hz), 1.64 (2 H, sxt, $J=7.6$ Hz), 1.73 (3 H, dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.77 (3 H, dq, $J=7.2, 1.2$ Hz), 1.79-1.81 (3 H, m), 1.95 (1 H, dd, $J=9.9, 6.5$ Hz), 2.24-2.38 (2 H, m), 3.16 (1 H, d, $J=6.7$ Hz), 3.26 (1 H, d, $J=0.5$ Hz), 3.65 (1 H, s), 3.83 (2H, dd, $J=13.3, 12.5$ Hz), 3.94 (1 H, d, $J=3.1$ Hz, OH), 4.06 (1 H, t, $J=1.6$ Hz), 4.22 (1 H, s), 5.41 (1 H, d, $J=9.9$ Hz), 5.82-6.00 (1 H, br. s., OH), 6.80 (1 H, qq, $J=7.1, 1.4$ Hz), 7.71 (1 H, dd, $J=2.6, 1.3$ Hz).
- 15 ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.72, 12.20, 13.62, 14.43, 15.07, 17.12, 18.03, 23.66, 26.35, 35.98, 36.03, 36.13, 45.76, 48.92, 61.77, 64.56, 65.23, 65.65, 71.36, 72.41, 76.74, 77.20, 128.38, 133.46, 137.73, 164.63, 167.62, 176.12, 209.88.

Compuesto 22

- 20 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3 H, d, $J=7.3$ Hz), 0.86 (3 H, t, $J=7.2$ Hz), 1.20 (3 H, s), 1.21 (3 H, s), 1.20-1.40 (10 H, m), 1.29 (1 H, d, $J=6.8$ Hz), 1.67 (2 H, d, $J=13.7$ Hz), 1.75 (3 H, dd, $J=2.9, 1.0$ Hz), 1.88-1.92 (2H, m), 1.89-1.95 (1H, m), 3.07 (2H, dd, $J=6.8, 1.5$ Hz), 3.15 (1 H, d, $J=6.4$ Hz), 3.26 (1 H, s), 3.85 (2 H, dd, $J=12.7, 4.4$ Hz), 4.04 (1 H, d, $J=2.9$ Hz), 4.21 (1 H, s), 5.13-5.15 (1 H, m), 5.16-5.18 (1 H, m), 5.35 (1 H, d, $J=9.8$ Hz), 5.82-5.92 (1 H, m), 7.70 (1 H, dd, $J=2.4, 1.0$ Hz).
- 25 ¹³C RMN (125 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm: 9.74, 14.08, 15.12, 17.03, 22.63, 23.69, 24.48, 26.51, 29.07, 29.08, 29.19, 31.81, 34.25, 36.01, 36.04, 39.29, 45.50, 48.94, 61.69, 64.54, 65.21, 65.49, 71.58, 72.35, 77.17, 77.41, 118.62, 130.03, 133.55, 164.54, 171.11, 176.25, 209.86,

Compuesto 23

- 30 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.90 (3 H, d, $J=6.5$ Hz), 0.94 (3 H, t, $J=7.5$ Hz), 1.14 (3 H, d, $J=7.1$ Hz), 1.22 (3 H, s), 1.32 (1 H, d, $J=6.6$ Hz), 1.35 (3 H, s), 1.41-1.51 (1 H, m, $J=14.1, 7.5, 7.0$ Hz), 1.69-1.79 (1 H, m), 1.73 (3 H, dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 2.08 (1 H, dq, $J=9.9, 6.5$ Hz), 2.39 (1 H, sxt, $J=7.0$ Hz), 3.24 (1 H, d, $J=6.6$ Hz), 3.29 (1 H, s), 3.84 (2 H, dd, $J=12.8, 1.3$ Hz), 4.10 (1 H, t, $J=2.5$ Hz), 4.24 (1 H, d, $J=0.7$ Hz), 5.62 (1 H, d, $J=9.9$ Hz), 6.07 (1 H, br. s., OH), 7.43 (2 H, t, $J=7.7$ Hz), 7.55 (1 H, tt, $J=7.5, 1.3$ Hz), 7.72 (1 H, dd, $J=2.6, 1.3$ Hz), 7.99 (2 H, dm, $J=8.4, 1.3$ Hz)
- 35 ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.73, 11.61, 15.14, 16.14, 17.32, 23.63, 26.18, 26.82, 36.03, 36.34, 41.22, 45.92, 48.92, 61.86, 64.59, 65.20, 65.48, 71.27, 72.46, 77.23, 77.60, 128.44 (2 C), 129.70 (2 C), 130.02, 133.07, 133.52, 164.54, 165.94, 179.00, 209.84.

Compuesto 27

- 40 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3 H, d, $J=6.5$ Hz), 0.93 (6 H, t, $J=7.4$ Hz), 1.20 (6 H, s), 1.28 (1 H, d, $J=6.6$ Hz), 1.58-1.68 (4 H, m), 1.74 (3 H, d, $J=1.8$ Hz), 1.91 (1 H, dq, $J=10.0, 6.4$ Hz), 2.20-2.36 (4 H, m), 3.14 (1 H, d, $J=6.6$ Hz), 3.25 (1 H, s), 3.63 (1 H, s, OH), 3.76-3.86 (1 H, m), 3.93 (1 H, d, $J=3.1$ Hz, OH), 4.05 (1 H, d, $J=2.4$ Hz), 4.21 (1 H, d, $J=2.4$ Hz), 5.36 (1 H, d, $J=10.0$ Hz), 5.84 (1 H, br. s., OH), 7.70 (1 H, s).
- ¹³C RMN (125 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm: 9.72, 13.46, 13.62, 15.04, 17.02, 18.01, 18.61, 23.66, 26.34, 35.90, 35.95, 36.14, 36.38, 45.42, 48.90, 61.79, 64.58, 65.21, 65.60, 71.34, 72.40, 76.59, 77.18, 133.49, 164.54, 173.30, 176.05, 209.85.

Compuesto 28

ES 2 715 105 T3

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.91 (3 H, d, J=6.6 Hz), 0.96 (3 H, t, J=7.4 Hz), 1.21 (3 H, s), 1.34 (3 H, s), 1.36 (1 H, d, J=3.4 Hz), 1.60-1.72 (2 H, m), 1.74 (3 H, d, J=2.1 Hz), 2.09 (1 H, dd, J=9.8, 6.5 Hz), 2.31 (1 H, t, J=15.9, 7.6 Hz), 2.38 (1 H, t, J=15.9, 7.6 Hz), 3.24 (1 H, d, J=6.7 Hz), 3.29 (1 H, s), 3.80 (1 H, d, J=12.4 Hz), 3.87 (1 H, d, J=12.4 Hz), 4.09 (1 H, d, J=2.7 Hz), 4.24 (1 H, s), 5.62 (1 H, d, J=9.9 Hz), 7.43 (2 H, t, J=7.7 Hz), 7.56 (1 H, t, J=7.4 Hz), 7.73 (1 H, s), 7.99 (2 H, d, J=7.3 Hz)

5

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.73, 13.65, 15.16, 17.25, 18.07, 23.66, 26.59, 36.07, 36.18, 36.23, 45.80, 48.95, 61.74, 64.55, 65.23, 65.62, 71.54, 72.40, 77.21, 77.63, 128.46 (2 C), 129.72 (2 C), 129.98, 133.12, 133.56, 164.57, 166.15, 176.19, 209.88.

Compuesto 41

10 ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, J=7.3 Hz), 0.85 (3H (9'), t, J=7.3 Hz), 0.86 (3H (9''), t, J=6.8 Hz), 1.20 (3H (16), s), 1.20 (3H (17), s), 1.22-1.30 (10H (4', 5', 6', 7', 8'), m), 1.22-1.30 (10H (4'', 5'', 6'', 7'', 8''), m), 1.28 (1H (14), d, J=6.8 Hz), 1.53-1.62 (2H (3''), m), 1.56-1.63 (2H (3'), m), 1.74 (3H (19), dd, J=2.9, 1.3 Hz), 1.90 (1H (11), dq, J=10.1, 6.5 Hz), 2.19 (1H (20-OH), t, J=6.8 Hz), 2.24-2.32 (2H (2'), m), 2.29-2.37 (2H (2''), m), 3.14 (1H (8), d, J=6.8 Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.59 (1H (4-OH), s), 3.78 (1H (20), dd, J=12.5, 5.2 Hz), 3.82-3.87 (1H (20), m, J=12.5, 7.3 Hz), 3.89 (1H (5-OH), d, J=3.1 Hz), 4.05 (1H (10), dq), 4.21 (1H (5), d, J=2.6 Hz), 5.36 (1H (12), d, J=10.4 Hz), 5.86 (1H (9-OH), br. s.), 7.70 (1H (1), dd, J=2.6, 1.6 Hz).

15

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 14.1 (9''), 14.1 (9'), 15.1 (18), 17.0 (16), 22.6 (8''), 22.6 (8'), 23.7 (17), 24.5 (3''), 25.2 (3'), 26.3 (15), 28.99 (4''), 29.07 (6'), 29.07 (6''), 29.15 (4'), 29.18 (5''), 29.2 (4'), 29.22 (5'), 31.78 (7''), 31.80 (7'), 34.3 (2''), 34.5 (2'), 35.9 (14), 36.0 (8), 45.4 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.6 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.5 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.6 (1), 173.5 (1'), 176.2 (1''), 209.9 (3).

20

Compuesto 42

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, J=6.2 Hz), 0.87 (3H (6'), t, J=7.0 Hz), 0.88 (3H (6''), t, J=7.0 Hz), 1.20 (3H (17), s), 1.21 (3H (16), s), 1.25-1.31 (2H (4'), m), 1.25-1.31 (2H (4''), m), 1.26-1.32 (2H (5''), m), 1.26-1.32 (2H (5'), m), 1.27-1.29 (1H (14), m, J=6.8 Hz), 1.57-1.62 (2H (3''), m), 1.58-1.63 (2H (3'), m), 1.74 (3H (19), dd, J=2.9, 1.3 Hz), 1.91 (1H (11), dq, J=10.1, 6.5 Hz), 2.20 (1H (20-OH), t, J=6.8 Hz), 2.26-2.30 (2'), m), 2.29-2.34 (2H (2''), m), 3.14 (1H (8), d, J=6.8 Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.59 (1H (4-OH), d, J=1.0 Hz), 3.78 (1H (20), dd, J=12.5, 5.2 Hz), 3.82-3.87 (1H (20), m), 3.88 (1H (5-OH), d, J=3.1 Hz), 4.05 (1H (10), t, J=2.6 Hz), 4.21 (1H (5), d, J=3.6 Hz), 5.36 (1H (12), d, J=9.9 Hz), 5.86 (1H (9-OH), br.s.), 7.70 (1H (1), dd, J=2.3, 1.3 Hz),

25

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 13.8 (6''), 13.9 (6'), 15.1 (18), 17.0 (16), 22.26 (5''), 22.3 (5'), 23.7 (17), 24.1 (3''), 24.8 (3'), 26.3 (15), 31.1 (4''), 31.2 (4'), 34.2 (2''), 34.5 (2'), 35.9 (14), 36.0 (8), 45.4 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.6 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.5 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.6 (1), 173.5 (1'), 176.2 (1''), 210.0 (3).

30

Compuesto 43

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, J=6.5 Hz), 0.89 (3H (5'), t, J=7.2 Hz), 0.90, (3H (5''), t, J=7.3 Hz), 1.21 (3H (16), s), 1.21 (3H (17), s), 1.28 (1H (14), d, J=6.6 Hz), 1.29-1.37 (2H (4''), m), 1.29-1.38 (2H (4'), m), 1.55-1.59 (2H (3''), m), 1.56-1.62 (2H (3'), m), 1.75 (3H (19), dd, J=2.9, 1.2 Hz), 1.91 (1H (11), dq, J=10.1, 6.5 Hz), 2.19 (1H (20-OH), t, J=6.6 Hz), 2.24-2.32 (2H (2'), m), 2.30-2.38 (2H (2''), m), 3.15 (1H (8), d, J=6.6 Hz), 3.25 (1H (7), s), 3.59 (1H (4-OH), s), 3.78 (1H (20), dd, J=12.6, 5.2 Hz), 3.85 (1H (20), dd, J=12.6, 7.4 Hz), 3.88 (1H (20-OH), d, J=3.1 Hz), 4.05 (1H (10), t, J=2.6 Hz), 4.21 (1H (5), d, J=2.3 Hz), 5.36 (1H (12), d, J=10.0 Hz), 5.85 (1H (9-OH), br. s.), 7.70 (1H (1), dd, J=2.3, 1.4 Hz).

35

40

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 13.65 (5''), 13.68 (5'), 15.1 (18), 17.0 (16), 22.1 (4''), 22.2 (4'), 23.7 (17), 26.4 (15), 26.5 (3''), 27.2 (3'), 34.0 (2''), 34.2 (2'), 35.9 (14), 36.0 (8), 45.5 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.6 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.6 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.6 (1), 173.5 (1'), 176.2 (1''), 209.9 (3).

Compuesto 44

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.86 (3H (18), d, J=6.2 Hz), 1.24 (3H (16), s), 1.26 (3H (17), s), 1.33 (1H (14), d, J=6.8 Hz), 1.74 (3H (19), dd, J=2.9, 1.3 Hz), 1.76-1.78 (2H (4'), m), 1.77-1.79 (2H (4''), m), 1.78-1.79 (3H (5''), m), 1.80-1.81 (3H (5'), m), 1.97 (1H (11), dq, J=9.9, 6.4 Hz), 2.19 (1H (20-OH), br.s.), 3.18 (1H (8), d, J=6.8 Hz), 3.27 (1H (7), s), 3.60 (1H (4-OH), s), 3.74-3.81 (1H (20), m), 3.86 (1H (20), br. s.), 3.89 (1H (5-OH), br. s.), 4.04-4.11 (1H (10), m), 4.22 (1H (5), s), 5.45 (1H (12), d, J=9.9 Hz), 6.28 (1H (9-OH), br. s.), 6.75-6.83 (1H (3'), m), 6.85-6.94 (1H (3''), m), 7.72 (1H (1), dd, J=2.6, 1.6 Hz).

45

50

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 9.7 (19), 11.8 (5''), 12.2 (5'), 14.4 (4'), 14.7 (4''), 15.2 (18), 17.3 (16), 23.7 (17), 26.8 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.5 (20), 65.3 (7), 65.6 (13), 71.7 (5), 72.4 (4), 77.0 (12), 77.2 (9), 128.2 (2'), 128.5 (2''), 133.4 (2), 137.6 (3'), 139.8 (3''), 164.9 (1), 167.5 (1'), 169.7 (1''), 210.0 (3).

ES 2 715 105 T3

Compuesto 45

5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.79 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 0.93 (3H (4'''), t, $J=7.5$ Hz), 1.13 (3H (5'''), d, $J=7.0$ Hz), 1.24 (3H (17), s), 1.28 (3H (16), s), 1.28 (1H (14), d, $J=6.7$ Hz), 1.45 (1H (3'''), dq, $J=14.1, 7.3$ Hz), 1.69-1.76 (1H (3'''), m), 1.71 (3H (19), dd, $J=2.8, 1.4$), 1.77 (3H (4''), dq, $J=7.1, 1-1$ Hz), 1.79-1.81 (3H (5''), m), 1.90 (1H (11), dq, $J=9.8, 6.5$ Hz), 2.01 (3H (2'''''), s), 2.18 (3H (2'), s), 2.38 (1H (2'''''), sxt, $J=7.0$ Hz), 2.99 (1H (4-OH), s), 3.15 (1H (7), s), 3.26 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.54 (1H (20), d, $J=12.1$ Hz), 4.14-4.17, (1H (10), m), 4.69 (1H (20), d, $J=12.1$ Hz), 5.42 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.52 (1H (5), s), 5.98 (1H (9-OH), br.s.), 6.80 (1H (3''), qq, $J=7.1, 1.3$ Hz), 7.62 (1H (1), dd, $J=2.3, 1.2$ Hz).

10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.8 (19), 11.6 (4'''), 12.2 (5''), 14.4 (4''), 15.0 (18), 16.2 (5'''), 17.3 (16), 20.7 (2'''''), 20.8 (2'), 23.7 (17), 26.2 (3'''), 26.7 (15), 36.0 (14), 36.1 (8), 41.2 (2'''''), 45.8 (11), 49.4 (10), 60.4 (6), 65.4 (7), 65.6 (13), 66.3 (20), 68.1 (5), 71.8 (4), 76.7 (12), 76.9 (9), 128.5 (2''), 133.8 (2), 137.6 (3''), 162.5 (1), 167.4 (1''), 168.8 (1'), 170.6 (1'''''), 178.9 (1'''), 206.3 (2).

Compuesto 46

15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.87 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 1.23 (3H (16), s), 1.25 (3H (17), s), 1.34 (1H (14), d, $J=6.8$ Hz), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.6, 1.0$ Hz), 1.82-1.85 (3H (6'), m), 1.82-1.85 (3H (6''), m), 1.93-1.99 (1H (11), m), 3.17 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.27 (1H (7), br.s.), 3.78 (1H (20), d, $J=12.6$ Hz), 3.85 (1H (20), d, $J=12.2$ Hz), 4.05-4.08 (1H (10), m), 4.22 (1H (5), d, $J=1.6$ Hz), 5.47 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.73 (1H (2'), d, $J=15.2$ Hz), 5.75 (1H (2''), d, $J=15.1$ Hz), 6.08-6.19 (1H (4'), m), 6.08-6.19 (1H (4''), m), 6.14-6.19 (1H (5'), m), 6.15-6.18 (1H (5''), m), 7.16-7.23 (1H (3'), m), 7.26-7.33 (1H (3''), m), 7.71-7.73, (1H (1), m).

20 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 15.2 (18), 17.2 (16), 18.7 (6'), 18.7 (6''), 23.6 (17), 26.7 (15), 36.1 (8), 36.2 (14), 45.9 (11), 49.0 (10), 61.6 (6), 64.6 (20), 65.3 (7), 65.6 (13), 71.7 (5), 72.4 (4), 77.0 (12), 77.1 (9), 117.7 (2''), 118.7 (2'), 129.7 (4'), 129.7 (4''), 133.4 (2), 139.7 (5'), 141.0 (5''), 145.5 (3'), 147.3 (3''), 164.8 (1), 166.8 (1'), 169.2 (1''), 210.0 (3).

Compuesto 47

25 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.89 (3H (18), d, $J=6.7$ Hz), 0.90 (3H (6'), t, $J=6.7$ Hz), 1.28 (3H (16), s), 1.29-1.34 (2H (4'), m), 1.30-1.35 (2H (5'), m), 1.31 (3H (17), s), 1.40 (1H (14), d, $J=6.6$ Hz), 1.60-1.65 (2H (3'), m), 1.77 (3H (19), dd, $J=2.7, 1.2$ Hz), 1.97 (1H (11), dq, $J=9.9, 6.5$ Hz), 2.14 (1H (20-OH), dd, $J=7.4, 6.4$ Hz), 2.30 (2H, (2'), td, $J=7.4, 7.3$ Hz), 2.87 (3H (MeNH), d, $J=4.8$ Hz), 3.22 (1H (8), d, $J=6.6$ Hz), 3.29 (1H (7), s), 3.80 (1H (20), dd, $J=12.5, 5.7$ Hz), 3.86 (1H (20), dd, $J=12.9, 7.8$ Hz), 4.08-4.11 (1H (10), m), 4.24 (1H (5), d, $J=2.5$ Hz), 5.53 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 6.30-6.37 (1H (9-OH), m), 6.52 (1H (6''), ddd, $J=7.9, 7.0, 0.9$ Hz), 6.64 (1H (4''), d, $J=8.4$ Hz), 7.36 (1H (5''), ddd, $J=8.4, 7.1, 1.4$ Hz), 7.56 (1H (3''NH), g, $J=4.8$ Hz), 7.75 (1H, 7''), dd, $J=8.2, 1.6$ Hz), 7.72-7.76 (1H (1), m).

30 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.8 (19), 14.0 (6'), 15.2 (18), 17.2 (16), 22.4 (5'), 23.9 (17), 24.9 (3'), 27.0 (15), 29.5 (MeNH), 31.2 (4'), 34.5 (2'), 36.1 (8), 36.2 (14), 45.7 (11), 49.0 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.4 (7), 65.5 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 76.8 (12), 77.4 (9), 108.6 (2'') 111-0 (4''), 114.5 (6''), 131.8 (7''), 133.6 (2), 135.6 (5''), 152.7 (3''), 164.4 (1), 170.2 (1''), 173.2 (1'), 209.9 (3).

Compuesto 48

40 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.9 (3H (18), d, $J=6.6$ Hz), 1.27 (3H (16), s), 1.32 (3H (17), s), 1.4 (1H (14), d, $J=6.6$ Hz), 1.77 (3H (19), dd, $J=2.7, 1.0$ Hz), 1.98 (1H (11), dq, $J=9.9, 6.5$ Hz), 2.05 (3H (2'), s), 2.88 (3H (MeNH), d, $J=5.1$ Hz), 3.22 (1H (8), d, $J=6.6$ Hz), 3.29 (1H (7), s), 3.80 (1H (20), dd, $J=12.2, 5.2$ Hz), 3.83~3.88 (1H (20), m), 4.09 (1H (10), br.s.), 4.24 (1H (5), d, $J=2.9$ Hz), 5.49 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 6.53 (1H (6''), t, $J=7.6$ Hz), 6.64 (1H (4''), d, $J=8.6$ Hz), 7.36 (1H (5''), ddd, $J=8.4, 7.0, 1.6$ Hz), 7.55 (1H (3''-NH), q, $J=4.6$ Hz), 7.73 (1H (1), s), 7.78 (1H (7''), dd, $J=8.0, 1.6$ Hz).

45 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.8 (19), 15.3 (18), 17.2 (16), 21.0 (2'), 23.9 (17), 27.1 (15), 29.5 (MeNH), 36.1 (8), 36.3 (14), 45.8 (11), 49.0 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.3 (7), 65.4 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 77.3 (9), 77.4 (12), 108.6 (2''), 111.0 (4''), 114.5 (6''), 131.9 (7''), 133.6 (2), 135.6 (5''), 152.7 (3''), 164.4 (1), 170.3 (1''), 170.4 (1'), 209.9 (3).

Compuesto 49

50 ^1H RMN (500MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.86 (3H (7'), t, $J=6.7$ Hz), 0.86 (3H (7''), t, $J=6.7$ Hz), 1.20 (3H (16), s), 1.20 (3H (17), s), 1.22-1.32 (12 H, (4', 5', 6', 4'', 5'', 6''), m), 1.28 (1H (14), d, $J=6.7$ Hz), 1.55-1.63 (4H (3', 3''), m), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.6, 1.0$ Hz), 1.90 (1H (11), m), 2.28 (2H (2''), m), 2.32 (2H (2'), m), 3.14 (1H (8), d, $J=6.7$ Hz), 3.25 (1H (7), s), 3.65 (1H (4-OH), s), 3.81 (2H (20), br.s.), 3.97 (1H (5-OH), br.s.), 4.05 (1H (10), t, $J=2.6$ Hz), 4.21 (1H (5), s), 5.35 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.85 (1H (9-OH), br.s.), 7.70 (1H (1), dd, $J=2.6, 1.6$ Hz),

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 14.0 (7'), 14.0 (7''), 15.0 (18), 17.0 (16), 22.4 (6''), 22.5 (6'), 23.7 (17), 24.4 (3'), 25.1 (3''), 26.3 (15), 28.7 (4'), 28.7 (4''), 31.4 (5'), 31.4 (5''), 34.3 (2'), 34.5 (2''), 35.9 (8), 35.9 (14), 45.4 (11).

48.9 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.6 (13), 71.3 (5), 72.4 (4), 76.5 (9), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.5 (1), 173.5 (1'), 176.2 (1''), 209.8 (2).

Compuesto 50

- 5 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.85 (3H (14'), t, $J=6.8$ Hz), 1.20 (3H (16), s), 1.20 (3H (17), s), 1.21-1.28 (20H (4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13'), m), 1.30 (1H (14), d, $J=6.8$ Hz), 1.60 (2H (3'), quin, $J=7.3$ Hz), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.91 (1H (11), dq, $J=10.1, 6.5$ Hz), 2.07 (3H (2''), s), 2.23-2.34 (2H (2'), m), 3.14 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.24 (1H (7), s), 3.46 (1H (5-OH), s), 3.65 (1H (4-OH), s), 3.77-3.83 (2H (20), m, $J=3.1$ Hz), 3.97 (1H (20-OH), d, $J=3.1$ Hz), 4.04 (1H (10), t, $J=2.6$ Hz), 4.21 (1H (5), d, $J=2.1$ Hz), 5.36 (1H (12), d, $J=10.4$ Hz), 5.70 (1H (9-OH), br.s.), 7.69 (1H (1), dd, $J=2.6, 1.6$ Hz).
- 10 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 14.1 (14'), 15.0 (18), 17.0 (16), 21.0 (2''), 22.7 (13'), 23.6 (17), 25.1 (3'), 26.2 (15), 29.0 (4'), 29.2 (5'), 29.3 (6'), 29.5 (7'), 29.6 (8'), 29.6 (8'), 29.6 (9'), 29.6 (10'), 29.6(11'), 31.9 (12'), 34.5 (2'), 35.8 (14), 35.9 (8), 45.3 (11), 48.9 (10), 61.8 (6), 64.6 (20), 65.2 (7), 65.8 (13), 71.2 (5), 72.4 (4), 76.5 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.4 (1), 173.6 (1'), 173.6 (1''), 209.8 (3).

Compuesto 51

- 15 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.84 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.86 (3H (14'), t, $J=7.0$ Hz), 0.92 (3H (4''), t, $J=7.5$ Hz), 1.12 (3H (5''), d, $J=6.8$ Hz), 1.21 (3H (16), s), 1.22 (3H (17), s), 1.21-1.31 (20H (4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13'), m), 1.25 (1H (14), d, $J=6.2$ Hz), 1.44 (1H (3''), ddq, $J=14.0, 7.1, 7.1$ Hz), 1.60 (2H (3'), m), 1.71 (1H (3''), ddq, $J=14.0, 7.5, 7.5$ Hz), 1.75 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.90 (3H (11), dq, $J=10.1, 6.5$ Hz), 2.18 (1H (20-OH), m, $J=6.8, 4.7$ Hz), 2.28 (2H (2'), m, $J=11.4, 7.4$ Hz), 2.36 (2H (2''), sxt, $J=7.3$ Hz), 3.15 (1H (8), d, $J=6.8$ Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.57 (1H (4-OH), d, $J=1.0$ Hz), 3.78 (1H (20), dd, $J=12.5, 4.2$ Hz), 3.86 (1H (20), dd, $J=12.5, 6.8$ Hz), 3.87 (1H (5-OH), d, $J=3.1$ Hz), 4.05 (1H (10), m, $J=2.6$ Hz), 4.21 (1H (5), d, $J=2.6$ Hz), 5.37 (1H (12), d, $J=9.9$ Hz), 5.98 (1H (9-OH), br.s.), 7.71 (1H (1), dd, $J=2.6, 1.6$ Hz).
- 20
- 25 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.6 (4''), 14.1 (14'), 15.1 (18), 16.1 (5''), 17.2 (16), 22.7 (13'), 23.7 (17), 25.2 (2'), 26.2 (3''), 26.6 (15), 29.0 (5'), 29.3 (4'), 29.3 (4''), 29.5 (6'), 29.6 (8'), 29.6 (9'), 29.6 (10'), 29.7 (11'), 31.9 (12'), 34.6 (2'), 36.0 (8), 36.1 (14), 41.2 (2''), 45.6 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.5 (13), 71.6 (5), 72.4 (4), 76.5 (12), 77.2 (9), 133.5 (2), 164.7 (1), 173.3 (1'), 178.8 (1''), 209.9 (3).

Compuesto 52

- 30 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.85 (3H (18), d, $J=6.8$ Hz), 0.90 (3H (4'), t, $J=7.5$ Hz), 1.11 (3H (5'), d, $J=7.3$ Hz), 1.19 (3H (16), s), 1.21 (3H(17),s), 1.31 (1H (14), d, $J=6.8$ Hz), 1.44-1.56 (1H (3'),m), 1.58-1.67 (1H (3'), m), 1.74 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 1.88-1.96 (1H (11), m), 2.08 (3H (2''), s), 2.33-2.43 (2H (2'), m), 3.15 (1H (8), d, $J=6.2$ Hz), 3.25 (1H (7), s), 3.59 (1H (4-OH), br.s.), 3.78 (1H (20), d, $J=13.0$ Hz), 3.85 (1H (20), d, $J=12.5$ Hz), 4.05 (1H (10), t, $J=2.9$ Hz), 4.21 (1H (5), s), 5.38 (1H (12), d, $J=10.4$ Hz), 5.74 (1H (9-OH), br.s.), 7.71 (1H (1), dd, $J=2.3, 1.3$ Hz).
- 35 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.7 (19), 11.3 (4'), 15.0 (18), 16.5 (5'), 17.0 (16), 21.0 (2''), 23.6 (17), 26.1 (15), 26.9 (3'), 35.7 (14), 35.9 (8), 41.2 (2'), 45.3 (11), 48.9 (10), 61.7 (6), 64.5 (20), 65.2 (7), 65.8 (13), 71.5 (5), 72.4 (4), 76.2 (12), 76.9 (9), 133.5 (2), 164.6 (1), 173.6 (1''), 176.4 (1'), 209.9 (3).

Compuesto 53

- 40 ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (3H (6'), m, $J=7.3$ Hz), 1.06 (3H (18), d, $J=6.2$ Hz), 1.18 (3H (16), s), 1.25 (3H (17), s), 1.25 (1H (14), d, $J=7.3$ Hz), 1.27-1.33 (4H (4', 5'), m), 1.59-1.65 (2H (3'), m), 1.74-1.80 (1H (11), m), 1.76 (3H (19), dd, $J=2.9, 1.3$ Hz), 2.23 (1H (20-OH), t, $J=6.2$), 2.35 (2H (2'), td, $J=7.5, 1.6$ Hz), 3.06 (1H (8), d, $J=7.3$ Hz), 3.26 (1H (7), s), 3.57 (1H (4-OH), s), 3.77 (1H (10), t, $J=2.6$ Hz), 3.81 (2H (20), dd, $J=7.3, 4.7$ Hz), 3.94 (1H (12), dd, $J=9.1, 1.3$ Hz), 4.2 (1H (5), s), 7.69, (1H (1), dd, $J=2.3, 1.3$ Hz).
- 45 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ ppm: 9.8 (19), 13.9 (6'), 16.3 (18), 17.2 (16), 22.3 (5'), 23.3 (17), 24.5 (3'), 28.0 (15), 31.3 (4'), 34.0 (2'), 34.8 (14), 36.5 (8), 47.2 (11), 50.8 (10), 62.5 (6), 65.0 (20), 66.0 (7), 68.6 (13), 71.4 (5), 72.1 (4), 77.7 (9), 78.2 (12), 134.0 (2), 163.7 (1), 177.3 (1'), 209.6 (3).

Compuesto 60

HPLC: columna Kinetex C18 de 4.6 mm, 0.8 mL/min, metanol-agua (70:30). Tiempo de retención: 10.9 minutos.

Ejemplos de efectos in vitro en los tipos celulares implicados en la cicatrización de heridas

Ejemplo 4: Cierre de rasguño y migración de fibroblastos in vitro

- 50 Se determinó la capacidad de los fibroblastos de prepucio neonatal de paso temprano (NFF) cultivados en RPMI 1640- 10% de suero de ternera fetal para migrar a través de una herida por rasguño hecha en una monocapa

confluente posteriores al tratamiento con compuestos purificados o extractos de plantas, usando una o más de los siguientes tres métodos.

Método 1

5 Las células se sembraron en pocillos de 16 mm de diámetro (placas de 24 pocillos), se dejaron confluentes y se hicieron 2 rasguños en cada pocillo usando una punta de pipeta de plástico estéril. Se eliminó el medio, se lavaron los pocillos con solución salina regulada ~ fosfato pH 7.2 (PBS) para eliminar las células desplazadas, se añadió medio fresco seguido de diluciones seriadas de 10 veces del compuesto puro o extracto vegetal (2 µL). La incubación se continuó durante 16 a 30 h. El experimento finalizó cuando los bordes de los rasguños de los cultivos no tratados habían cerrado aproximadamente el 25% de la brecha inicial. Las monocapas se lavaron con PBS, se fijaron con etanol y se tiñeron con cristal violeta al 0.05%. Las fotomicrografías de cada pocillo (microscopio EVOS) se imprimieron y cada rasguño se midió en 3 lugares para determinar el ancho medio. El cierre acelerado de la herida se consideró significativo si la brecha restante era <40% de la brecha de los controles no tratados.

Método 2

15 Las células se sembraron en pocillos de 6 mm (placas de 96 pocillos) o 16 mm (placas de 24 pocillos), con 2 a 6 pocillos duplicados/dilución, y se trataron como en el método 1. Inmediatamente después del tratamiento, los bordes de los rasguños se delinearón en la parte inferior del pocillo con un rotulador de punta fina. Después de la fijación y la tinción, la migración se evaluó bajo el microscopio con la ayuda de una grátícula, anotando la migración como 0, 25, 50, 75 o 100% (cierre total) del ancho inicial. El cierre acelerado de la herida se consideró significativo si el cuartil medio de réplicas era menor que el de los controles no tratados (p <0.05, prueba t). Además, las áreas "heridas" se crearon sembrando células en presencia de pasadores de acero inoxidable de 3 mm (placa de 96 pocillos), o insertando anillos de teflón con aletas. Estos dispositivos se eliminaron después de la incubación durante la noche de las células NFF.

Método 3

25 Las células se sembraron y se trataron en placas de 96 pocillos como en el método 2 (5 pocillos duplicados por dilución), excepto que los rasguños se hicieron en una acción con una herramienta que tiene 96 pines recubiertos de teflón de 1 mm de espesor (Essen Bioscience Woundmaker). Luego se colocó la placa en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37 °C en un instrumento IncuCyte FLR programado para fotografiar cada pocillo con contraste de fase a intervalos de 3 horas, durante 42 horas. El software determinó los límites de rasguño iniciales y su velocidad de cierre. El cierre acelerado de la herida se consideró significativo si la velocidad inicial de cierre era > 10% de los controles no tratados.

Los resultados se muestran en las tablas 7 a 9.

Tabla 7: Velocidades de cierre de rasguños en fibroblastos neonatales humanos después del tratamiento con compuestos puros

Compuesto	Método 1		Método 2		Método 3	
	Conc. de prueba (ng/mL)	% de cierre comparado con el control	Conc. de prueba (ng/mL)	% de cierre comparado con el control	Conc. de prueba (ng/mL)	% de cierre comparado con el control
1	30	166	200	180	30	150
1	100	146			100	160
2	30	130			30	147
2	100	129				
3					200	270
5					30	209
5					200	300
8			200	190		
11					200	270
18					200	220

27			1000	158	2000	130
28					200	140
21					200	200
22					200	400
23					200	130

El sombreado gris con negrita indica que la velocidad de cierre de rasguños es significativamente más alta que el tratamiento de control

5 Se demostró que todos los compuestos puros tienen velocidades significativamente mejoradas de cierre de rasguños en comparación con los tratamientos de control de vehículo solo.

Tabla 8: Velocidades de cierre de rasguño en fibroblastos neonatales humanos después del tratamiento con extractos etanólicos no fraccionados de diferentes partes de plantas de *Fontainea picrosperma*

Parte de la planta	Método 1		Método 2		Método 3	
	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control
hoja	5000	268	5000	300	5000	220
tallo	5000	367				
corteza	500	397	500	200		
endosperma	500	128	500	270		
exocarpio	500	167				
Fruta inmadura	5 x 10 ⁴	300				

10 El sombreado en gris y en negrita indica que la velocidad de cierre de rasguño es significativamente más alta que el tratamiento de control

Los extractos en bruto etanólicos de todas las partes de la planta de *Fontainea picrosperma* que se probaron tuvieron velocidades significativamente mayores de cierre de rasguños en comparación con el tratamiento de control de vehículo solo.

15 Tabla 9: Velocidades de cierre de rasguño en fibroblastos neonatales humanos después del tratamiento con extractos etanólicos no fraccionados de diferentes partes de plantas de tres especies de plantas diferentes

Parte de la planta	Método 1		Método 2		Método 3	
	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control	Dilución del extracto	% de cierre comparado con el control
<i>Fontainea australis</i>						
hoja					500	163
tallo					5000	203
<i>Fontainea rostrata</i>						
hoja	500	101			500	141

<i>Hylandia dockrillii</i>						
hoja	5000	187				
tallo	500	390			500	129
corteza	500	192	5000	121		
fruta	500	385				

El sombreado en gris y en negrita indica que la velocidad de cierre de rasguño es significativamente más alta que el tratamiento de control

5 Los extractos de partes de plantas de otras dos especies de *Fontainea*, *F. australis* y *F. rostrata*, y la especie estrechamente relacionada *Hylandia dockrillii* demostraron velocidades de cierre de rasguños significativamente mayores en comparación con el tratamiento de control de vehículo solo.

10 Adicionalmente, las observaciones de las placas de prueba bajo el microscopio (Método 1) sugirieron que los fibroblastos mostraron una gran diferencia en el patrón de tinción posteriores al tratamiento con el compuesto 1. Una investigación más cercana reveló que esto se debió a que las células aparentemente crecieron de manera multicapa, lo que indica potencialmente una pérdida de inhibición de contacto, un aumento en la proliferación o capacidad de remodelación. En las figuras 1 y 2 se ilustran ejemplos de cierre de rasguños en el control y el tratamiento del compuesto 1 a las 24 horas posteriores al rasguño, respectivamente.

Ejemplo 5: Ensayo de invasión de Matrigel para la capacidad migratoria de los fibroblastos neonatales humanos

15 Las cámaras de invasión de Matrigel proporcionan a las células las condiciones que permiten la evaluación de su propiedad invasiva in vitro. Las cámaras de invasión de Matrigel consisten en una placa de cultivo celular con insertos de cultivo celular que contienen una membrana PET de 8 micras de poro con una capa delgada de Matrigel Basement Membrane Matrix. La matriz de Matrigel sirve como una membrana basal reconstituida in vitro. La capa ocluye los poros de la membrana, impidiendo que las células no invasivas emigren a través de la membrana. En contraste, las células invasivas son capaces de separarse e invadir a través de la matriz de Matrigel y los poros de la membrana de 8 micras. La membrana se puede procesar para microscopía óptica y electrónica y se puede retirar fácilmente después de la tinción.

25 Las cámaras se usaron según las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación en dos estudios, para evaluar los efectos de los compuestos 1, 2, 5 y 42 en la migración de fibroblastos neonatales humanos. El primer estudio evaluó los efectos de tres concentraciones (0, 10 y 30 ng/mL) del compuesto 1 sobre los fibroblastos neonatales en los pocillos que contienen medios con un 10% de suero de ternera fetal. El segundo estudio usó dos concentraciones (0 y 30 ng/mL) para cada uno de los compuestos 1, 2, 5 y 42 para examinar los efectos sobre la migración de los fibroblastos neonatales sin alimento durante 2 días antes del tratamiento y luego se transfirieron a los medios con suero de ternera fetal al 1%.

Rehidratación

30 El paquete que contenía las cámaras se retiró del almacenamiento a -20 °C y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Se añadió medio de cultivo a base de bicarbonato caliente (37 °C) al interior de los insertos (500 µL) y al fondo de los pocillos (750 µL). Las cámaras que contenían el Matrigel se dejaron rehidratar durante 2 horas en una incubadora de cultivo de tejido humidificado, a 37 °C, 5% de atmósfera de CO₂. Después de la rehidratación, el medio se eliminó cuidadosamente por aspiración sin alterar la capa de Matrigel™ Matrix en la membrana.

35 Estudios de invasión

40 Las células se recogieron y se volvieron a suspender a 20,000 células por mL. Se colocó un total de 250 µL de la suspensión celular en el interior del inserto (5,000 células). Luego se añadieron 250 µL adicionales de medio que contenían los compuestos respectivos al interior del inserto para obtener las concentraciones finales deseadas para cada uno de los dos estudios. Un total de 750 µL de medio que contenía concentraciones apropiadas de cada compuesto en cada tratamiento se colocaron en el pocillo debajo del inserto apropiado. Las cámaras de Matrigel se incubaron luego durante 24 horas en una incubadora de cultivo de tejido humidificado, a 37 °C, 5% de atmósfera de CO₂.

Medida de invasión celular.

45 Las células no invasivas se eliminaron de la superficie superior de la membrana mediante "lavado". Se sumergió un hisopo con punta de algodón en el inserto después de retirar el medio, y se aplicó una presión firme mientras se movía la punta sobre la superficie de la membrana. El lavado se repitió con un segundo hisopo humedecido con

PBS. Las células que habían invadido la superficie externa del inserto se fijaron luego colocando en 500 μ L de metanol al 100% durante al menos 5 minutos. Los insertos se transfirieron luego a una placa que contenía 500 μ L de violeta de cristal al 0.1% en metanol y se tiñeron durante al menos 15 minutos. Los insertos se destruyeron al pasar a través de 3 placas acompañantes que contenían 500 μ L de agua, antes de ser secadas al aire.

- 5 Al día siguiente, la membrana se retiró del alojamiento del inserto invirtiendo el inserto e insertando la punta de una cuchilla de bisturí afilada a través de la membrana en el borde adyacente a la pared del alojamiento. El alojamiento de inserto se giró contra la cuchilla estacionaria y se liberó la membrana. La membrana se sacó del alojamiento con unas pinzas y se colocó boca abajo en 10 μ L de solución de glicerol de Kaiser y se cubrió con un cubreobjetos. Se dejaron secar los portaobjetos durante la noche, antes de contar las células invasivas.

10 Resultados

En el primer estudio, los fibroblastos tratados con ya sea 10 o 30 ng/mL del compuesto 1 mostraron una capacidad migratoria aumentada en el sistema de cámara de invasión de Matrigel en comparación con las células tratadas con vehículo solo (Figura 3). El segundo estudio confirmó los resultados del primer estudio con el compuesto 1 y demostró niveles similares de mejora en la capacidad migratoria para los compuestos 2, 5 y 42 (Tabla 10).

- 15 Tabla 10: Ensayo de invasión de Matrigel de células de fibroblastos neonatales humanos tratadas con 30 ng/mL de cada compuesto. Los datos se expresan como un % de aumento en la invasión de la membrana en comparación con el control de vehículo solo, más o menos las desviaciones estándar de dos experimentos duplicados. Las células se contaron después de 24 horas de incubación.

Compuesto	Recuento de células como % de control (Control = sin compuestos añadidos)
1	356 \pm 141
2	366 \pm 122
5	218 \pm 21
42	350 \pm 101

- 20 Ejemplo 6: repoblación y cierre de rasguños con queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) in vitro

La capacidad de las células de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) para migrar a través de una herida por rasguño hecha en una monocapa confluyente posteriores al tratamiento con el compuesto 1 o el compuesto 37 se determinó mediante el siguiente método,

- 25 Se sembraron células HaCaT tripsinizadas a una densidad celular de 7.4×10^4 células/mL en placas de cultivo de tejidos de fondo plano BD Falcon de 24 pocillos (VWR International, Reino Unido) en 1 mL de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con L -glutamina (2 mM), antibióticos (100 U/mL de penicilina G de sodio, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomycin y 0.25 μ g/mL de anfotericina B); y un 10% de suero de ternera fetal (todos Invitrogen Ltd., Reino Unido) para dar una densidad celular de 7.4×10^4 células sembradas en cada pocillo. Las células se mantuvieron luego a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%/aire al 95% durante la noche. A la mañana siguiente, el 10% de DMEM que contenía suero de ternera fetal se reemplazó con DMEM sin suero y las células HaCaT posteriormente se privaron de suero en DMEM durante 48 horas.

- 30 Después de 48 horas, se eliminó el DMEM sin suero y se realizó una única "herida" por rasguño con una pipeta estéril a través de cada capa celular. Después de lavar dos veces en 1 mL de PBS, se añadió a cada pocillo medio que contenía el compuesto 1 o el compuesto 37 (1 mL). Este medio consistió en DMEM, complementado con L-glutamina (2 mM), antibióticos (como anteriormente) y suero de ternera fetal al 1%, además del compuesto 1 o compuesto 37 a concentraciones finales de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 o 100 μ g/mL. Hubo tres pocillos duplicados por concentración para cada compuesto.

- 35 Los cultivos de HaCaT se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%/aire al 95% y la repoblación de las áreas "heridas" despojados se monitorearon mediante microscopía confocal de lapso de tiempo (Leica TCS SP5 Confocal Microscope, Leica Microsystems UK Ltd., Reino Unido) un aumento 100x., con imágenes digitales capturadas en posiciones fijas cada 20 minutos durante un período de 48 horas. Las secuencias de imágenes digitales se exportaron y prepararon como archivos de película avi, usando el software LAS AF (Leica Microsystems). Las velocidades de cierre de la herida de HaCaT in vitro se cuantificaron usando ImageJ Software (ImageJ 1.37v; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía con un análisis de Tukey posterior a la prueba. Cada experimento se realizó en 3 ocasiones diferentes.

- 45 A las 48 horas después de la aplicación, el compuesto 1 aumentó significativamente la velocidad de cierre del rasguño ($p < 0.01$) en comparación con el tratamiento de control en concentraciones de 0.001, 0.01 y 0.1 ng/mL

(Tabla 11). A las 48 horas, el compuesto 37 también aumentó la velocidad de cierre de rasguños. ($p < 0.01$) en comparación con el tratamiento de control en concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 11).

5 Tabla 11: Extensión de la repoblación y el cierre de rasguños por células de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) a 48 horas posteriores al tratamiento en un intervalo de concentraciones del compuesto 1 y del compuesto 37. Los datos son para el % de la zona de la herida por rasguño que permanece abierta posteriores al tratamiento (\pm errores estándar).

Compuesto	Concentración del compuesto (μg del compuesto/ml de medio de crecimiento)					
	0	0.001	0.01	0.1	1.0	10
1	43.8 \pm 3.6	8.6 \pm 9.4	19.7 \pm 9.3	21.4 \pm 5.8	35.4 \pm 7.9	45.5 \pm 7.3
37	49.5 \pm 5.4	4.3 \pm 4.1	0.9 \pm 1.5	2.2 \pm 3.4	30.0 \pm 5.3	37.1 \pm 7.1

10 Para determinar si los efectos del compuesto 1 y del compuesto 37 para mejorar la repoblación y el cierre del rasguño como se muestra en la tabla 11 fueron mediados por la proliferación o migración celular, se realizaron dos experimentos adicionales. El primero de estos experimentos abordó los aspectos de la migración y repitió el estudio de repoblación de rasguños, pero con la adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C al medio al mismo tiempo que se aplicaron los compuestos. Se sabe que la mitomicina C inhibe la proliferación celular, incluida la de las células HaCaT; y se determinó que no era citotóxico en el sistema de cultivo a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados de este estudio de migración encontraron una repoblación y un cierre mejorados ($p < 0.05$) del rasguño en concentraciones entre 0.001 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ para el compuesto 1 y el compuesto 37.

15 El experimento de proliferación evaluó los efectos de los dos compuestos sobre la proliferación de HaCaT (medido por MTT) en el sistema de cultivo en 4 períodos de tiempo (24, 48, 120 y 168 h). Ambos compuestos 1 y 37 tuvieron un efecto significativo ($p < 0.01$) en el aumento de la proliferación de células HaCaT en un intervalo de concentraciones entre 0.001 y 10 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con el tratamiento de control sin compuesto añadido.

20 Estos resultados demuestran que tanto la proliferación como la migración celular mejorada están implicadas en el procedimiento de repoblación y cierre de rasguños con los compuestos 1 y 37.

Ejemplo 7: diferenciación de monocitos en macrófagos por los compuestos

25 Los macrófagos desempeñan numerosos papeles en la cicatrización de heridas, incluyendo la eliminación de residuos celulares y tejido necrótico en la etapa inicial inflamatoria, seguida por el apoyo de la proliferación celular y la restauración del tejido durante las últimas etapas de la cicatrización. Se considera que el fenotipo M1 está asociado con la etapa inflamatoria temprana y el fenotipo M2 con la etapa de cicatrización.

30 Para determinar los efectos potenciales del compuesto 1 y otros quince compuestos epoxi-tiglicianos en la matriz sobre la diferenciación de monocitos, se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante sedimentación Ficoll-Paque de sangre heparinizada de un hombre de 72 años de edad donante humano, y se colocaron en placas a 100,000 células/pocillo en RPMI-1640 FCS al 10%. Los pocillos duplicados se trataron con diluciones de 10 veces de los compuestos y se incubaron a 37 °C, durante 4 días. Los pocillos se puntuaron visualmente para la unión celular y la morfología, luego se lavaron dos veces con PBS, se tiñeron con sulfurodamina y la tinción incorporada se cuantificó en un lector ELISA. Las placas se lavaron luego con agua y se tiñeron con cristal violeta al 1% en metanol para la fotografía y la puntuación de la morfología de las células adherentes.

35 Los resultados de un experimento de dosis-respuesta con PBMC humanas (Tabla 12) mostraron que los dieciséis compuestos epoxi-tiglicianos probaron monocitos de sangre periférica diferenciados en macrófagos a concentraciones ng, según se juzgó por adherencia y morfología, que era una mezcla de células dendríticas típica del fenotipo M2 y las células redondeadas típicas del fenotipo M1.

40 Tabla 12: Concentraciones de punto final en series de dilución para la inducción del fenotipo macrófago en monocitos de sangre periférica humana por compuestos epoxi-tiglicianos en la matriz.

Compuesto	Punto final de diferenciación (ng/mL)
1	1
2	1
3	10

5	1
8	10
21	10
22	100
23	1
24	1
41	0.1
42	1
49	1
50	1
51	1
52	10
53	100

Ejemplo 8: Efectos de los compuestos 1 y 37 en la diferenciación de fibroblastos dérmicos adultos en miofibroblastos

5 Los fibroblastos juegan un papel central en el procedimiento de la cicatrización de heridas y, cuando se activan, se diferencian en un fenotipo miofibroblástico que se caracteriza por la expresión de la α -actina del músculo liso (α -SMA). Si bien los miofibroblastos contribuyen a la reparación del tejido y al cierre de las heridas, su sobreexpresión se asocia con una cicatrización deficiente y una cicatrización excesiva.

Los efectos de los compuestos 1 y 37 sobre la diferenciación de fibroblastos dérmicos a miofibroblastos se examinaron por el grado de expresión de α -SMA por fibroblastos dérmicos estimulados por TGF- β_1 .

Métodos

10 Después de la tripsinización, los fibroblastos se sembraron en portaobjetos Permanoxchamber de 8 pocillos (VWR internacional) en medio DMEM, que contenían antibióticos, L-glutamina 2 mM y suero de ternera fetal al 10% (250 μ L, todos comprados de Invitrogen); a una densidad celular de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo y se mantuvo a 37 °C en CO₂ al 5%/aire al 95% durante 48 h.

15 A las 48 horas, los fibroblastos se detuvieron en el crecimiento en DMEM sin suero durante 48 horas y luego se reemplazaron con DMEM sin suero (250 μ L), que contenían los compuestos 1 o 37 en concentraciones de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 μ g/mL (3 pocillos/concentración/compuesto) y TGF- β_1 (10 ng/ml, Peprotech). Los fibroblastos se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5%/aire al 95% durante 72 horas.

20 A las 72 h, los pocillos del portaobjetos de la cámara se lavaron con PBS (x1, 250 μ L) y se fijaron en paraformaldehído al 4% (100 μ L/pocillo) durante 10 minutos. Luego los pocillos del portaobjetos de la cámara se lavaron de nuevo con PBS (x1, 250 μ L), se trataron con Triton X-100 al 0.1% en PBS (100 μ L, Sigma) durante 5 minutos y se volvieron a lavar con PBS (x1, 250 μ L). Los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en PBS (250 μ L, Sigma) durante 1 hora y se lavaron (x3) en BSA al 0.1%/PBS.

25 Los pocillos se incubaron con α -SMA antihumano monoclonal de ratón, clon 1A4 (1:100, 150 μ L, Sigma) a 4 °C, durante la noche, se lavaron (x6) en BSA al 0.1%/PBS y se incubaron con Alexa Fluor 488 anticuerpo IgG antiratón de cabra (1:1000, 250 μ L, Invitrogen), a temperatura ambiente durante 1 h, en la oscuridad. Los portaobjetos de la cámara se lavaron (x6) en BSA al 0.1%/PBS y se contratificaron con solución Hoescht 33258 durante 30 minutos en la oscuridad (1:2000, 250 μ L, Sigma). La cámara se retiró posteriormente para los portaobjetos y se trató con Fluorsave (Santa Cruz) durante 10 minutos en la oscuridad. Los portaobjetos se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Leica Microsystem), y las imágenes digitales se capturaron con un aumento de 200 x. Las imágenes digitales se procesaron usando el software HC Image J.

30 Resultados

- En el tratamiento de control con TGF- β_1 pero sin compuestos añadidos, los fibroblastos dérmicos adultos se diferenciaron en miofibroblastos, por lo general caracterizados por una mayor expresión de α -SMA, ensamblaje de fibra de estrés de α -SMA y el desarrollo general de una morfología celular poligonal agrandada. En contraste, la exposición de fibroblastos dérmicos adultos tratados con TGF- β_1 al compuesto 1 y al compuesto 37 afectó la diferenciación en miofibroblastos de una manera dependiente de la concentración. En el caso del compuesto 1 a una concentración de 0.1 μ g/mL, los cultivos de fibroblastos carecían de la formación de fibra de estrés α -SMA y de la morfología celular poligonal típica, representativa de la diferenciación de miofibroblastos (Figura 5). Con el compuesto 37 hubo un efecto perturbador sobre la formación de fibras de estrés de α -SMA y el desarrollo de la morfología poligonal a una concentración de 10 μ g/mL (Figura 6).
- Adicionalmente, parece haber otras alteraciones sutiles en la morfología de los miofibroblastos en el intervalo de concentraciones entre 1 y 10 μ g/mL del compuesto 1 y entre 0.1 y 1.0 μ g/mL para el compuesto 37 (Figuras 5 y 6).
- Los efectos específicos de los compuestos sobre la diferenciación de fibroblastos/miofibroblastos pueden ser relevantes para la formación mínima de cicatrices observada en heridas tratadas in vivo con el compuesto 1 (Ejemplos 16 y 17).
- Ejemplo 9: Inducción del estallido de oxígeno reactivo por neutrófilos en respuesta al compuesto 1**
- Los neutrófilos son células fagocíticas dedicadas del sistema inmune innato y su influjo y activación es esencial para la eliminación de bacterias, hongos y desechos celulares durante las etapas iniciales de la cicatrización de heridas. La amplia actividad antimicrobiana de los neutrófilos se basa en varias estrategias, incluidas los estallidos de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Se realizó un estudio para evaluar los efectos potenciales del compuesto 1 en la inducción del estallido de oxígeno reactivo por los neutrófilos.
- Los neutrófilos se aislaron a partir de sangre fresca de un donante humano sano mediante la lisis de pellas de glóbulos rojos que se habían obtenido mediante sedimentación de Ficoll-Paque. Los neutrófilos ($\sim 4 \times 10^6$ células/mL) se incubaron con 10 μ g/ml de dihidroetidio (DHE) (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo completo a 37 °C, durante 15 minutos junto con una parte alícuota de células sin teñir para analizarlas como control no teñidas. Esta incubación fue seguida por el tratamiento con el compuesto 1 en un intervalo de concentraciones (0, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) durante 15 min. La generación de especies reactivas de oxígeno después de la incubación se determinó usando un citómetro de flujo FACS Canto para medir la fluorescencia debida a la oxidación de DHE al ion etidio.
- Este estudio no encontró producción de ROS en el tratamiento de control sin el compuesto 1 presente. En contraste, el compuesto 1 indujo la producción significativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) de una manera dependiente de la dosis, y la producción de ROS aumentó con las concentraciones del compuesto 1.
- Ejemplos de efectos de compuestos en proteínas, genes y citoquinas relevantes para mejorar los resultados de la cicatrización de heridas
- Ejemplo 10: Análisis molecular de fibroblastos neonatales humanos tratados con los compuestos 1 y 42**
- El método de Western Blot se usó para identificar los efectos de los compuestos 1 y 42 sobre proteínas relevantes para la reparación y cicatrización en células de fibroblastos neonatales humanos (NFF). Se realizaron dos estudios. En el primer estudio, los NFF se trataron con ya sea 10 o 30 ng del compuesto 1/mL durante 6 o 24 horas, antes de la recolección y extracción de proteínas. En el segundo estudio, los NFF se trataron individualmente con concentraciones de 30 ng/mL de los compuestos 1 y 42, respectivamente, durante 6 horas. Los lisados resultantes de ambos estudios se sometieron a un análisis de transferencia Western y se sondaron con anticuerpos específicos contra moléculas de señalización clave implicadas en la reparación y cicatrización de heridas.
- Preparación de muestras de proteínas para transferencia Western.
- Se eliminó el medio de fibroblastos neonatales humanos adherentes cultivados en placas de 75 cm² y las células se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. Las células unidas se recogieron en 10 mL de PBS enfriado en hielo usando un raspador celular (Costar®, Corning) pelletizado por centrifugación durante 5 min (1,500 rpm, RTemp), se volvieron a suspender en 1 mL de PBS enfriado con hielo y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Las células se recolectaron por centrifugación (13,200 rpm, RTemp, 2 s), se eliminó el PBS y se almacenaron las pellas a -20 °C hasta que se necesitaran.
- Las pellas congeladas se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en un volumen de solución reguladora de lisis celular 3 a 4 veces el volumen de las pellas pipeteando hacia arriba y hacia abajo. La suspensión celular se sometió a sonicación durante 60 s a 4 °C y se centrifugó durante 20 min (13,200 rpm, 4 °C) y la interfase que contenía la proteína se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. La proteína se almacenó a -20 °C.

Determinación de la concentración de proteínas.

Las concentraciones de proteína se determinaron usando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). Este método se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por la proteína en una solución alcalina. El Cu^{1+} formado es quelado posteriormente con ácido bicinónico (BCA) formando un producto de reacción púrpura.

- 5 Las muestras de proteínas se diluyeron 1/10 y 1/20 (v/v) en agua MilliQ y se sembraron 10 μL en duplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar®, Corning). Se prepararon soluciones madre de albúmina de suero bovino (BSA) a 100, 200, 400, 600, 1,000 y 1,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se sembraron por duplicado 10 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ y se analizaron junto con las muestras. El reactivo de trabajo BCA se preparó mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B y dividiendo en partes alícuotas de 100 μL en cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C, durante 30-45 minutos para permitir que se produjera la reacción. Las absorbancias en bruto se leyeron a 590 nm en un lector de microplacas (VERSAmax, Molecular Devices) y una curva estándar producida usando el software SOFT max PRO (Molecular Devices). Las concentraciones de muestras desconocidas se estimaron a partir de la curva.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).

- 15 Las muestras de proteína se prepararon mezclando con un volumen apropiado de 2 X SDS de solución reguladora de carga y se desnaturalizaron calentando durante 10 minutos a 70 °C. El gel SDS-PAGE se realizó usando el aparato de gel de doble placa Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories) como lo describe Laemmli (6). El gel de resolución consistió en Tris-HCl 0.275 M (pH 8.8), 0.1% (p/v) de SDS, 0.05% (p/v) de persulfato de amonio recién preparado, 1% (v/v) TEMED y entre 7.5-12% (p/v) acrilamida/bisacrilamida (29:1). La solución se completó hasta 5 mL en MilliQ H₂O y se dejó reposar durante al menos 30 minutos (RTemp) mientras se cubría con butanol saturado con agua. Antes de verter el gel de apilamiento, se vertió el butanol saturado de agua. El gel de apilamiento consistió en Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), 0.1% (p/v) de SDS, 0.05% (p/v) de persulfato de amonio recién preparado, 0.1% (v/v) de TEMED y 4% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida (29:1). La solución se preparó a 2.5 mL por gel en MilliQ H₂O, se vertió sobre el gel de resolución y se dejó fraguar con un peine de 10 pocillos (Bio-Rad Laboratories) durante al menos 30 minutos. La electroforesis se realizó durante aproximadamente 1 h o hasta que el colorante se hubo desprendido del fondo del gel (200 V, RTemp) en 1 X SDS de solución reguladora de ejecución.

Transferencia Western

- Después de la electroforesis en SDS-PAGE, las placas de gel se separaron cuidadosamente, el gel de apilamiento se cortó y se transfirió a la Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories). Un "sándwich de transferencia" se montó de la siguiente manera: una esponja porosa, dos hojas de papel secante (Whatmann), membrana de nitrocelulosa, el gel, dos piezas más de transferencia de papel secante y otra esponja porosa e insertada en el aparato de transferencia. Las esponjas, la membrana y el papel secante se humedecieron previamente en solución reguladora electroblot fría y se tomó precauciones para evitar que se formaran burbujas de aire, ya que esto daría como resultado una transferencia inconsistente de proteínas. Las proteínas se transfirieron a 100 V durante 1 h (voltaje constante) en una solución reguladora de transferencia enfriada con hielo a 4 °C con la membrana de nitrocelulosa (Hybond™-C, Amersham Biosciences) más cerca del lado aniónico, y una bolsa de hielo y un agitador magnético adicional.

Membranas de proteínas de sondeo

- Una vez transferida, la membrana se incubó en Blotto al 5% (p/v) en Tween 20 al 0.1% (v/v)/TBS a RTemp durante al menos 30 minutos con agitación orbital suave para bloquear los sitios de unión no específicos. El anticuerpo primario se diluyó en BSA al 5% (p/v) según lo recomendado por el fabricante (consulte la tabla 13 a continuación) hasta un volumen final de 2 mL. Se hizo una envoltura de plástico que contenía la membrana y el anticuerpo y se selló con calor, eliminando la mayor cantidad posible de burbujas de aire. Los sobres se giraron en un rotor hecho a medida durante la noche (aproximadamente 16 h) a 4 °C.

- 45 La membrana se retiró de la bolsa, se colocó en una bandeja de plástico con Tween 20 al 0.1% (v/v)/TBS y se lavó cuatro veces a temperatura ambiente con agitación orbital vigorosa durante 15 minutos por lavado. El anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se probó en la membrana diluyéndola 1/1,000 en Blotto al 5% (p/v) en Tween 20 al 0.1% (v/v)/TBS y colocándola en un sobre de plástico fresco que se giró a temperatura ambiente durante 2 h.

Inmunodetección de proteínas.

- 50 Con el fin de eliminar cualquier anticuerpo no unido o unido no específicamente, la membrana se lavó en 0.1% (v/v) de Tween 20/TBS a temperatura ambiente cuatro veces durante 15 minutos cada uno. El reactivo de quimioluminiscencia Plus Western Lighting™ (PerkinElmer Life Sciences) se usó para generar una señal detectable a partir de anticuerpos secundarios marcados con HRP. El reactivo se basa en la degradación oxidativa del luminol catalizado por HRP, lo que resulta en la emisión de luz, que es detectable a 420 nm y se puede capturar en la película. Volúmenes iguales de la botella 1 y la botella 2 se mezclaron justo antes de la detección. Se aplicó un volumen total de 2 mL por membrana y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se tuvo cuidado de

5 asegurar que toda la membrana estuviera igualmente expuesta. La membrana se retiró, se secó rápidamente en un papel secante, se insertó entre dos piezas de protectores de lámina de polipropileno en un casete de película (Hypercassette™, Amersham Biosciences) y se expuso a una pieza de película (SuperRX, Fujifilm). Se usó una exposición inicial de 2 min para juzgar el tiempo de detección óptimo. La película fue desarrollada en una estación de imagen de Kodak (Kodak).

Tabla 13: Los anticuerpos usados en este estudio fueron:

Anticuerpo	Huésped	Dilución usada	Fabricante
Anti-pan phospho PKC	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti-Phospho-ERK (Thr202/Tyr204)	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti-ERK	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti-Phospho-MEK 1/2 (Ser217/221)	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti-MEK1/2	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti -MM P9	Conejo	1:1,000	Cell Signalling
Anti-Conejo Ig HRP-Conjugado	Oveja	1:1,000	Cell Signalling

10 En el primer estudio con el compuesto 1, análisis de transferencia Western, una activación transitoria de ambas MEK1/2 y ERK1/2 después de 6 horas de tratamiento con ya sea 10 o 30 ng/mL del compuesto 1. y una posterior inhibición de la expresión de activación después de 24 horas de tratamiento. Se sabe que la activación de la rama MEK/ERK de la vía MAP quinasa influye en el fenotipo migratorio de muchos tipos celulares, incluidos los fibroblastos. No se detectaron diferencias en los niveles de MMP9.

Se encontraron patrones similares de fosforilación de phospho -ERK en transferencias Western en el segundo estudio con concentraciones de 30 ng/mL de los compuestos 1 y 42 en los NFF.

15 Ejemplo 11: Efecto del compuesto 1 sobre la expresión de genes implicados en la cicatrización de heridas

Los efectos del compuesto 1 en la expresión de genes asociados con la cicatrización de heridas se examinaron en dos situaciones (a) PBMC humanas y (b) estroma de ratón de xenoinjertos de tumores humanos.

Materiales y métodos

20 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante sedimentación con Ficoll-Paque de sangre heparinizada de un donante humano de 68 años de edad, y se cultivaron en RPMI-1640 FCS al 10%. Después del tratamiento con el compuesto 1 a 30 ng/mL, la monocapa se lavó una vez con solución salina regulada con fosfato (PBS) y las células se recogieron con raspadores estériles y se almacenaron como gránulos a -80°C.

25 El estroma de ratón en xenoinjertos de tumores humanos se obtuvo de ratones en los que la línea celular de melanoma humano Sk-Mel-28 se inyectó por vía subcutánea en 2 sitios en los flancos de cada ratón BALB/c Foxn1nu (2×10^6 células/sitio) y se permitió crecer hasta aproximadamente 7 mm de diámetro. Cada tumor se inyectó luego con 50 μ L de propilenglicol al 20% que contenía 30 μ g del compuesto 1 o con 50 μ L de propilenglicol al 20%. En diferentes momentos después de la inyección, se sacrificó un ratón y se recogieron los tumores, se retiró la cubierta de la piel y se almacenaron los tumores intactos a ~ 80 °C.

30 El ARN se extrajo de 30 mg de tumor congelado o 1×10^7 células usando el Kit QiagenRNeasyPlus Mini, según las instrucciones del fabricante, luego se cuantificó con un instrumento NanoDrop y se confirmó la integridad en geles de agarosa desnaturizantes que llevan un marcador de ADN de 1 kb y se tiñeron con bromuro de etidio.

Amplificación de ARN y marcación.

35 Se ajustaron aproximadamente 500 ng de ARN total no marcado a un volumen final de 11 μ L con agua libre de nucleasa. El ARN se incubó con 9 μ L de la mezcla maestra de transcriptasa inversa (1 μ L de Cebador T7 Oligo (dT), 2 μ L 10X de solución reguladora de primera cadena, 4 μ L de mezcla de dNTP, 1 μ L de inhibidor de RNasa y 1 μ L de ArrayScript) a 42 °C, durante 2 h. Esto fue seguido por la etapa de síntesis de ADNc de la segunda cadena que implicó una incubación adicional a 16 °C, durante 2 h con 80 μ L de la mezcla maestra de la segunda cadena (63 μ L de agua libre de nucleasas, 10 μ L 10X de solución reguladora de la segunda cadena, 4 μ L de mezcla de dNTP, 2 μ L de ADN polimerasa y 1 μ L de RNasa H). El ADNc se purificó filtrando a través de un cartucho de filtro de ADNc con 40 250 μ L de solución reguladora de unión de ADNc y lavando con 500 μ L de solución reguladora de lavado

- proporcionada en el kit. El ADNc purificado se eluyó con 20 μL de agua libre de nucleasas a 55 °C. Cada muestra de ADNc se incubó con 7.5 μL de la mezcla maestra de IVT (2.5 μL de T7 10X solución reguladora de reacción, 2.5 μL de mezcla de enzimas T7 y 2.5 μL de mezcla de biotina-NTP) a 37 °C, durante 16 horas. La reacción se detuvo con la adición de 75 μL de agua libre de nucleasas a cada muestra de ARNc. El ARN biotinilado y amplificado se purificó filtrando las muestras de ARNc a través de Cartuchos de filtro de ARNc con 350 μL de solución reguladora de unión de ARNc y 250 μL de etanol al 100% mezclados antes de cargarlos en los filtros. Los cartuchos de filtro de ARNc con ARN unido se lavaron luego con 650 μL de solución reguladora de lavado antes de eluir el ARNc purificado con 200 μL de agua libre de nucleasas a 55 °C.
- 5
- Hibridación *Illumina Expression BeadChip*. Las muestras de ARNc se calentaron a 65°C, durante 5 minutos y se recogieron mediante centrifugación por pulsos. Después de calentar a 65 grados durante 5 minutos, aproximadamente 750 ng de la muestra de ARNc se dividieron en alícuotas en tubos separados a los que se añadieron ~ 5 μL de agua libre de ARNasa y 10 μL de Hyb Mix. Aproximadamente 15 μL de la mezcla de ARNc preparada se cargaron en Illumina Expression BeadChips, las etapas posteriores de hibridación y lavado se llevaron a cabo según the Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay Guide suministrada por Illumina.
- 10
- La HT-12 v4 Expression BeadChips humana cubre más de 47,000 transcripciones y variantes de empalme conocidas en todo el transcriptoma humano. Las MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips cubren aproximadamente 25,600 transcripciones RefSeq (secuencia de referencia) bien anotadas, que comprenden más de 19,000 genes únicos.
- 15
- Análisis de datos. BeadChips fue leído por el sistema iScan y transferido a través de GenomeStudio a GeneSpring GX v12.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los valores de expresión se normalizaron usando la normalización cuantil con ajustes predeterminados. Las entidades se filtraron en función de la puntuación de detección calculada por GenomeStudio donde $p \leq 0,05$ se consideró significativo.
- 20
- Cambios en la expresión de genes relevantes para la cicatrización de heridas inducidos en PBMC humanas por el compuesto 1.
- 25
- Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas son ricas en linfocitos y precursores de macrófagos (monocitos) implicados en la producción de citoquinas y enzimas de remodelación de tejidos relevantes para el procedimiento de la cicatrización de heridas. La tabla 14 enumera los cambios en la expresión génica inducidos por 30 ng/mL del compuesto 1 que fueron > 2 veces más altos o > 2 veces más bajos que las PBMC no tratadas, y tenían un vínculo conocido con la cicatrización de heridas. La cicatrización de heridas es una secuencia compleja, multietapa en la que los procedimientos tales como la inflamación deben ser de expresión inhibida posteriormente. Por lo tanto, debe señalarse que los genes que se muestran en la tabla 14 ilustran el intervalo de moléculas relevantes reguladas por el compuesto 1 en una población linfocida mixta in vitro, sin especificar el orden de expresión específica del tejido in vivo.
- 30
- Los genes incluyen citoquinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) implicadas en la protección de infecciones, citocinas para moderar la respuesta inflamatoria (IL-10 e IL-24), factores de crecimiento. (GM-CSF, CSF1 y HBEGF), y una gama de quimiocinas y metalopeptidasas de matriz para la remodelación de tejidos (esta última facilitada por la regulación negativa de TIMP2). La inhibición de la expresión de THBS1, que suprime la formación de tejido de granulación, también es un factor positivo en la cicatrización de heridas. La regulación hacia arriba de KLF10 debería facilitar la angiogénesis y es indicativa de la inducción de TGF- β . Las transglutaminasas (TGM) estabilizan las proteínas al entrecruzarlas y tienen otros efectos beneficiosos en la cicatrización de heridas.
- 35
- 40

Tabla 14. Cambios en la expresión de genes relevantes para mejorar los resultados de la cicatrización de heridas que son inducidos en PBMC humanas por el compuesto 1

Gen	Nombre del gen (<i>Homo sapiens</i>)	Tiempo (h)	Doble cambio en la expresión	Dirección de regulación
IL1 α	Interleucina 1. alfa (IL1 α), ARNm.	24	14.6	Arriba
IL1 β	Interleucina 1. beta (IL1 β), ARNm.	24	15.4	Arriba
IL6	Interleucina 6 (Interferón 2, beta) (IL6), ARNm.	24	33.1	Arriba
IL10	Interleucina 10 (IL10), ARNm.	24	2.1	Arriba
IL24	Interleucina 24 (IL24), variante de transcripción 1, ARNm.	24	4.6	Arriba

ES 2 715 105 T3

GM-CSF	Factor estimulante de colonias GM (GM-CSF), ARNm	4	4.3	Arriba
		24	34.6	Arriba
		96	6	Arriba
CSF1	Factor estimulante de colonias, variante de transcripción 4, ARNm.	24	5.1	Arriba
HBEGF	Factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina (HBEGF), ARNm.	4	2.7	Arriba
		24	5.1	Arriba
CXCL1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL1), ARNm.	24	15.5	Arriba
CXCL2	Ligando 2 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL2), ARNm.	4	3.5	Arriba
		24	73.5	Arriba
CXCL5	Ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL5), ARNm.	24	8.1	Arriba
		96	15.1	Arriba
CXCL7	Ligando 7 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL7), ARNm.	24	17.5	Arriba
		96	37.4	Arriba
CXCL13	Ligando 13 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL13), ARNm.	24	2.2	Arriba
		96	23.5	Arriba
CCL1	Ligando 1 (motivo C-C) de quimiocina. (CCL1), ARNm.	24	39.8	Arriba
		96	42.6	Arriba
CCL3	Ligando 3 (motivo C-C) de quimiocina (CCL3). ARNm.	24	56.9	Arriba
CCL7	Ligando 7 (motivo C-C) de quimiocina (CCL7), ARNm.	4	9.4	Arriba
		24	54.5	Arriba
		96	4.8	Arriba
CCL3L1	Ligando 3 (motivo C-C) de quimiocina-tipo 1 (CCL3L1), ARNm.	4	5.3	Arriba
		24	72.3	Arriba
		96	4.2	Arriba
MMP1	Matriz de metalopeptidasa 1(MMP1), ARNm.	4	3.1	Arriba
		24	4.2	Arriba
MMP7	Matriz de metalopeptidasa 7 (MMP7), ARNm.	4	3.5	Arriba
		24	7.4	Arriba

		96	117.3	Arriba
MMP9	Matriz de metalopeptidasa 9 (MMP9), ARNm.	24	-229	Abajo
MMP10	Matriz de metalopeptidasa 10 (estromelisina 2) (MMP10), ARNm.	4	3.2	Arriba
		24	52	Arriba
MMP19	Matriz de metalopeptidasa 19, variante de la transcripción 1, ARNm. A.	4	11.6	Arriba
		24	2.6	Arriba
TIMP2	inhibidor de la metalopeptidasa TIMP 2 (TIMP2), ARNm.	24	-10.9	Abajo
THBS1	Trombospondina 1 (THBS1), ARNm.	4	47.8	Abajo
		24	-101.5	Abajo
KLF10	Factor tipo Kruppel 10 (KLF10), variante de transcripción 1, ARNm.	4	5.9	Arriba
		24	9.3	Arriba
TGM3	Transglutaminasas (TGM3), ARNm.	4	2.3	Arriba
		24	28.4	Arriba
TGM2	Transglutaminasa 2 (TGM2), variante de transcripción 1, ARNm.	24	12.2	Arriba
		96	4.4	Arriba
TGM5	Transglutaminasa 5 (TGM5), variante de transcripción 2. ARNm.	24	-3.3	Abajo

Cambios en la expresión de genes relevantes para la cicatrización de heridas inducidos en el estroma de ratón de xenoinjertos de tumores humanos por el compuesto 1

- 5 Una excelente cicatrización de los sitios tumorales en ratones y animales de compañía, evidenciada por la restauración del pelo y el color del pelo, así como una cicatrización mínima, es una característica notable del tratamiento con el compuesto 1 mediante inyección intratumoral (Ejemplos 16 y 17). Por lo tanto, los cambios en la expresión génica relevantes para la cicatrización de heridas se analizaron en el estroma derivado de ratón de xenoinjertos de tumores humanos en los primeros momentos después de la inyección, mientras el tumor estaba todavía intacto.
- 10 Los datos de expresión usando micromatrices específicos de genes de ratón se realizaron para 2-3 xenoinjertos SK-Mel-28 humanos individuales tratados mediante inyección intratumoral con 30 µg del compuesto 1, junto con 3 sitios de vehículo solo, los datos combinados. Solo se examinaron los genes de ratón para los que la expresión en el sitio tratado con el compuesto 1 fue > 2 veces más alta o > 2 veces más baja que en el sitio donde se inyectó el vehículo para determinar su relevancia para la cicatrización de heridas.
- 15 La tabla 15 enumera los genes seleccionados según los criterios anteriores y con enlaces conocidos para la cicatrización de heridas.

20 Un número de genes con resultados favorables conocidos para la cicatrización de heridas fueron regulados hacia arriba en al menos 2 veces por el compuesto 1. Estos eran genes implicados en la contracción muscular (ACTA1), crecimiento (EGR1), modulación de la inflamación (CXCL1), queratinas para la renovación de queratinocitos (krt5, 10, 14, 15, 17, 71. krt5), migración de queratinocitos (Col17a1), diferenciación epidérmica y comunicación celular (Irf1, Tgm2, Itga7).

Un gen relacionado con la cicatrización de heridas, Thrombospondin 2 (Thbs2), fue regulado hacia abajo. La regulación hacia abajo de este gen se asocia con un aumento de la densidad vascular y un aumento de la fibronectina en las primeras etapas de la cicatrización de heridas.

ES 2 715 105 T3

Tabla 15. Cambios en la expresión de genes relevantes para mejorar los resultados de la cicatrización de heridas que se inducen en el estroma de ratón de xenoinjertos de tumores humanos por el compuesto 1

Código del gen	Nombre del gen (<i>Musmusculus</i>)	Tiempo (h)	Doble cambio en la expresión	Dirección de regulación
Acta1	Actina, alfa 1, músculo esquelético (Acta1), ARNm.	0.5	9.3	Arriba
		4	30.3	Arriba
		8	8.5	Arriba
Egr1	Respuesta temprana de crecimiento 1 (Egr1), ARNm.	4	4.7	Arriba
		8	5.34	Arriba
CXCL1	Ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X-C) (Cxcl1), ARNm.	4	12.1	Arriba
krt14	Queratina 14 (Krt14), ARNm	1	9.4	Arriba
		2	5.6	Arriba
		4	9.7	Arriba
Krt10	Queratina 10 (Krt10), ARNm.	1	7	Arriba
		2	2.4	Arriba
		4	8.6	Arriba
		8	2.1	Abajo
Krt17	Queratina 17 (Krt17), ARNm.	1	2.9	Arriba
		4	10	Arriba
		8	2	Abajo
Krt15	Queratina 15 (Krt15), ARNm.	1	2.3	Arriba
Krt5	Queratina 5 (Krt5), ARNm.	1	2.8	Arriba
Krt71	Queratina 71 (Krt71), ARNm.	4	3.2	Arriba
Col17a1	Colágeno, tipo XVII, alfa 1 (Col17a1), ARNm.	1	2.7	Arriba
		2	2	Arriba
		4	3.2	Arriba
Krtdap	Asociación de diferenciación de queratinocitos. (Krtdap), ARNm.	1	7	Arriba
		4	3.8	Arriba
Lce1m	Envoltura cornificada tardía 1M (Lce1m), ARNm.	1	4.9	Arriba
Lce1b	Envoltura cornificada tardía 1B (Lce1b), ARNm.	1	4,8	Arriba
Lce1d	Envoltura cornificada tardía 1D (Lce1d), ARNm.	1	3.3	Arriba
LCe1a1	Envoltura cornificada tardía	1	2.7	Arriba

	1A1 (Lce1a1), ARNm.			
		4	2.8	Arriba
Lce1a2	Envoltura cornificada tardía 1A2 (Lce1a2), ARNm.	1	3	Arriba
Lor	Loricrina (Lor), ARNm.	1	11.6	Arriba
		2	2.8	Arriba
Tgm2	Transglutaminasa 2, polipéptido C (Tgm2), ARNm.	0.5	2.67	Arriba
		4	2	Abajo
Thbs2	Trombospondina 2 (Thbs2), ARNm.	0.5	3.98	Abajo
Itga7	Integrina alfa 7 (Itga7), ARNm.	1	2.1	Arriba

Ejemplo 12: Efecto de los compuestos sobre la producción de citoquinas.

5 Las citoquinas específicas desempeñan un papel crítico en los procedimientos de la cicatrización de heridas, y los agentes que modulan estas sustancias pueden ser útiles para tratar heridas y/o mejorar los resultados cosméticos de la cicatrización (por ejemplo, cicatrización reducida). Los efectos de los compuestos 1, 2, 5 y 42 sobre la regulación de cuatro citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α) que se sabe que son críticos en las etapas iniciales del procedimiento de la cicatrización de heridas se investigaron en células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMC).

10 Las PBMC se aislaron mediante sedimentación Ficoll-Paque de sangre heparinizada adquirida de tanto un donante humano hombre de 72 años (Donante 1) como de un hombre de 34 años (Donante 2). Todas las células se cultivaron en FCS al 10%, RPMI como se detalla previamente.

15 Se sembraron PBMC a una densidad de 1.5×10^5 células por pocillo en FCS al 10%, RPMI. La estimulación de estas células con los cuatro compuestos se realizó a cuatro concentraciones (0 ng/mL, 3 ng/mL, 30 ng/mL, 300 ng/mL) por duplicado durante 24 h en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5%. Se tomaron muestras de los medios de cada uno de los pozos requeridos y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

20 Se usaron ensayos de matriz de cuentas citométricas (CBA) para medir los resultados. Los ensayos de CBA proporcionan un método para capturar un analito soluble o un conjunto de analitos usando cuentas recubiertas con anticuerpos de tamaños conocidos y fluorescencia. Luego se realiza la detección usando otro anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente para formar un complejo de sándwich. Cada muestra de medio se analizó para determinar la presencia de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α solubles usando un kit de detección de citocinas inflamatorias humanas CBA BD (Becton Dickinson) según las instrucciones del fabricante. Los valores medios de intensidad de fluorescencia de cada muestra se compararon con una curva estándar para determinar las concentraciones de citoquinas (pg/mL).

Los resultados del ensayo de CBA para cada compuesto se muestran en la tabla 16.

25 Los cuatro compuestos aumentaron significativamente los niveles de las cuatro citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) que se detectaron en sobrenadantes analizados a partir de las PBMC tratadas, con tendencias consistentes entre las PBMC de los dos donantes. Los niveles más altos de citoquinas ocurrieron generalmente en las dos concentraciones más altas (30 y 300 ng/mL) de los compuestos.

Tabla 16. Producción de citocinas a partir de PBMC después de la incubación durante 24 horas a concentraciones de 0, 3, 30 y 300 ng de compuesto/ml para los compuestos 1, 2, 5 y 42. Los niveles de citocinas se expresan en pg/ml \pm desviación estándar y son Presentado para cada uno de los dos donantes.

Citoquina	[Compuesto 1] ng/mL				
	0	3	30	300	300
TNF α	3.7 \pm 1.1	24.3 \pm 1.4	324.4 \pm 0.0	355.0 \pm 4.3	592.2 \pm 24.7
IL-1 β	0.8 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2	11.9 \pm 0.8	39 \pm 0.2	121.6 \pm 5.6
IL-6	4.5 \pm 0.8	9.7 \pm 1.2	34.2 \pm 1.1	89.5 \pm 13.8	38.8 \pm 9.0
IL-8	425 \pm 41	1720 \pm 157	16920 \pm 1198	16419 \pm 40	32021 \pm 1156
	Donante 1				
	Donante 2				
Citoquina	[Compuesto 2] ng/mL				
	0	3	30	300	300
TNF α	3.8 \pm 0.7	31.15 \pm 6.9	314.07 \pm 37.9	330.0 \pm 28.7	618.1 \pm 63.7
IL-1 β	0.9 \pm 0.1	1.4 \pm 1.2	12.1 \pm 0.4	37.7 \pm 4.6	123.9 \pm 1.0
IL-6	3.8 \pm 0.3	9.1 \pm 0.2	38 \pm 3.9	84.1 \pm 3.6	41.4 \pm 2.3
IL-8	430 \pm 66	2099 \pm 585	18229 \pm 2592	16634 \pm b25	34117 \pm 630
	Donante 1				
	Donante 2				
Citoquina	[Compuesto 5] ng/mL				
	0	3	30	300	300
TNF α	4.3 \pm 0.6	85.8 \pm 8.4	289.9 \pm 18.6	306.4 \pm 9.0	620.9 \pm 66.5
IL-1 β	0.6 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	15.7 \pm 0.9	44 \pm 1.6	114.9 \pm 2.4
IL-6	3.7 \pm 1.0	12.4 \pm 0.2	33.6 \pm 0.6	77.5 \pm 9.1	51.9 \pm 1.3
IL-8	360 \pm 22	4924 \pm 366	1790 \pm 55	17275 \pm 40	33876 \pm 2532
	Donante 1				
	Donante 2				
Citoquina	[Compuesto 42] ng/mL				
	0	3	30	300	300
TNF α	5.0 \pm 1.0	45.8 \pm 55.2	271.9 \pm 22.4	267.5 \pm 11.9	631.6 \pm 16.9
IL-1 β	2.7 \pm 0.4	2.6 \pm 0.6	16.8 \pm 1.2	41.3 \pm 1.2	137.8 \pm 10.9
IL-6	5.1 \pm 2.5	8.1 \pm 6.4	32.1 \pm 0.7	71 \pm 4.6	69.3 \pm 1.8

(Continuación)

Citoquina	[Compuesto 42] ng/mL									
	0	3	30	300	0	3	30	300	3000	30000
IL-8	403±80	3013±377	16389±884	17425±680	1224±887	7885±2516	28176±37	32925±552	Donante 2	
	Donante 1					Donante 2				

Ejemplos de actividad in vivo

Ejemplo 13: Respuesta inflamatoria aguda en piel de ratón.

5 Una respuesta inflamatoria aguda es una fase inicial importante del procedimiento de la cicatrización de heridas. Las células proinflamatorias, principalmente los neutrófilos y los macrófagos, migran al sitio, lo protegen de la infección y liberan citoquinas y quimiocinas implicadas en el inicio y la regulación de la reparación tisular posterior.

Se inyectaron subcutáneamente ratones macho desnudos en cada flanco con 50 μ L de soluciones de 100 μ g/mL de los compuestos 1, 2, 5 y 42, respectivamente, en 20% de propilenglicol. Cada sitio se enrojeció en 4 h y en 24 h el área afectada cubrió aproximadamente 1 cm de diámetro de la piel. La induración se formó durante los siguientes 6 días y, a los 14 días, el sitio se había cicatrizado completamente con una cicatriz mínima.

10 La respuesta inflamatoria aguda iniciada por los compuestos en la piel, seguida de una resolución rápida, es consistente con los efectos directos observados de los compuestos en células proinflamatorias (Ejemplos 7 y 9) y en la expresión de genes y perfiles de citoquinas en PBMC (Ejemplos 11 y 12). Dicha respuesta proinflamatoria tan robusta pero transitoria a menudo se ha asociado con buenos resultados de la cicatrización de heridas in vivo.

Ejemplo 14: Formulación de gel del compuesto 1

15 Se disolvieron ya sea 30 mg o 50 mg del compuesto 1 (> 97% de pureza por HPLC) en 5 mL de alcohol isopropílico al 99.5% (Biotech Pharmaceuticals) y se dejó reposar durante la noche. Se preparó una solución de 0.6% de Carbomer 940 (Snowdrift Farms) como agente gelificante en 5 mL de agua estéril. El concentrado del compuesto 1 y la solución de Carbomer 940 al 0.6% se añadieron luego en una jeringa de 20 mL y se mezclaron completamente. Luego se añadieron 20 μ L de trietanolamina al 100% (Sigma-Aldrich) y se mezclaron rápidamente. El gel del compuesto 1 resultante se dispensó luego en jeringas de insulina individuales de 1 mL para producir dosis de 3 mg del compuesto 1/mL y 5 mg del compuesto 1/mL.

Ejemplo 15: Formulación inyectable del compuesto 1

25 Se disolvieron 20 mg del compuesto 1 (> 97% de pureza por HPLC) en 8 mL de 1,2 propanodiol (Sigma-Aldrich) en un vial de centelleo de vidrio de 20 mL de capacidad y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Luego se añadieron 12 mL de ya sea solución reguladora de acetato 30 mM a pH 4.2 o solución salina (cloruro de sodio para inyección BP 0.9%-AstraZeneca) a la solución y se mezclaron completamente. A continuación, la solución se esterilizó por filtración y se dispensó en una dosis de 1 mL de concentración de 1 mg/mL del compuesto 1.

30 Ejemplo 16: tratamiento clínico veterinario de heridas sin cicatrización y heridas que no responden a los estándares actuales de atención

El compuesto 1 se ha usado para tratar de curar heridas difíciles en 10 animales domésticos (esto es, de propiedad privada y cuidados) con el objetivo de mejorar la cicatrización de heridas por segunda intención.

35 Siete perros (*Canis lupus familiaris*) y un canguro de árbol (*Dendrolagus lumholtzii*) con heridas crónicas sin cicatrización y que no responden a los estándares veterinarios actuales de atención para estas indicaciones fueron tratados con el compuesto 1 por veterinarios independientes. Un segundo canguro de árbol y un zorro volador de anteojos (*Pteropus conspicillatus*) con heridas no apropiadas para el tratamiento inicial con los estándares de atención actuales también se trataron con el compuesto 1. Todos los casos se trataron como heridas abiertas sin el uso de apósitos u otro vendaje a lo largo del tratamiento con el compuesto 1 y el período posterior de resolución de la herida. A menos que se indique en estudios de casos individuales, no se usaron medicamentos concomitantes a lo largo de los tratamientos con el compuesto 1.

Las notas de casos y tratamientos para cada uno de estos pacientes se resumen a continuación. Tener en cuenta que la presentación de retorno de estos animales a los veterinarios tratantes fue a menudo irregular y los resultados de la cicatrización de heridas pueden haber ocurrido mucho antes de las visitas de evaluación de retorno.

45 El tratamiento con el compuesto 1 resultó en una resolución eficaz de la herida con una cicatriz mínima en los ocho casos finalizados. La resolución de la herida progresó bien en los dos estudios de caso en curso que se trataron más recientemente (estudios de caso 8 y 10).

Estudios de casos 1 a 8: Heridas sin cicatrización.

Estudio de caso 1: Herida facial necrosante profunda sin cicatrización, perro de montaña Bernese de 3 años

Notas de caso:

50 • Gran herida facial de forma ovalada de 7 cm de largo x 4 cm de ancho x hasta 2 cm de profundidad en el lado izquierdo del hocico del paciente.

- La herida tenía costra con parches de descarga de postulante necrótico.
- Histopatología: lesión necrosante profunda posiblemente asociada con una picadura de araña y caracterizada por la presencia de bacterias coccoideas e inflamación supurativa.
- 5 • La herida no había respondido a los protocolos estándar de tratamiento de heridas con antibióticos (cefalexina, amoxiclav, gentamicina) y antiinflamatorios (macrolona) durante un período de 3 meses.
- La herida fue aumentando gradualmente de tamaño, causando el cierre del ojo y afectando significativamente la visión y el comportamiento general del paciente. Los ganglios linfáticos mandibulares del paciente se habían agrandado.
- La opción estándar de cuidado restante era para la cirugía facial agresiva y la reconstrucción.
- 10 • El tratamiento inicial implicó 5 aplicaciones (un total de 5.3 mL) de gel del compuesto 1 (3 mg/mL) durante un período inicial de 14 días (el compuesto 1 se aplicó los días 1, 2, 6, 10 y 14)
- Después de la resolución parcial de la herida a los 28 días, el paciente fue tratado con una dosis única de 1 mL del compuesto 1 (0.5 mg/mL) inyectado justo debajo de la superficie en múltiples ubicaciones a lo largo de la zona de la herida.
- 15 • A los 35 días después de la inyección con el compuesto 1, la herida se había llenado con tejido de granulación diferenciador saludable y no había evidencia de infección.
- Los medicamentos concomitantes a lo largo del tratamiento con el compuesto 1 fueron temgesic y lignocaína en el momento del primer tratamiento con formulación de gel, temgesic y tramadol en el momento y el día inmediatamente posteriores al tratamiento de inyección (esto es, los días 28 y 29) y luego una cubierta de apoyo de dosis bajas de corticosteroides orales (macrolona) diariamente desde el día 42.
- 20 • A los 76 días después del tratamiento final, la herida se había cicatrizado y se había llenado con cicatrices mínimas de tejido normal y también un nuevo crecimiento del pelo que cubría más del 95% de la zona de la herida original.

Estudio de caso 2: Estallido, quiste abdominal infectado, Bóxer de 13 años

Notas de caso:

- 25 • Paciente frágil con osteoartritis severa, considerado un alto riesgo anestésico para cualquier intervención quirúrgica.
- El paciente tenía un quiste infectado persistente en la parte posterior proximal a la cola que no había respondido al drenaje e inyección regulares del quiste con antibióticos (gentamicina, enrofloxacin, norocilina) durante un período de 5 meses.
- 30 • El paciente se presentó con el estallido del quiste y temperatura elevada. El quiste se limpió para eliminar la piel muerta y luego se enjuagó con solución salina y clorhexideno. El paciente fue tratado con antibióticos (clindamicina y norocilina) y antiinflamatorios (metacam).
- Después de 5 días, la herida asociada con el estallido del quiste no mostró signos de resolución y se vio rodeada por una inflamación local significativa. El área expuesta de la herida (aproximadamente 5 cm de largo x 3 cm de ancho por hasta 2.5 cm de profundidad) luego se enjuagó con solución salina y se aplicaron 0.5 mL de gel del compuesto 1 (3 mg/mL) uniformemente sobre la zona de la herida.
- 35 • A los 5 días después del tratamiento con el gel del compuesto 1, la herida se había contraído significativamente a menos del 30% de la zona de la herida original (dimensiones aproximadas de 3 cm de largo x 1.5 cm de ancho x 1 cm de profundidad) y estaba compuesta de tejido de granulación sano.
- 40 • A los 30 días, la herida se había resuelto con un tejido normal y más del 70% de nuevo crecimiento de pelo sobre la zona de la herida original.
- Los medicamentos concomitantes para este paciente a lo largo del tratamiento con el compuesto 1 fueron un antiinflamatorio no esteroide inyectable (metacam) en el momento del tratamiento.

Estudio de caso 3: Heridas punzantes infectadas sin cicatrización, Chow de 11 años

45 Notas de caso:

- El paciente presentó dos heridas grandes por mordedura (cada una de aproximadamente 4 cm de largo x 1.5 cm de ancho x 2 cm de profundidad) en el cuarto trasero de una pelea de perros.
- Las heridas se lavaron y el paciente fue tratado con antibióticos (tabletas de amoxiclav y norocilina inyectable).

- Después de 8 días las heridas fueron persistentes, no se cerraron ni se infectaron.
- Las heridas se limpiaron y se aplicaron a cada herida uniformemente 0.4 mL de gel del compuesto 1 (3 mg/mL).
- A los 15 días después del tratamiento con el compuesto 1, las heridas se habían contraído significativamente a menos del 40% de su tamaño original, formaban escaras y no había evidencia de infección.

- 5
- A los 46 días después del tratamiento con el compuesto 1, las heridas se resolvieron por completo con el tejido normal, sin cicatrices y el nuevo crecimiento del pelo completo sobre la zona de la herida.
 - No hubo medicamentos concomitantes con este paciente durante el tratamiento con el compuesto 1.

Estudio de caso 4: heridas infectadas sin cicatrización en la cara y metatarsianos de un canino (Bóxer de 11 años)

Notas de caso:

- 10
- El paciente presentó dos áreas de heridas infectadas e inflamadas sin cicatrización, una en el lado izquierdo de la cara y otra en los metatarsianos posteriores izquierdos que no respondieron a un curso prolongado de antibióticos de 8 semanas (cefalexina, doxiciclina) y corticosteroides (macrolona).
 - Se aplicó un tratamiento único de una formulación en gel de 5 mg/mL del compuesto 1 para la herida en la cara (0.4 mL) y para la herida de la pierna (0.6 mL).
- 15
- La herida facial respondió rápidamente al tratamiento con el compuesto 1 con una pequeña escara presente a los 7 días y el cierre completo de la herida, incluido un importante nuevo crecimiento del pelo evidente a los 14 días después del tratamiento. La zona de la herida se curó completamente 63 días después del tratamiento.
 - La herida en la pierna también respondió rápidamente con la escara presente en las áreas localizadas. A los 14 días, la escara se había desprendido en gran parte y se observó tejido de granulación subyacente sano. La zona de la herida se había cerrado completamente y tenía más del 95% de cobertura capilar a los 63 días después del tratamiento.
- 20
- Los medicamentos concomitantes para este paciente a lo largo del tratamiento con el compuesto 1 fueron un curso diario continuo de corticosteroides de baja dosis (macrolona) para el tratamiento del síndrome de dermatitis atópica canina.

- 25
- Estudio de caso 5: Herida infectada sin cicatrización en la oreja de un canino (Bull Arab de 4 años)

Notas de caso:

- El paciente se presentó con una laceración sin cicatrización debido a un accidente de caza en el que había estado presente en la oreja izquierdo durante más de 6 semanas.
- Se aplicaron tres tratamientos, cada uno de 0.1 mL de 5 mg/mL de formulación de gel del compuesto 1, en el área afectada a intervalos de 8 días. No se usaron medicamentos concomitantes a lo largo del tratamiento del paciente con el compuesto 1.
- A los 41 días después del primer tratamiento con el compuesto 1, la herida se había cerrado por completo. Una evaluación adicional a los 152 días después del tratamiento inicial mostró una resolución completa de la herida, cicatrización mínima con más del 80% de cobertura capilar sobre el sitio original de la herida.

- 35
- Estudio de caso 6: Herida infectada que no cicatriza en la oreja de un canino (Bóxer de 11 años)

Notas de caso:

- El paciente presentaba una llaga sin cicatrización (infectada e inflamada) en la parte superior de la oreja izquierda y fue tratado durante 10 semanas con protocolos de atención estándar que incluían la aplicación regular de (i) una formulación dermatológica tópica (neotópica) que combina agentes antibacterianos (sulfato de neomicina), agentes antiinflamatorios (hidrocortisona) y antipruríticos (lignocaína), y (b) una suspensión comercial (Auracol) con componentes antiinflamatorios (prednisolona), antifúngicos (nitrato de miconazol) y antibacterianos (polimixina B sulfato). Antes de estos tratamientos, el paciente estaba en un curso continuo de corticosteroides orales de baja dosis (macrolona) para el tratamiento del síndrome de dermatitis atópica canina crónica.
- Después de 10 semanas de protocolo de atención estándar, no hubo signos de resolución de la herida.
- Se aplicó un tratamiento único de 3 mL de una formulación de 5 mg/mL de gel del compuesto 1 en el área afectada y en los 15 minutos posteriores a la aplicación del compuesto 1 se produjo un enrojecimiento discernible del área tratada.

- A partir de los 4 días después del tratamiento con el compuesto 1, el paciente comenzó los corticosteroides (macrolona) diarios de dosis bajas para el tratamiento de la dermatitis atópica grave. Este tratamiento continuó a lo largo del curso completo de cicatrización y resolución de heridas.
- 5
- A los 17 días después del tratamiento con el compuesto 1, no había signos de infección o inflamación y se había desarrollado un lecho de herida bien granulado en el sitio tratado.
 - A los 83 días después del tratamiento, hubo un cierre completo de la herida y se produjo un nuevo crecimiento del pelo en más del 90% de la zona de la herida original.
 - En los 139 días después del tratamiento no fue posible discernir el sitio de la herida original, no hubo evidencia de cicatrización y/o diferencias en la pigmentación de la piel o el espesor aparente en y alrededor del área tratada.
- 10
- Estudio de caso 7: Heridas infectadas sin cicatrización en las orejas y en la cara de un canino (Jack Russell terrier de 8 años)
- Notas de caso:
- El paciente se presentó con dos heridas sin cicatrización en la punta y la base de la oreja derecha y una herida sin cicatrización en el hocico que el propietario había observado durante más de 4 semanas. El posible origen fue de una araña infectada u otras picaduras de insectos.
- 15
- Se aplicaron dos tratamientos, cada uno de 0.1 mL de 5 mg/mL de formulación de gel del compuesto 1, a ambas áreas afectadas en las orejas en un intervalo de 5 días. Se aplicó un tratamiento único de 0.1 mL de 5 mg/mL de formulación de gel del compuesto 1 a la lesión facial.
- 20
- A los 13 días después del primer tratamiento con el compuesto 1, ambas heridas en la oreja se habían contraído significativamente y se habían formado escaras. A los 29 días la herida se había cerrado completamente y con una cobertura completa de crecimiento de pelo.
 - A los 16 días después del tratamiento, la herida en el hocico se había resuelto por completo.
 - La medicación concomitante para este paciente consistió en un tratamiento de 5 días de los antibióticos orales amoxicilina y ácido clavulánico (amoxiclav) en el momento del tratamiento inicial.
- 25
- Estudio de caso 8: Herida ósea infectada en la pierna de un canguro de árbol (Marsupialia, *Dendrolagus lumholtzi*)
- Notas de caso:
- El paciente se presentó como un canguro de árbol salvaje lesionado en un ataque de perro que resultó en luxación lacrosacra y osteomielitis. El paciente fue tratado durante 1 mes con antibióticos inyectables ceftazidima (Fortum) y trimetoprim sulfametoxazol (TMS). Mientras que la inflamación se había reducido, el hisopo bacteriano reveló que bacterias gramnegativas y *Serratiamarcesens* todavía estaban presentes. La extremidad afectada no soportaba peso.
- 30
- El tratamiento con ceftazidima durante 2 semanas adicionales no produjo mejoría en la condición y el veterinario recomendó un pronóstico desfavorable para la eliminación de la infección del hueso y una posible interrupción mecánica significativa de la estructura ósea que comprendería la marcha futura. Un nuevo hisopo bacteriano tomado de la descarga de senos en el corvejón y la almohadilla en ese momento reveló especies mixtas de anaerobios y especies grampositivas de *Actinomyces*, por lo que se administró una única infusión IV lenta de yoduro de sodio (Sodide).
- 35
- Debido a la falta de respuesta a otros tratamientos y al mal pronóstico general con estos estándares de atención, el tratamiento de rescate que implica 4 aplicaciones de 5 mg/mL de formulación de gel del compuesto 1 se inició 2
- 40
- Para la primera aplicación, se aplicaron 0.1 mL del gel del compuesto 1 a cada una de las tres lesiones en el corvejón derecho (una sobre la articulación del tobillo, una debajo de la almohadilla del pie y una pequeña lesión en la base de la cicatrización) y se inició una infusión IV lenta de yoduro de sodio. A los 10 minutos de la aplicación del gel del compuesto 1, se produjo una descarga purulenta del área tratada.
- 45
- En la presentación 8 días después del primer tratamiento, una descarga purulenta se rezumaba de 2 de las 3 heridas en la pierna. La otra herida (la lesión más pequeña en la cicatrización) se había contraído y comenzó la cicatrización. Se usó un tratamiento adicional de 0.15 mL de 5 mg/mL de formulación de gel del compuesto 1 para tratar cada una de las dos heridas abiertas (una sobre la articulación del tobillo, la otra en la base de la almohadilla del pie). También se administró una infusión intravenosa lenta de yoduro de sodio.

- Otros 15 días más tarde (23 días después del tratamiento inicial), se extrajeron varios mL de pus purulento espeso de la herida en la almohadilla del pie antes de forzar 0.15 mL de una formulación de gel del compuesto 1 de 5 mg/mL en el seno de la herida drenada.
- 5 • Una semana después hubo una mejoría significativa en la infección. Se extrajo un pequeño trozo de hueso del orificio de la almohadilla del pie. No había pus evidente, pero hubo una secreción serosa. Se aplicaron 0.2 mL más del gel del compuesto 1 a cada una de las lesiones, una sobre el tobillo y la otra debajo del pie. También se administró una infusión IV lenta de yoduro de sodio. La extremidad ahora soporta peso, pero la cicatrización y la almohadilla del pie siguen siendo muy firmes con la inflamación y la marcha del animal es muy desigual y prefiere fuertemente a la pata trasera no dañada.
- 10 • Otros 15 días después, la herida sobre la articulación del tobillo se había cerrado completamente y el pelo volvía a crecer. La herida en la cicatrización de la almohadilla del pie se había contraído a menos del 50% de su tamaño en la visita anterior y la piel y el tejido circundantes son suaves, flexibles y normales. La extremidad ahora soporta el peso por completo y no hay irregularidades en la marcha del animal.
- 15 • Aparte del yoduro de sodio inyectable, no se administraron otros medicamentos concomitantes al paciente durante el tratamiento con el compuesto 1.

Estudios de caso de heridas difíciles que no se adaptan a los estándares actuales de atención

Estudio de caso 9: vasculitis infecciosa en la oreja de un canguro de árbol (Marsupialia, *Dendrolagus lumholtzi*)

Notas de caso:

- El paciente se presenta como un animal herido joven encontrado en la naturaleza.
- 20 • El paciente estaba muy débil, deshidratado y anémico. La muestra de orina reveló infección sanguínea y bacteriana, probablemente septicemia. Se colocó al paciente en terapia de fluidos y se le medicó con citrato de maropitant (cerenia) contra las náuseas y dos formulaciones de antibióticos inyectables, Tribacterial (trimetoprima, sulfadiazina) y ceftazidima (fortum).
- 25 • Después de 9 días de goteo de líquido, la condición del paciente mejoró, pero hubo un traumatismo en la oreja derecho y probablemente vasculitis infecciosa y gangrena. La cirugía no fue posible debido al riesgo anestésico significativo debido a la condición altamente comprometida del paciente. En su lugar, se inició el tratamiento con una formulación de gel del compuesto 1.
- 30 • Se aplicaron tres tratamientos de 0.1 mL de 5 mg/mL de potencia de gel del compuesto 1 en el área afectada a intervalos de 7 días. La única medicación concurrente durante este tiempo fueron los antibióticos de cefalosporina ceftazidima (fortum).
- 7 días después del primer tratamiento del gel del compuesto 1, una escara firmemente adherida cubrió la superficie de la herida. Esta escara se levantó a los 10 días para revelar un lecho de granulación rosa bien desarrollado.
- En el momento de la tercera y última aplicación de tratamiento a los 14 días después del tratamiento inicial, la zona de la herida se había reducido aproximadamente en un 50% y a los 25 días había tejido sano en toda la zona de la herida.
- 35 • A los 67 días, la lesión se había resuelto totalmente y había una cobertura completa del pelo en la oreja.

Estudio de caso 10: herida severa lacerada en la cabeza de un zorro volador de anteojos (Mammalia, *Pteropus conspicillatus*)

Notas de caso:

- 40 • El paciente se presentó como un zorro volador de 4 meses con una herida profunda en la cabeza de un zorro volador de 4 meses causada por un enredo en un alambre de púas.
- En la opinión del veterinario tratante que tenía una amplia experiencia en lesiones de la vida silvestre (incluidos los zorros voladores), los tratamientos normales estándar de atención podrían ser altamente problemáticos para hacer que el ojo derecho pierda su forma y no pueda cerrarse, ya sea debido a un exceso de la formación de tejido cicatricial asociada con la cirugía o la extensión de la granulación requerida si se aplicaran apósitos para curar heridas
- 45 • El compuesto 1 se aplicó a la herida en 3 aplicaciones de 0.1 mL de una formulación de gel de 5 mg/mL durante un período de 28 días (días 1, 10 y 28). No se usaron otros medicamentos o intervenciones concomitantes a lo largo del tratamiento.

• A los 14 días después del tratamiento inicial, hubo un importante relleno y remodelación del tejido y, a los 28 días, el ojo pudo cerrarse por completo. A los 38 días, una escara cubrió toda la zona de la herida y esta comenzó a desprenderse a los 49 días para revelar un buen lecho de granulación.

5 • A los 55 días del tratamiento inicial, había un buen relleno de tejido en toda la zona de la herida original y el ojo derecho estaba volviendo a su posición original. Un lecho de granulación muy saludable estaba presente.

Ejemplo 17: Resolución y resultado estético de las heridas generadas después de la necrosis y desprendimiento de tumores espontáneos en animales de compañía tratados con el compuesto 1

10 Los datos clínicos veterinarios sobre la velocidad de resolución de las heridas que se formaron después de la necrosis y desprendimiento de tumores espontáneos que se habían tratado mediante inyección intratumoral del compuesto 1 (30% de formulación de 1,2 propanodiol a una concentración de 0.5 o 1.0 mg/mL) en veinticuatro animales de compañía se resumen en la tabla 17.

Tener en cuenta que todas las heridas se trataron como heridas abiertas y no se usaron vendajes, apósitos, lociones o medicamentos concomitantes en ninguno de estos casos.

15 Tabla 17: Tamaño de la herida y velocidad de resolución (tiempo hasta el cierre) en animales de compañía después del desprendimiento de tumores espontáneos que se habían tratado con una formulación inyectable del compuesto 1.

Canino				
Clase de tamaño de la herida	Número de casos	Área promedio de la herida (cm ²)	Profundidad promedio de la herida (mm)	Promedio de días desde el desprendimiento del tumor hasta el cierre de la herida
0.25 a 9 cm ²	7	3.6 ± 2.7	6.7 ± 2.8	24 ± 16
9 a 50 cm ²	5	30.4 ± 16.1	14.0 ± 5.5	40 ± 15
>50 a 130 cm ²	3	95.3 ± 35.0	13.3 ± 5.8	62 ± 18
Equino				
Clase de tamaño de la herida	Número de casos	Área promedio de la herida (cm ²)	Profundidad promedio de la herida (mm)	Promedio de días desde el desprendimiento del tumor hasta el cierre de la herida
0.25 a 9 cm ²	4	2.9 ± 1.4	7.5 ± 2.9	20 ± 12
9 a 50 cm ²	2	19.5 ± 14.5	10.0 ± 0	53 ± 22
Felino				
Clase de tamaño de la herida	Número de casos	Área promedio de la herida (cm ²)	Profundidad promedio de la herida (mm)	Promedio de días desde el desprendimiento del tumor hasta el cierre de la herida
0.25 a 12 cm ²	3	4.8 ± 6.3	5.0 ± 4.3	17 ± 10

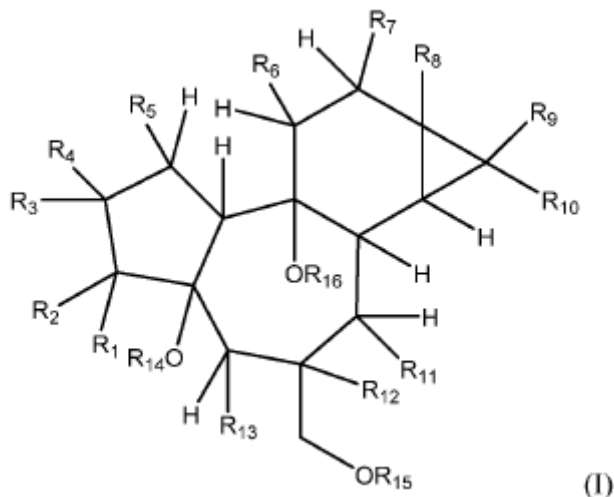
20 Los datos de estos casos también muestran buenos resultados cosméticos para la resolución de heridas con cicatrización mínima y nuevo crecimiento normal del pelo en la mayoría de los pacientes (Tabla 18). En los pocos casos en que se produjeron cicatrices, estas coincidían generalmente con áreas de piel normalmente delgada (por ejemplo, en las extremidades de caballos y perros).

25 Tabla 18: Características del tejido, la piel y el pelo de los sitios de heridas cicatrizadas en animales de compañía después de desprenderse de tumores espontáneos que se habían tratado con una formulación inyectable del compuesto 1.

Características del tejido, la piel y el pelo del sitio de la herida después de la resolución				
Características del sitio de la herida y categoría de resultado		No. de perros	No. de caballos	No. de gatos
Déficit de tejido en el sitio de la herida ¹	Nulo o mínimo	15	6	3
	Menor	0	0	0
	Sustancial	0	0	0
Cicatrización y engrosamiento de la piel ²	Nulo o mínimo	13	4	3
	Menor	1	1	0
	Sustancial	1	1	0
Nuevo crecimiento del pelo en la zona de la herida ³	Completo	12	5	2
	Parcial	1	1	1
	Escaso	2	0	0
Cambio en el color del pelo	No	15	3	2
	Sí	0	3	1
Características del tejido, la piel y el pelo del sitio de la herida después de la resolución				
Característica del sitio de la herida y categoría de resultados		No. de perros	No. de caballos	No. de gatos
Pigmentación de la piel	Normal	11	3	3
	Irregular	1	1	0
	Hipopigmentacion	3	1	0
	Hiperpigmentacion	0	1	0
¹ Categorías de déficit de tejidos Nulo o mínimo: <5% de déficit tisular en la zona de la herida original Menor: 5 a 10% de déficit tisular en la zona de la herida original Sustancial:> 10% déficit de tejido en la zona de la herida original ² Categorías de cicatrices y engrosamiento de la piel: Nulo o mínimo: cicatrización no obvia visualmente o al tacto Menor: cicatriz localizada que cubre <10% de la zona de la herida original Sustancial: cicatriz que cubre > 10% de la zona de la herida original ³ Nuevo crecimiento del pelo en las categorías de la zona de la herida Completo: el pelo cubre > 95% de la zona de la herida original Parcial: el pelo cubre > 50% de la zona de la herida original Escasa: el pelo cubre <50% de la zona de la herida original				

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la promoción de la cicatrización de heridas; en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):



5

en la que

R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);

R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);

10 R₆ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

R₇ es -OH o -OR₁₈;

R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;

R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇

15 R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;

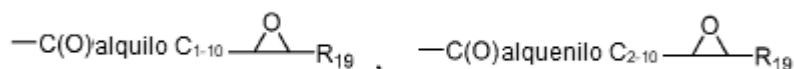
R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;

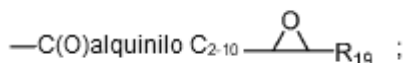
R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alqueno C₂₋₆, -alquino C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆;

20 R₁₈ es alquilo C₁₋₂₀, -alqueno C₂₋₂₀, -alquino C₂₋₂₀, -C(O)alquilo C₁₋₂₀, -C(O)alqueno C₂₋₂₀, -C(O)alquino C₂₋₂₀, -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-cicloalquilo; -C(O)alqueno C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-arilo, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquino C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquino C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C₁₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquino C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉,

25



o



y

R₁₉ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₁₀-, -alqueno C₂₋₁₀-, -alquinilo C₂₋₁₀-, cicloalquilo o arilo;

5 en la que cada grupo alquilo, alqueno, alquinilo, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

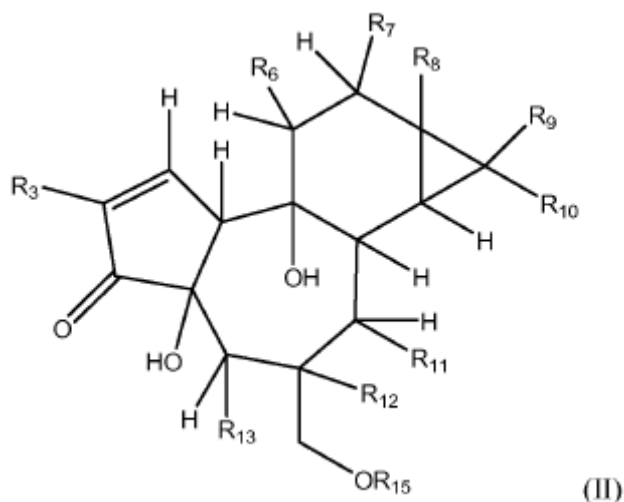
2. Un compuesto epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 1, en el que la promoción de la cicatrización de heridas comprende el aumento de la velocidad de cicatrización de heridas, la reducción de cicatrices en el tejido de la herida o ambos aumentando la velocidad de cicatrización de heridas y la reducción de cicatrices en el tejido de la herida.

10 3. Un compuesto epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la promoción de la cicatrización de heridas comprende el mejoramiento del resultado cosmético de la herida cicatrizada.

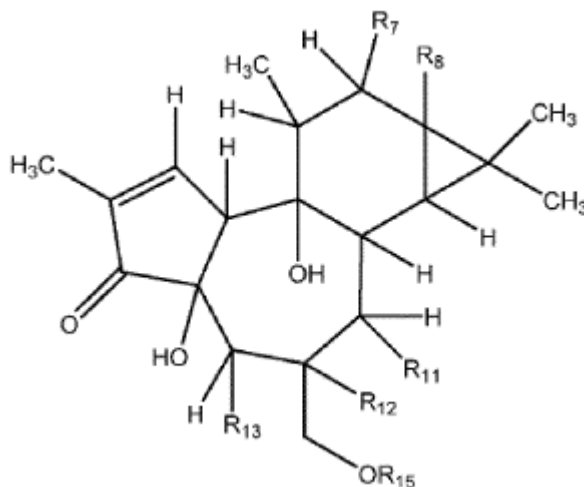
4. Un compuesto epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la herida es una herida crónica, una herida aguda o una herida existente.

15 5. Un compuesto epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto epoxi-tigliano está en forma de un extracto vegetal, especialmente en el que el extracto vegetal se puede obtener de una planta que es una especie de *Fontainea* o una especie de *Hylandia*.

20 6. Un compuesto epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto epoxi-tigliano de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II):



en la que R₃, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₅ son como se definen para la fórmula (I), especialmente en la que el compuesto de fórmula (I) o (II) es un compuesto de fórmula (III):

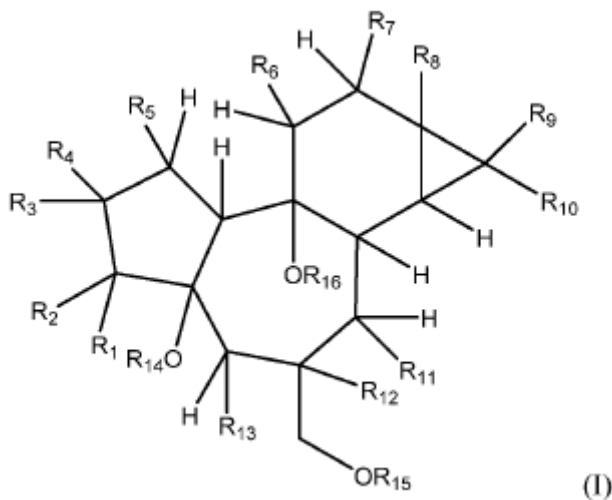


en la que R₇, R₈, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₅ son como se definen para la fórmula (I).

7. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R₁ es hidrógeno y R₂ es OH o -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆, o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo.
8. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R₃ es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃.
9. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆ o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido.
10. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R₆ es hidrógeno o -alquilo C₁₋₃.
11. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R₇ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₁₅, -OC(O)alqueno C₂₋₁₅, -OC(O)alquino C₂₋₁₅, -OC(O)arilo en la que el grupo arilo está opcionalmente sustituido, -OC(O)alquilo C₁₋₁₅-arilo, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)H, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)H, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-C(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-CH(O-alquilo C₁₋₃)(O-alquilo C₁₋₃), -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-S-alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₁₀-S-alquilo C₁₋₆, -OC(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)O-alquilo C₁₋₆ o -OC(O)alquilo C₂₋₁₀C(O)O-alquilo C₁₋₆.
12. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que R₈ es -OC(O)alquilo C₁₋₁₅, -OC(O)alqueno C₂₋₁₅, -OC(O)alquino C₂₋₁₅ o -C(O)arilo donde el grupo arilo está opcionalmente sustituido.
13. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que R₉ y R₁₀ son independientemente -alquilo C₁₋₃.
14. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que R₁₁ y R₁₂ forman un epóxido y R₁₃ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆ o en la que R₁₂ y R₁₃ forman un epóxido y R₁₁ es -OH, -OC(O)alquilo C₁₋₆, -OC(O)alqueno C₂₋₆ o -OC(O)alquino C₂₋₆.
15. Un compuesto epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que R₁₅ es hidrógeno, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alqueno C₂₋₆ o -C(O)alquino C₂₋₆.
16. Un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tiglicano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la prevención de una cicatrización excesiva, especialmente en la que la cicatrización excesiva es una cicatriz queloide o hipertrófica; en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tiglicano se selecciona de:
- 12-tigloil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 21);
- 12-(3-butenoil)-13-nonanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 22);
- 12-benzoil-13-(2-metilbutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 23);

- 12,13-dibutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 27)
 12-benzoil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 28);
 12,13-di-nonoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 41);
 12,13-di-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 42);
 5 12,13-di-pentanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 43);
 12,13-di-tigloil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 44)
 5,20-di-acetil-12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 45);
 12,13-di-(2*E*,4*E*)-hex-2,4-enoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 46);
 12-hexanoil-13-[2-(*N*-metilantraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 47)
 10 12-acetil-13-[2-(*N*-metilantraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 48);
 12,13-di-heptanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 49);
 12-miristoil-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 50);
 12-miristoil-13(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 51);
 12-(2-metilbutanoil)-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 52); y
 15 12-hidroxi-13-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 53);
 12, 13-di-(3-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 60)
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

17. Un compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en un
 20 método de tratamiento, en el que el método de tratamiento comprende la reducción de cicatrices causadas por una
 herida de cicatrización al reducir los cambios en la pigmentación de la piel y/o mejorando el nuevo crecimiento del
 pelo; en el que el compuesto 5,6- o 6,7-epoxi-tigliano es un compuesto de fórmula (I):



en la que

- R₁ es hidrógeno y R₂ es -OR₁₇; o R₁ y R₂ forman juntos un grupo carbonilo (=O);
 25 R₃ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;
 R₄ y R₅ son independientemente hidrógeno o -OR₁₇; o R₄ y R₅ forman juntos un doble enlace o un epóxido (-O-);
 R₆ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;
 R₇ es -OH o -OR₁₈;

R₈ es -OH o -OR₁₈; siempre que R₇ y R₈ no sean ambos OH;

R₉ y R₁₀ independientemente se seleccionan entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆;

R₁₁ y R₁₂ o R₁₂ y R₁₃ forman juntos un epóxido y el grupo restante de R₁₁ y R₁₃ es hidrógeno, -OH o -OR₁₇

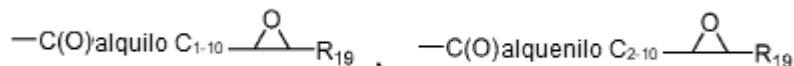
R₁₄ es hidrógeno o -R₁₇;

5 R₁₅ es hidrógeno o -R₁₇;

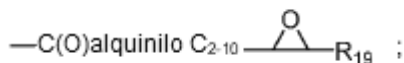
R₁₆ es hidrógeno o -R₁₇;

R₁₇ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₆, -alquenilo C₂₋₆, -alquinilo C₂₋₆, -C(O)alquilo C₁₋₆, -C(O)alquenilo C₂₋₆ o -C(O)alquinilo C₂₋₆;

10 R₁₈ es alquilo C₁₋₂₀, -alquenilo C₂₋₂₀, -alquinilo C₂₋₂₀, -C(O)alquilo C₁₋₂₀, -C(O)alquenilo C₂₋₂₀, -C(O)alquinilo C₂₋₂₀, -C(O)cicloalquilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-cicloalquilo; -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-cicloalquilo, -C(O)arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-arilo, -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-arilo, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-C(O)R₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-CH(OR₁₉)(OR₁₉), -C(O)alquilo C₁₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-SR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-C(O)OR₁₉, -C(O)alquilo C₁₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquenilo C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉, -C(O)alquinilo C₂₋₁₀-C(O)SR₁₉,



o



y

20 R₁₉ es hidrógeno, -alquilo C₁₋₁₀, -alquenilo C₂₋₁₀, -alquinilo C₂₋₁₀, cicloalquilo o arilo;

en la que cada grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo o arilo está opcionalmente sustituido; o un isómero geométrico o estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 5);

25 12-acetil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 6);

12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 7);

12-butanoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 8);

12-[(2E,4E)-(6,6-dimetoxihexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 9);

30 12-[(2E,4E)-6-oxohexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 10);

12-[(2E,4E)-6,7-dihidroxidodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 11);

35 12-[(2E)-4,5-dihidroxi-deca-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 12);

12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 13);

12-[(2E)-3-metilprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 14);

12-(2-metilprop-2-enoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 15);

- 12-[(2E,4E)-hexa-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 16);
- 12-[(2E,4E)-8-oxododeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 17);
- 5 12-[(2Z,4E)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 18);
- 13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 19);
- 12-[(2E)-but-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 20);
- 10 12-[(2Z,4E)-deca-2,4-dienoil]-13-(2-metilpropanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 25);
- 12-[(2E,4E)-6,7-(anti)-epoxi-dodeca-2,4-dienoil]-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 26);
- 12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 29);
- 13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 30);
- 15 12-acetil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 31);
- 12,13-di-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 32);
- 12-propanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 33);
- 12-hexanoil-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 34);
- 12-tigloil-13-(2-metilpropanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 35);
- 20 12-[(2E)-3-metiltioprop-2-enoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 36);
- 12-[[2-(metilsulfanil)carbonil]-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 39); y
- 25 12-[(2-metoxicarbonil)-acetoil]-13-(2-metilbutanoil)-5,6-epoxi-4,7,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 40);
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
19. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en;
- 12-tigloil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 21);
- 12-(3-butenoil)-13-nonanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 22);
- 30 12-benzoil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 23);
- 12,13-dibutanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 27)
- 12-benzoil-13-butanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 28);
- 12,13-di-nonoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 41);
- 12,13-di-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 42);
- 35 12,13-di-pentanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 43);
- 12,13-di-tigloil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 44)
- 5,20-di-acetil-12-tigloil-13-(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 45);
- 12,13-di-(2E,4E)-hex-2,4-enoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 46);
- 12-hexanoil-13-[2-(N-metiltraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 47)
- 40 12-acetil-13-[2-(N-metiltraniloil)]-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 48);

12,13-di-heptanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 49);

12-miristoil-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 50);

12-miristoil-13(2-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 51);

12-(2-metilbutanoil)-13-acetil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 52);

5 12-hidroxi-13-hexanoil-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 53); y

12,13-di-(3-metilbutanoil)-6,7-epoxi-4,5,9,12,13,20-hexahidroxi-1-tigliaen-3-ona (Compuesto 60);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 18 o la reivindicación 19 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

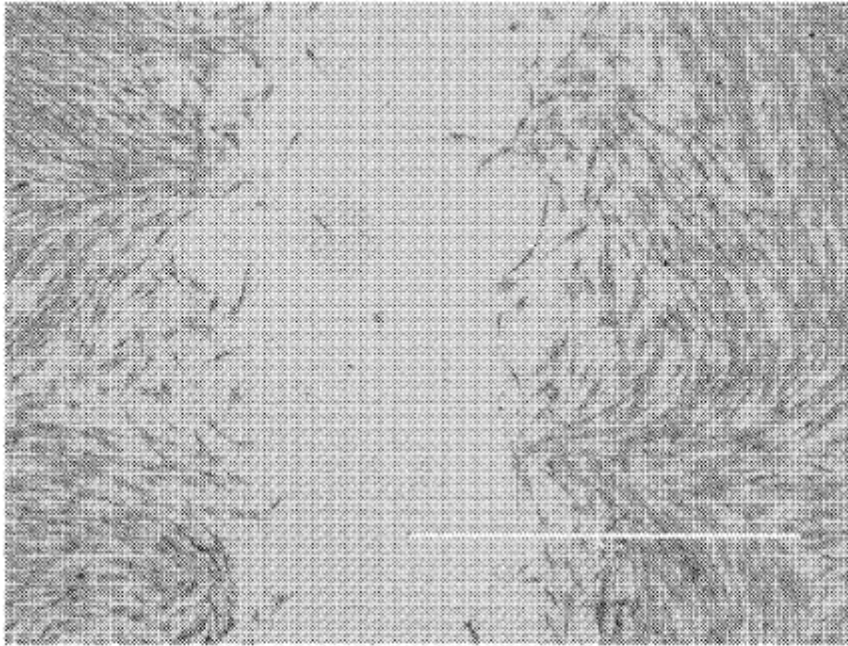


Figura 1

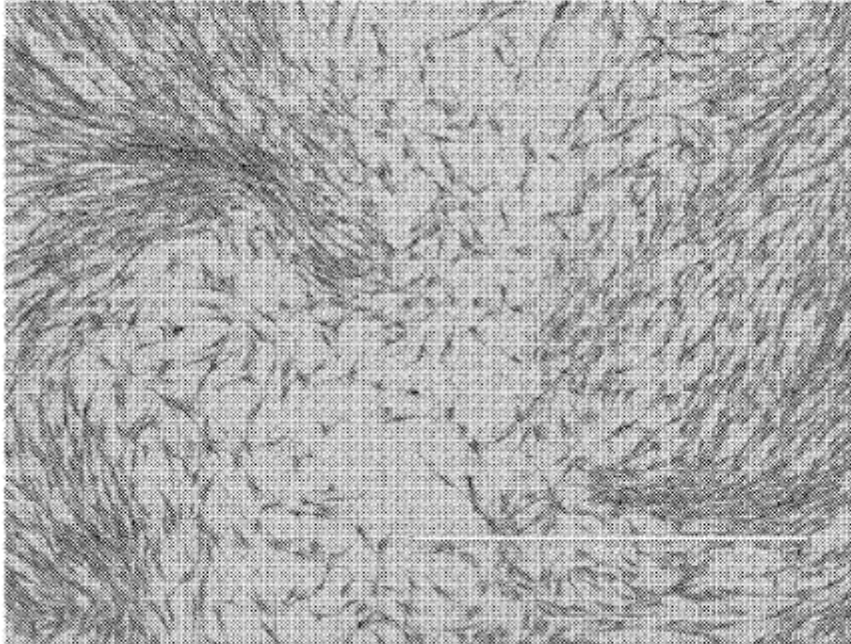


Figura 2

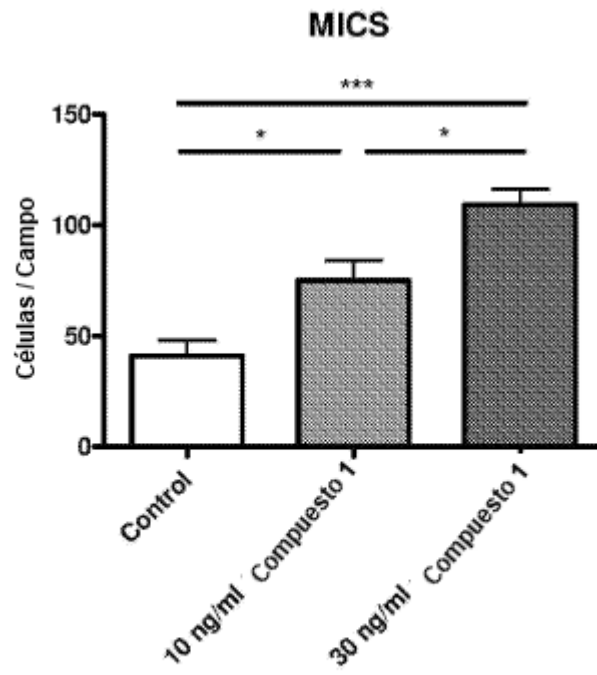


Figura 3

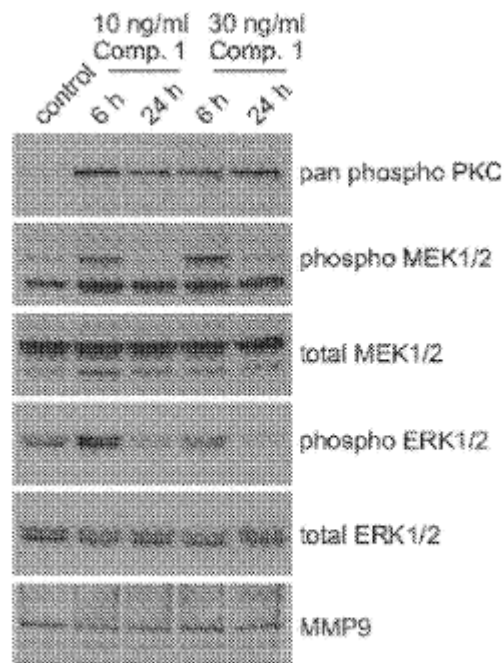


Figura 4

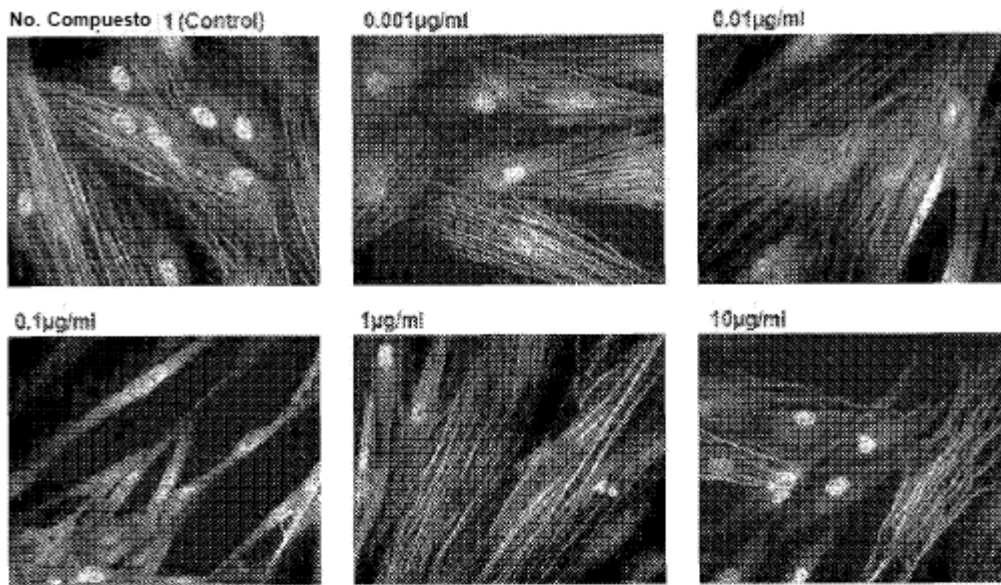


Figura 5

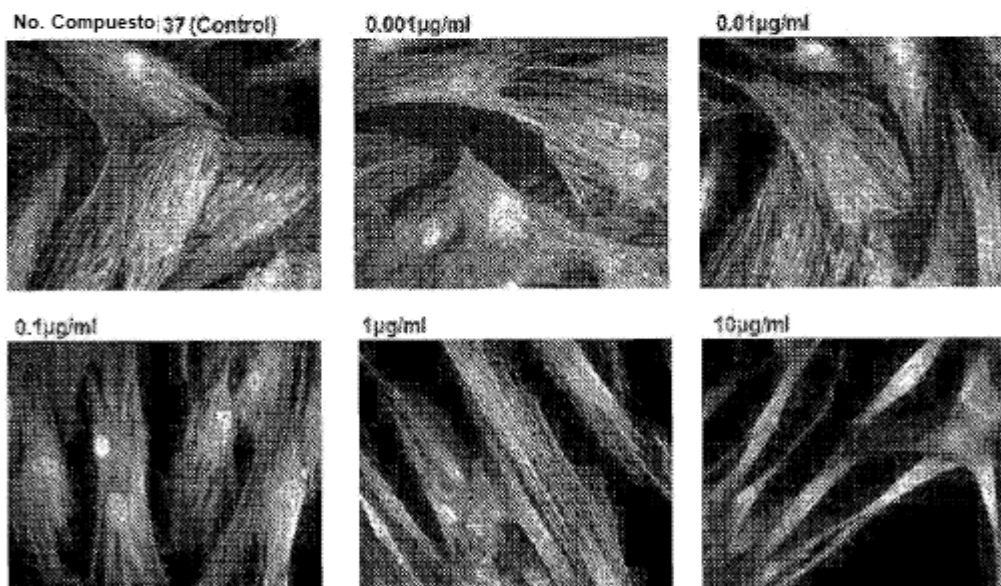


Figura 6