

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 599**

51 Int. Cl.:

C07C 51/347 (2006.01)
C07C 51/47 (2006.01)
C07C 59/52 (2006.01)
C07C 59/90 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/IB2014/059791**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141169**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14764257 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2970090**

54 Título: **Nuevos compuestos naturales antineurodegenerativos aislados a partir de *Alpinia oxyphyllae* fructus y síntesis total de los mismos**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MACAU (100.0%)
Avenida da Universidade
Taipa, Macau, CN**

72 Inventor/es:

**LEE, MING YUEN;
ZHANG, ZAIJUN y
LI, GUOHUI**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 736 599 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

Nuevos compuestos naturales antineurodegenerativos aislados a partir de *Alpiniae oxyphyllae fructus* y síntesis total de los mismos

CAMPO DE INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a compuestos nuevos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En particular, la presente invención se refiere a compuestos aislados y sintetizados, métodos de aislamiento o preparado de los compuestos, y compuestos para usar en un método de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

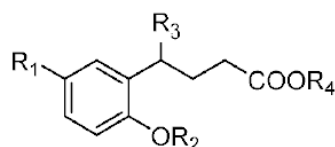
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El concepto de enfermedad neurodegenerativa se refiere a un rango de condiciones que afectan principalmente a las neuronas del cerebro humano. La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común con manifestaciones fisiológicas que incluyen temblores, bradiquinesia, reflejos posturales anormales, rigidez y aquinesia. Esto se debe principalmente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas (DA) en la sustancia negra. Las terapias actuales para la EP proporcionan principalmente una mejora sintomática reemplazando los neurotransmisores o controlando su metabolismo para restaurar su desequilibrio. Dado que estas terapias no alteran el proceso de enfermedad subyacente, por lo general tienen poco o ningún impacto en la progresión de la enfermedad. Además, Ho-Sang Moon, et al., (Structural requirements for the neuroprotective effects of aspirin analogues against N-methyl-D-aspartate and zinc ion neurotoxicity, 2002, Journal of Pharmacy and Pharmacology JPP, p935-944) discute los efectos neuroprotectores de derivados del ácido acetilsalicílico.

RESUMEN DE INVENCION

[0003] Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, métodos de preparación de los compuestos, sus composiciones y compuestos para usar en un método.

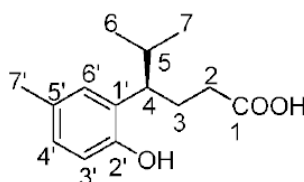
[0004] Por consiguiente, la presente invención, en un aspecto, proporciona un compuesto de fórmula I:



Fórmula I

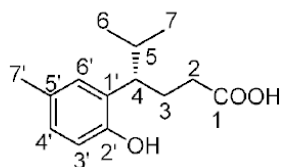
[0005] En una forma de realización ejemplar, para el compuesto de fórmula I, R₁ y R₃ son independientemente alquilo (C1-C3) no sustituido o sustituido; y R₂ y R₄ son H.

[0006] En otra forma de realización ejemplar, el compuesto de fórmula I es un (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico aislado y purificado). El compuesto de (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) se representa con la fórmula siguiente (compuesto 1).

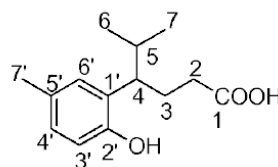


Compuesto 1

[0007] En otra forma de realización ejemplar, el compuesto de fórmula I es (ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) o (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico). Los compuestos (ácido(S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) (compuesto 4) y (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) (compuesto 5) se representan como las fórmulas siguientes, respectivamente.



Compuesto 4



Compuesto 5

[0008] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el compuesto de fórmula I y una sal o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

[0009] Otro aspecto de la presente invención, se proporciona el compuesto de fórmula I para usar en un método para la protección contra el daño neuronal.

[0010] Otro aspecto de la presente invención proporciona el compuesto de fórmula I para usar en un método para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

10

[0011] En una forma de realización ejemplar, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.

[0012] Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para usar en un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, o de protección contra el daño neuronal o la pérdida de células neuronales, que comprende la etapa de administrar el compuesto de fórmula I a un sujeto que lo necesite.

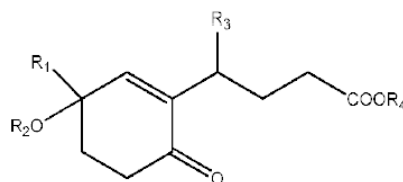
15

[0013] Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para usar en un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente humano que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I y crisina, donde el compuesto muestra un efecto sinérgico con la crisina para lograr un efecto neuroprotector.

20

[0014] En la presente también se describe, aunque no forma parte de la presente invención, un compuesto de fórmula II:

25



Fórmula II

[0015] Donde R_1 y R_3 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, carboxilo, alquiloxi, hidroxilo, amino, nitro, alquiltio, acilo, ciano, acilamino, halo y éster; y R_2 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo no sustituido o sustituido, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquioxo, acilo, acilamino y halo.

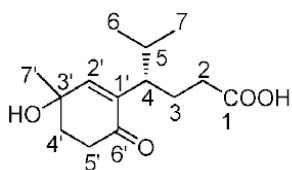
30

[0016] En una forma de realización ejemplar, para el compuesto de fórmula II, R_1 y R_3 son independientemente alquilo (C1-C3) no sustituido o sustituido; y R_2 y R_4 son H.

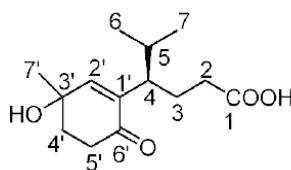
35

[0017] En otra forma de realización ejemplar, el compuesto de fórmula II es un (ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) aislado y purificado o (ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico). Los compuestos (ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) (compuesto 2) y (ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) (compuesto 3) se representan con las fórmulas siguientes, respectivamente.

40



Compuesto 2



Compuesto 3

45

[0018] En la presente también se describe, aunque no forma parte de la presente invención, una composición que comprende el compuesto de fórmula II y una sal o un vehículo farmacéuticamente aceptables.

[0019] En la presente también se describe, aunque no forma parte de la presente invención, el uso del compuesto de fórmula II para la protección contra el daño neuronal.

5 [0020] En la presente también se describe, aunque no forma parte de la presente invención, el uso del compuesto de fórmula II para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

[0021] En una forma de realización ejemplar, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.

10 [0022] En la presente también se describe, aunque no forma parte de la presente invención, un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson, o de protección contra el daño neuronal o la pérdida de células neuronales, que comprende la etapa de administración del compuesto de fórmula II a un sujeto que lo necesite.

15 [0023] Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto aislado y purificado a partir de *A. oxyphyllae fructus*, que incluye las etapas de:

a) extraer muestras de *A. oxyphyllae fructus* con solución acuosa de alcohol bajo reflujo caliente a baja presión y eliminar el solvente para obtener un extracto crudo;

b) reconstituir el extracto crudo en la etapa (a) con etanol para obtener una solución de extracto de etanol;

20 c) absorber la solución de extracto de etanol en gel de sílice y eliminar el etanol para obtener extracto de gel de sílice;

d) extraer el extracto de gel de sílice con solventes orgánicos sucesivamente bajo reflujo caliente a presión normal para obtener partes bioactivas;

25 e) fraccionar las partes bioactivas y eluir con una mezcla de solvente con polaridad ascendente para obtener una primera fracción bioactiva

f) purificar la primera fracción bioactiva de la etapa (e) para obtener el compuesto;

donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico), (ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) y (ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico).

30 En una forma de realización ejemplar, la etapa (f) comprende además

g) fraccionar la primera fracción bioactiva de la etapa (e) y eluir con una mezcla de solventes con polaridad ascendente para obtener una segunda porción bioactiva

h) purificar la segunda porción bioactiva con una elución isocrática para obtener el compuesto de (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico).

35 [0024] En una forma de realización ejemplar, la etapa (f) comprende además la purificación de la primera fracción bioactiva de la etapa (e) mediante cromatografía líquida de alta resolución preparatoria con elución isocrática para obtener el compuesto (ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) y el compuesto (ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico).

40

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025]

45 La figura 1 muestra los efectos neuroprotectores de los compuestos 1-5 en el daño en las CGN primarias inducido por MPP⁺. * p < 0,05 comparado con el grupo tratado únicamente con MPP⁺.

50 Las figuras 2A y 2B muestran los efectos del compuesto 1 en el daño en las células PC12 inducido por 6-OHDA. ## p < 0,01 contra el grupo de control; **p < 0,01 contra el grupo tratado con el vehículo.

Las figuras 3A-3G muestran los efectos del compuesto 1 en la protección del pez cebra frente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por la MPTP. ## p < 0,01 contra el grupo de control; *p < 0,05 contra grupo tratado con el vehículo; **p < 0,01 contra el grupo tratado con el vehículo.

55 Las figuras 4A y 4B muestran que el compuesto 1 invirtió el decrecimiento de la distancia total recorrida inducido por la MPTP en el pez cebra. ## p < 0,01 contra el grupo de control (sin tratamiento con MPTP); *p < 0,05 grupo contra el grupo tratado con MPTP.

60 La figura 5 muestra los efectos neuroprotectores sinérgicos de compuesto 1 y la crisina en el daño en las CGN primarias inducido por el MPP⁺. * p < 0,05 comparado con grupo tratado únicamente con MPP⁺; #p < 0,05 comparado con el grupo tratado con 3 μM de crisina más MPP⁺; \$ p < 0,05 comparado con el grupo tratado con 6 μM de crisina más MPP⁺.

65 La figura 6 muestra el flujo de trabajo de los tratamientos con fármacos y pruebas conductuales.

Las figuras 7A-7D muestran que el compuesto **1** mejoró el deterioro en el movimiento de los ratones a los que se les había inyectado MPTP. (A) Prueba de barra vertical; (B) duración de la prueba de la huella; (C) prueba Rotarod; (D) longitud de zancada de la prueba de la huella. Los resultados se presentaron como una media \pm S.E.M. (n = 8) de tres pruebas repetidas. #p < 0,05 y ###p < 0,001 comparado con el grupo de control (Ctrl); *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001 comparado con el grupo tratado con el vehículo (Veh). Rasa, rasagilina.

Las figuras 8A-8C muestran que el compuesto **1** tuvo un efecto protector contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas TH-positivas en los ratones a los que se había inyectado MPTP. (A) Inmunotinción de TH de las secciones mesencefálicas representativas de rostral a caudal. (B) El gráfico mostró recuentos de células TH-positivas \pm S.E.M. (n = 8) para las 8 secciones adyacentes coincidentes. (C) Análisis estadístico de la media de los datos de las secciones para diferentes grupos de tratamiento. Los resultados se presentaron como una media \pm S.E.M. (n = 8). #p < 0,05 comparado con el grupo de control (Ctrl); *p < 0,05 comparado con el grupo de tratamiento con el vehículo (Veh). Rasa, rasagilina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

[0026] Tal y como se utiliza en aquí y en las reivindicaciones, "que comprende" significa que incluye los elementos siguientes pero no excluye otros.

[0027] Los ejemplos siguientes se proporcionan mediante ilustración de la presente invención pero deberían considerarse como limitativos del alcance de la invención. Las variaciones razonables, tales como las que podrían ser entendidas por los expertos en la materia, se pueden llevar a cabo sin apartarse del alcance de las reivindicaciones anexas.

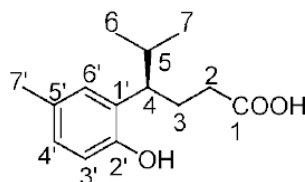
Ejemplo 1 Propiedades fisicoquímicas de los compuestos 1-5

1. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 1

(ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico)

Fórmula:

[0028]



Compuesto **1**

Descripción física: polvo blanco

Rotación específica: $[\alpha]_D^{26,2} = -11,3$ (c 3,0, MeOH), $[\alpha]_D^{25,0} = -19,4$ (c 0,72, CH₂Cl₂).

UV (metanol) λ máx.: 222 nm, 282 nm

espectro RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 2,18; 2,11 (2H; m; H-2 α ; 2(β)); 1,80; 2,17 (2H, m, H-3 α , 3 β); 2,67 (1H, m, H-4); 1,85 (1H, m, H-5); 1,01 (3H; d; $J = 6,58$ Hz; H-6); 0,74 (3H; d; $J = 6,65$ Hz; H-7); 6,66 (1H; d; $J = 8,52$ Hz; H-3'); 6,85 (1H; d; $J = 8,52$ Hz; H-4'); 6,85 (1H, s, H-6'); 2,27 (3H, s, H-7')

espectro RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃; $\delta_{TMS} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 178,2 (C-1); 31,7 (C-2); 27,6 (C-3); 44,1 (C-4); 32,7 (C-5); 20,8 (C-6); 21,1 (C-7); 130,1 (C-1'); 151,9 (C-2'); 115,4 (C-3'); 127,4 (C-4'); 129,5 (C-5'); 128,2 (C-6'); 20,6 (C-7')

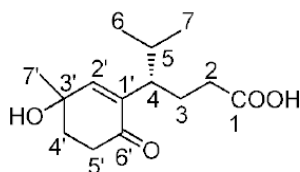
Espectro de masa (HR-ESI-MS): m/z 235,1369 [M-H]⁻ (calculado para C₁₄H₁₉O₃; 235,1339)

2. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 2

(ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico)

Fórmula:

[0029]



Compuesto 2

Descripción física: aceite amarillo

Rotación específica: $[\alpha]_D^{26,2} = -22,5$ (c 3,0; MeOH)

UV (metanol) λ máx.: 238 nm

espectro RMN ^1H (600 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 2,18; 2,16 (2H, m, H-2); 1,97; 1,74 (2H, m, H-3 α , 3 β); 2,25 (1H, m, H-4); 1,79 (1H, m, H-5); 0,76 (3H; d; $J = 6,68$ Hz; H-6); 0,89 (3H; d; $J = 6,65$ Hz; H-7); 6,40 (1H, s, H-2'); 2,65; 2,64 (2H, m, H-4' α , 4' β); 2,09 (2H, m, H-5'); 1,45 (3H, s, H-7')

espectro RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 178,3 (C-1); 45,5 (C-2); 25,6 (C-3); 45,3 (C-4); 31,2 (C-5); 20,4 (C-6); 21,0 (C-7); 139,0 (C-1'); 150,6 (C-2'); 69,0 (C-3'); 35,4 (C-4'); 37,1 (C-5'); 198,6 (C-6'); 27,6 (C-7')

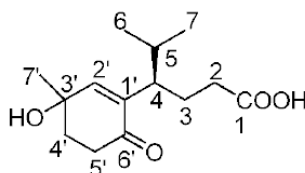
Espectro de masa (HR-ESI-MS): m/z 253,1468 [M-H]⁻ (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_4$; 253,1445)

3. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 3

(ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico)

Fórmula:

[0030]



Compuesto 3

Descripción física: aceite amarillo

Rotación específica: $[\alpha]_D^{26,2} = -31,5$ (c 3,0; MeOH)

UV (metanol) λ máx.: 238 nm

espectro RMN ^1H (600 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 2,16 (2H, m, H-2); 1,95; 1,65 (2H, m, H-3 α , 3 β); 2,53 (1H, m, H-4); 1,79 (1H, m, H-5); 0,77 (3H; d; $J = 6,68$ Hz; H-6); 0,86 (3H; d; $J = 6,65$ Hz; H-7); 6,44 (1H, s, H-2'); 2,66; 2,44 (2H, m, H-4' α , 4' β); 2,10 (2H, m, H-5'); 1,46 (3H, s, H-7')

espectro RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm): δ (ppm) 178,2 (C-1); 32,1 (C-2); 25,7 (C-3); 42,1 (C-4); 31,9 (C-5); 20,4 (C-6); 20,4 (C-7); 139,1 (C-1'); 149,6 (C-2'); 69,1 (C-3'); 37,0 (C-4'); 35,2 (C-5'); 198,7 (C-6'); 27,5 (C-7')

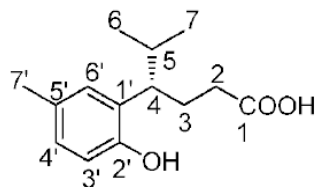
Espectro de masa (HR-ESI-MS): m/z 253,1480 [M-H]⁻ (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_4$; 253,1445)

4. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 4

(ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico)

Fórmula:

[0031]



5

Compuesto 4

Descripción física: polvo blanco10 **Rotación específica:** $[\alpha]_D^{25,0} = +20,0$ (c; 0,72; CH₂Cl₂)

espectro RMN ¹H (600 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm): δ (ppm) 2,20; 2,13 (2H; m; H-2α; 2(β)); 1,81; 2,18 (2H, m, H-3α, 3β); 2,67 (1H, m, H-4); 1,86 (1H, m, H-5); 1,02 (3H; d; J = 6,5 Hz; H-6); 0,74 (3H; d; J = 6,5 Hz; H-7); 6,65 (1H; d; J = 8,5 Hz; H-3'); 6,84 (2H; d; J = 8,5 Hz; H-4'); 6,84 (1H, s, H-6'); 2,24 (3H, s, H-7')

15

espectro RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm): δ (ppm) 180,2 (C-1); 32,2 (C-2); 27,6 (C-3); 44,3 (C-4); 32,9 (C-5); 20,9 (C-6); 21,3 (C-7); 130,1 (C-1'); 151,8 (C-2'); 115,6 (C-3'); 127,4 (C-4'); 129,4 (C-5'); 128,6 (C-6'); 20,8 (C-7')

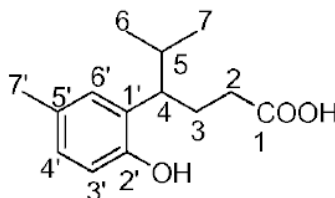
20 **Espectro de masa (HR-ESI-MS):** m/z 235,1358 [M-H]⁻ (calculado para C₁₄H₁₉O₃; 235,1339)**5. Propiedades fisicoquímicas del compuesto 5**

(ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico)

25

Fórmula:

[0032]



30

Compuesto 5

Descripción física: polvo blanco35 **espectro RMN ¹H (600 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm):** δ (ppm) 2,20; 2,13 (2H; m; H-2α; 2(β)); 1,82; 2,18 (2H, m, H-3α, 3β); 2,66 (1H, m, H-4); 1,87 (1H, m, H-5); 1,02 (3H, d, J = 6,5 Hz; H-6); 0,74 (3H; d; J = 6,5 Hz; H-7); 6,65 (1H; d; J = 8,5 Hz; H-3'); 6,85 (1H; d; J = 8,5 Hz; H-4'); 6,85 (1H, s, H-6'); 2,24 (3H, s, H-7')40 **espectro RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm):** δ (ppm) 180,2 (C-1); 32,2 (C-2); 27,6 (C-3); 44,3 (C-4); 32,9 (C-5); 20,7 (C-6); 21,3 (C-7); 130,1 (C-1'); 151,8 (C-2'); 115,6 (C-3'); 127,4 (C-4'); 129,4 (C-5'); 128,6 (C-6'); 20,9 (C-7')**Ejemplo 2 Método de aislamiento del compuesto 1 a partir de *A. oxyphyllae fructus***

45 [0033] Después pulverizarlos de forma gruesa, los frutos secados al aire de *A. oxyphyllae fructus* se extrajeron con un 95 % de solución acuosa de alcohol bajo reflujo tres veces, la solución del extracto se secó mediante rotavapor al baño maría. A continuación, los extractos crudos secos de *A. oxyphyllae fructus* se suspendieron en etanol y se absorbieron en el gel de sílice. Después de la eliminación del etanol, el gel de sílice seco se extrajo sucesivamente con éter de petróleo, acetato de etilo y etanol para producir parte de éter de petróleo, parte de acetato de etilo y parte de etanol, respectivamente. El ensayo biológico mostró que la parte de acetato de etilo es la más bioactiva y, por tanto, se seleccionó para para análisis adicionales. La parte de acetato de etilo se sometió a separación adicional mediante cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal con cloroformo

50

mezclado con cantidades ascendentes de metanol del 0 % al 20 % para producir 13 fracciones (fracciones A-M). El ensayo biológico mostró que esa fracción G es la más bioactiva. La fracción G se fraccionó mediante cromatografía en columna de elución de cloroformo mezclado con gel de sílice con cantidades ascendentes de metanol del 0 % al 2 % para producir cinco subfracciones principales GS1, GS2, GS3, GS4 y GS5. La subfracción GS2 se fraccionó adicionalmente mediante Sefadex LH-20 y se obtuvo el compuesto **1** a partir de una elución usando 100 % de metanol. La pureza del compuesto **1** se monitoreó mediante cromatografía en capa fina con yodo como indicador.

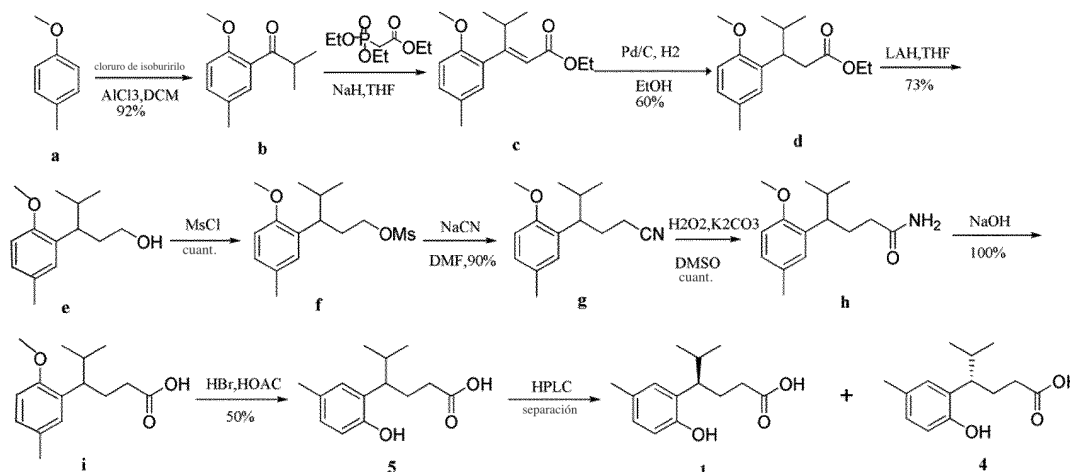
Ejemplo 3 Método de aislamiento de los compuestos **2** y **3** a partir de *A. oxyphyllae fructus*

[0034] Tal y como se presenta en el ejemplo 2, la fracción G más activa se fraccionó mediante cromatografía líquida de alta resolución preparatoria y se obtuvieron los compuestos **2** y **3** mediante una elución con un 25 % de acetonitrilo. La pureza de los compuestos **2** y **3** se monitoreó mediante UV a 254 nm.

[0035] La presente invención proporciona pruebas para defender el uso de los compuestos **1**, **2** y **3** como marcadores de sustancia química de referencia para controlar la calidad de la *A. oxyphyllae fructus*.

Ejemplo 4 Método de síntesis de los compuestos **1**, **4** y **5**

[0036] El compuesto **1**, junto con su isómero quiral, el compuesto **4** y el compuesto racémico **5** se sintetizaron tal y como muestra el esquema (I):



Esquema (I)

1) Síntesis de 1-(2-metoxi-5-metilfenil)-2-metipropán-1-ona (**b**)

[0037] El compuesto **a**, 4-Metilanisol, (76,4 g; 625 mmol; 1,0 eq) se añadió en gotas a una solución de AlCl_3 (100 g; 750 mmol; 1,2 eq) en DCM (1000 mL) a 0 °C, a continuación, se añadió gota a gota el cloruro de isoburirilo (80,0 g; 750 mmol; 1,2 eq) a la solución mientras se mantuvo la temperatura por debajo de 5 °C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, la mezcla se vertió en hielo machacado (2,0 kg); la capa orgánica se lavó con H_2O y NaCl acuoso saturado, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y, finalmente, se secó para proporcionar el compuesto **b** (110 g, 92 %) como un aceite marrón.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,14 (d; $J = 6,8$ Hz; 6H); 2,05 (s, 3H); 3,44-3,51 (m, 1H); 3,85 (s, 3H); 6,85 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H); 7,22 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H); 7,31 (s, 1H).

2) Síntesis de etil-(2E)-3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metipent-2-enoato (**c**)

[0038] A una suspensión de NaH (34,3 g; 858 mmol, 1,5 eq; 60 % en aceite mineral) en THF (1000 mL), se añadió fosfonoacetato de trietilo (192 g; 858 mmol; 1,5 eq) gota a gota manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C durante 40 min, a continuación, se agitó la solución a 0 °C durante 30 min. El compuesto **b** (110 g; 572 mmol; 1,0 eq) se añadió gota a gota manteniendo la temperatura por debajo de 10 °C durante 20 min. La mezcla se hizo hervir a reflujo durante toda la noche. La reacción se desactivó mediante NH_4Cl acuoso, la capa orgánica obtenida se lavó con H_2O y NaCl acuoso saturado; se secó con Na_2SO_4 , se filtró y evaporó, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 100/1 -30/1) para proporcionar el compuesto bruto **c** (150 g) como un aceite incoloro, que contenía el compuesto **b** y el compuesto **c**.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 0,81-1,18 (m, 9H); 2,20 (s, 3H); 2,53-2,59 (m, 1H); 3,67 (s, 3H); 3,89 (q; $J = 7,2$ Hz; 2H); 5,83 (s, 1H); 6,67 (s, 1H); 6,71 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H); 6,98 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H).

3) Síntesis de 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metipentanoato de etilo (**d**)

[0039] Una mezcla del compuesto **c** (150 g, crudo) y Pd/C (15 g, 10 %) en EtOH (500 mL) se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente a atmósfera de H₂ y, posteriormente, se filtró. El filtrado se evaporó para proporcionar el compuesto bruto **d** (110 g, rendimiento del 61 % en 2 etapas) como un aceite incoloro, que contenía el compuesto **d** (84 %; p/p) y el compuesto **b** (16 %, p/p).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (d; *J* = 6,8 Hz; 3H); 0,79 (d; *J* = 6,8 Hz; 3H); 1,06 (t; *J* = 7,2 Hz; 3H); 1,92-1,97 (m, 1H); 2,25 (s, 3H); 2,61-2,75 (m, 2H); 3,22-3,28 (m, 1H); 3,77 (s, 3H); 3,95 (q; *J* = 7,2 Hz; 2H); 6,72 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,88 (s, 1H); 6,94 (d; *J* = 8,4 Hz, 1H).

4) Síntesis de 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentan-1-ol (**e**)

[0040] El compuesto **d** (80,0 g; 255 mmol; 1,0 eq; 84 % p/p) se añadió gota a gota a una suspensión de LAH (13,8 g; 363 mmol; 1,43 eq) en THF (500 mL) a 0 °C durante 30 min y, a continuación, se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La reacción se desactivó sucesivamente mediante H₂O (13,8 g), NaOH acuoso (13,8 mL, 15 %) y H₂O (41,4 g), y posteriormente se filtró mediante celita y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 50/1 ~ 20/1) para proporcionar el compuesto **e** (41,4 g, 73 %) como un aceite incoloro.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,73 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,03 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,27-1,65 (m, 1H); 1,87-1,94 (m, 2H); 2,10-2,17 (m, 1H); 2,29 (s, 3H); 2,86-2,93 (m, 1H); 3,21-3,24 (m, 1H); 3,26-3,50 (m, 1H); 3,80 (s, 3H); 6,78 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H); 6,93 (s, 1H); 6,97 (d; *J* = 8,1 Hz, 1H).

5) Síntesis de metilsulfonato de 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentilo (**f**)

[0041] Se añadió MsCl (42,6 g; 558 mmol; 2,0 eq) en gotas a una solución del compuesto **e** (41,4 g; 186 mmol, 1,0 eq) y TEA (56,5 g; 558 mmol; 3,0 eq) en DCM (750 mL) a 0 °C y la solución se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de 2 h, la mezcla se lavó con H₂O y después con NaCl acuoso, se secó con Na₂SO₄, se filtró y evaporó para proporcionar el compuesto **f** (55,8 g; 100 %) como un aceite marrón.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0,72 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 0,97 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 1,84-1,91 (m, 1H); 1,97-2,06 (m, 1H); 2,18-2,26 (m, 4H); 2,83-3,14 (m, 4H); 3,75 (s, 3H); 3,88-3,94 (m, 1H); 4,00-4,05 (m, 1H); 6,74 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,86 (s, 1H); 6,96 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H).

6) Síntesis de 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanonitrilo (**g**)

[0042] Una mezcla del compuesto **f** (55,8 g; 186 mmol; 1,0 eq) y NaCN (18,2 g; 372 mmol; 2,0 eq) en DMF (300 mL) se agitó a 75 °C durante toda la noche y se distribuyó en EtOAc y H₂O. La capa orgánica se lavó con H₂O y NaCl acuoso saturado, se secó con Na₂SO₄, se filtró y evaporó para proporcionar el compuesto **g** (38,5 g; 90 %) como un aceite incoloro.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0,71 (d; *J* = 6,8 Hz; 3H); 0,99 (d; *J* = 6,8 Hz; 3H); 1,85-2,17 (m, 5H); 2,28 (s, 3H); 2,75-2,81 (m, 1H); 3,76 (s, 3H); 6,75 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,84 (s, 1H); 6,98 (d; *J* = 8,4 Hz, 1H).

7) Síntesis de 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanamida (**h**)

[0043] Se añadió H₂O₂ (32,0 g; 282 mmol; 1,5 eq; 30 % en H₂O) gota a gota a una suspensión del compuesto **g** (43,5 g; 188 mmol; 1,0 eq) y K₂CO₃ (10,4 g; 75,2 mmol; 0,4 eq) en DMSO (220 mL) a temperatura ambiente, a continuación, la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió H₂O₂ adicional (32,0 g; 282 mmol; 1,5 eq; 30 % en H₂O) gota a gota a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se separó entre EtOAc y H₂O, la capa orgánica se lavó con H₂O y luego con NaCl acuoso saturado, se secó con Na₂SO₄, se filtró y evaporó para proporcionar el compuesto **h** (46,9 g; 100 %) como un sólido blanco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,72 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,00 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,73-2,21 (m, 5H); 2,28 (s, 3H); 2,79-2,84 (m, 1H); 3,79 (s, 3H); 5,38 (brs; 2H); 6,76 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,85 (s, 1H); 6,97 (d; *J* = 8,4 Hz, 1H).

8) Síntesis de ácido 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico (**i**)

[0044] Una mezcla del compuesto **h** (46,9 g; 188 mmol; 1,0 eq), NaOH (30,1 g; 752 mmol; 4,0 eq) y H₂O (100 mL) en EtOH (400 mL) se hizo hervir a reflujo durante toda la noche y se concentró. El pH del residuo se ajustó con HCl 1N hasta 2, a continuación, se extrajo el residuo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso, se secó con Na₂SO₄, se filtró y evaporó para proporcionar el compuesto **i** (47,1 g; 100 %) como un aceite marrón.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,74 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,01 (d; *J* = 6,6 Hz; 3H); 1,78-1,94 (m, 2H); 2,04-2,20 (m, 3H); 2,28 (s, 3H); 2,76-2,82 (m, 1H); 3,76 (s, 3H); 6,76 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,89 (s, 1H); 6,97 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H).

9) Síntesis de ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico (**1**) y ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico (**4**)

[0045] Se añadió una solución de HBr (235 mL, 33 % en AcOH) a una solución del compuesto **1** (47,1 g; 188 mmol) en AcOH (235 mL) gota a gota a temperatura ambiente y, posteriormente, se hizo hervir a reflujo durante toda la noche. La mezcla se diluyó con EtOAc y H₂O. La capa orgánica se lavó con H₂O y NaCl acuoso saturado y, posteriormente, se concentró. El residuo se diluyó con EtOH (400 ml) y H₂O (40 mL) con LiOH.H₂O (31,6 g; 752 mmol) añadido; la mezcla se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, se concentró. El residuo se diluyó, y acidificó con HCl 1N hasta un pH de 2-3. La capa orgánica se lavó mediante H₂O, y después con NaCl acuoso, se secó con Na₂SO₄, se filtró y evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE/EtOAc = 100/1 a 10/1) para proporcionar el compuesto **5** (22,2 g; 50 %) como un sólido blanco. Se separaron 11,0 g de **5** mediante HPLC preparativa quiral para proporcionar 4,5 g de compuesto **1** y 3,8 g de compuesto **4**.

[0046] Compuesto **1**: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,68 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 0,92 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 1,68-1,97 (m, 5H); 2,17 (s, 3H); 2,65-2,68 (m, 1H); 6,66 (d; *J* = 7,6 Hz; 1H); 6,76-6,79 (m, 2H); 8,83 (s, 1H); 11,84 (s, 1H); RMN ¹H (600 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm): δ 6,66 (d; *J* = 8,52 Hz; 2H); 6,85 (d; *J* = 8,52 Hz; 2H); 6,85 (s, 1H); 2,67 (m, 1H); 1,80; 2,17 (m, 2H); 2,18; 2,11 (m, 2H); 1,85 (m, 1H); 1,01 (d; *J* = 6,58 Hz; 3H); 0,74 (d; *J* = 6,65 Hz; 3H); 2,27 (s, 3H); LCMS [fase móvil: desde el 95 % de agua (0,01 % NH₄Ac) y el 5 % de CH₃CN hasta el 5 % de agua (0,01 % de NH₄Ac) y el 95 % de CH₃CN en 6 min, finalmente, bajo estas condiciones durante 0,5 min.] la pureza es > 95 %, Rt = 3,847 min; MS Calculado: 236; MS encontrado: 237 ([M + H]⁺); HPLC quiral (columna de Chiralcel OJ-H): Rt = 7,16 min (Hex/*t*-ButOH/TFA = 95:5:0,3), ee = 100 % [α]_D²⁵ = -19,4 (c 0,72; CH₂Cl₂).

[0047] Compuesto **4**: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0,68 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 0,92 (d; *J* = 6,4 Hz; 3H); 1,66-2,01 (m, 5H); 2,17 (s, 3H); 2,65-2,67 (m, 1H); 6,66 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 6,76-6,79 (m, 2H); 8,79-8,84 (brs, 1H); 11,79-11,86 (brs, 1H); RMN ¹H (600 MHz; CDCl₃; δ_{TMS} = 0,00 ppm): δ 6,65 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 6,84 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 6,84 (1H, s, H-5); 2,67 (m, 1H); 1,81; 2,18 (m, 2H); 2,20; 2,13 (m, 2H); 1,86 (m, 1H); 1,02 (d; *J* = 6,5 Hz; 3H); 0,74 (d; *J* = 6,5 Hz; 3H); 2,24 (s, 3H); LCMS [fase móvil: desde el 95 % de agua (0,01 % de NH₄Ac) y el 5 % de CH₃CN hasta el 5 % de agua (0,01 % de NH₄Ac) y el 95 % de CH₃CN en 6 min, finalmente, bajo estas condiciones durante 0,5 min.] la pureza es > 95 %, Rt = 3,849 min; MS Calculado: 236; MS encontrado: 237 ([M + H]⁺); HPLC quiral (columna de Chiralcel OJ-H): rt = 10,24 min (Hex/*t*-ButOH/TFA = 95:5:0,3; enantiómero: Rt = 7,31 min), ee = 98 %; [α]_D²⁵ = +20,0 (c 0,72; CH₂Cl₂)

[0048] Compuesto **5**: espectro RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ_{TMS} = 0,00 ppm): δ 6,65 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 6,85 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 6,85 (s, 1H); 2,66 (m, 1H); 1,82; 2,18 (m, 2H); 2,20; 2,13 (m, 2H); 1,87 (m, 1H); 1,02 (d; *J* = 6,5 Hz; 3H); 0,74 (d; *J* = 6,5 Hz; 3H); 2,24 (s, 3H)

Ejemplo 5 Estudio sobre los efectos en la protección contra el daño las CGN inducido por MPP⁺

[0049] La N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es la precursora del 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial generado a partir de la MPTP por la enzima catabólica dopaminérgica monoamino oxidasa B. La acumulación de MPP⁺ en las neuronas dopaminérgicas provoca una deficiencia de ATP, el colapso del potencial de membrana mitocondrial, la abertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), y la producción de ROS, lo que conduce a la apoptosis. Se ha usado ampliamente MPTP/MPP⁺ en el daño neuronal *in vitro* e *in vivo* para demostrar la característica de neurodegeneración dopaminérgica de la enfermedad de Parkinson.

[0050] Las neuronas granulares del cerebelo primarias (CGN) se prepararon a partir de ratas Sprague-Dawley de 8 días de edad, tal y como se describe en una publicación precedente (Du, Bales et al. 1997). Las CGN cultivadas *in vitro* durante 7 días se pretrataron con concentraciones en serie de los compuestos **1-5** desde 6 μM hasta 50 μM respectivamente durante 2 horas, el grupo tratado con el vehículo se incubó con un 0,1 % de DMSO. A continuación, las células se expusieron a 150 μM de MPP⁺ durante 36 horas. Para evaluar la viabilidad celular, se añadieron 15 μl de 5 mg/ml de solución de MTT a cada pocillo con células en 100 μl de medio, y las placas se incubaron durante 4 horas en una incubadora humidificada a 37 °C. Tras la incubación, se añadieron 100 μl de DMSO absoluto y se incubaron durante 10 min. Se midió la absorbancia a 570 nm de cada pocillo con un lector de microplacas.

[0051] La figura 1 muestra que los compuestos **1-5** evitaban el daño en las CGN inducido por MPP⁺. El compuesto **1** muestra un efecto neuroprotector en el daño inducido por el MPP⁺ en las CGN primarias de las ratas SD de forma dosisdependiente con una E_{máx} en la concentración de 50 μM. El compuesto **2** tiene un efecto neuroprotector en el daño inducido por el MPP⁺ en las CGN primarias de las ratas SD con una E_{máx} en la concentración de 50 μM. El compuesto **3** tiene un efecto neuroprotector en el daño inducido por el MPP⁺ en las CGN primarias de las ratas SD con una E_{máx} en la concentración de 25 μM. El compuesto **4** tiene un efecto neuroprotector en el daño inducido por el MPP⁺ en las CGN primarias de las ratas SD. El compuesto **5** tiene un efecto neuroprotector en el daño inducido por el MPP⁺ en las CGN primarias de las ratas SD de forma manera dosisdependiente con una E_{máx} en la concentración de 50 μM.

[0052] Tal y como se presenta en la figura 1, la viabilidad celular de las CGN se ha visto significativamente aumentada después de ser pretratada con concentraciones diferentes de los compuestos 1-5. De este modo, la figura 1 muestra que los compuestos 1-5 pueden proteger contra el daño neuronal inducido por el MPP⁺, y se pueden usar para tratar enfermedades neurodegenerativas.

5

Ejemplo 6 Estudio sobre los efectos en la protección de las células PC12 contra el daño neuronal inducido por 6-OHDA

[0053] Las células de feocromocitoma de rata (PC12) se sembraron en platos de ϕ 100 cm con una densidad de $1,5\sim 2\times 10^6$ células/plato. Después del cultivo en un medio con una concentración sérica baja (medio F-12K con 0,5 % de FBS) durante 24 horas, las células se pretrataron con concentraciones en serie del compuesto 1 de 6 μ M a 50 μ M durante 12 horas. A continuación, las células se expusieron a 1 mM de 6-OHDA durante 2 horas. La viabilidad celular de las células se evaluó de forma similar a la descrita en el ejemplo 5. Tal y como se muestra en la figura 2A, las células PC12 pretratadas con el compuesto 1 no mostraron ningún tipo de citotoxicidad en todas las concentraciones evaluadas. La 6-OHDA fue citotóxica para las células PC12 pero el compuesto 1 pudo aliviar el efecto citotóxico de manera dosisdependiente tal y como se muestra en la figura 2B. El compuesto 1 mostró un efecto neuroprotector significativo y máximo en las PC12 tratadas con 6-OHDA en 50 μ M. Se ha demostrado que la baicaleína, uno de los principales flavonoides extraídos de la raíz de *Scutellaria baicalensis Georgi* (SBG), evita el daño neuronal inducido por 6-OHDA o MPTP tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo* de la enfermedad de Parkinson (Im, Joo et al. 2005; Lee, Noh et al. 2005; Cheng, He et al. 2008; Mu, He et al. 2009; Mu, He et al. 2011). En la presente, la baicaleína se utilizó como un control positivo, que, en la concentración de 100 μ M, protegió obviamente las células PC12 contra el daño neuronal inducido por 6-OHDA.

[0054] De este modo, las figuras 2A y 2B muestran que el compuesto 1 puede tener un efecto neuroprotector en las PC12 tratadas con 6-OHDA. Además, el compuesto 1 tiene un efecto neuroprotector en el daño en las células PC12 inducido por 6-OHDA de manera dosisdependiente con una eficacia máxima (E_{máx}) en la concentración de 50 μ M.

Ejemplo 7 Estudio sobre el efecto de atenuación de la lesión en las neuronas DA inducida por la MPTP

[0055] El embrión de pez cebra se declaró a día 1 posfecundación (dpf) y se cultivó en cotratamiento de 200 μ M de MPTP y varias concentraciones de compuesto 1 durante 48 horas. A continuación, el pez cebra se fijó en un 4 % de paraformaldehído en PBS durante 5 horas, se enjuagó y almacenó a -20 °C en un 100 % de EtOH. La inmunotinción de preparación completa se llevó a cabo mediante métodos estándar (Bitzur, Kam et al. 1994). El compuesto 1 atenuó la lesión en las neuronas DA inducida por la MPTP de manera dosisdependiente tal y como se muestra en las figuras 3D-F. Además, el compuesto 1 puede proteger de la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por la MPTP en el pez cebra de manera dosisdependiente con una E_{máx} en la concentración de 5 μ M, como se muestra en la figura 3G, donde los resultados se expresaron de forma cuantitativa como porcentajes de áreas de células TH-positivas en comparación con el grupo de control no tratado. De este modo, la figura 3G muestra que el compuesto 1 puede proteger contra la pérdida de células TH-positivas.

Ejemplo 8 Estudio sobre el efecto de atenuación de la reducción de la distancia total recorrida inducida por MPTP en las larvas de pez cebra

[0056] Las larvas de pez cebra del dpf 3 se cotrataron con 200 μ M de MPTP y varias concentraciones del compuesto 1 durante 4 días. En el dpf 7, la distancia total recorrida por las larvas se registró usando una placa de 96 pocillos (con 1 pez/pocillo y 12 larvas por grupo) rellena con 200 μ l de medio de embrión. Se dejó que las larvas se adaptaran al sistema durante una hora antes de la adquisición de los datos. El patrón de nado de cada larva se registró durante 10 min en 3 veces, con cada sesión de registro separada por 10 min. La distancia total recorrida se estimó como la distancia (en mm) que la larva había movido durante una sesión (10 min). Tal y como se muestra en las figuras 4A y 4B, el compuesto 1 atenuó la reducción de la distancia total recorrida inducida por la MPTP de las larvas de manera dosisdependiente.

55

Ejemplo 9 Estudio sobre el efecto neuroprotector sinérgico del compuesto 1 y la crisina

[0057] Las neuronas granulares del cerebelo primarias (CGN) se prepararon a partir de ratas Sprague-Dawley de 8 días de edad tal y como se ha descrito (Zhang et al., 2012). Las CGN que se habían cultivado *in vitro* durante 7 días se pretrataron con concentraciones en serie del compuesto 1 de 3 μ g/ml a 50 μ g/ml durante 2 horas o con un 0,1 % de DMSO (grupo tratado con el vehículo). La viabilidad celular se estimó de forma similar a la del ejemplo 5.

[0058] Tal y como se muestra en la figura 5, tanto el compuesto 1 como la crisina tuvieron un efecto protector contra el daño de celular en las CGN inducido por el MPP⁺ de manera dosisdependiente. La viabilidad celular se vio significativamente mejorada cuando las células se trataron con 25 y 50 μ M de compuesto 1 así como con 12

65

y 25 μM de crisina en comparación con el grupo de control tratado solo con MPP⁺ ($p < 0,05$). Las CGN se cotrataron también con el compuesto **1** y la crisina para explorar la interacción farmacológica entre dos compuestos. Se ha descubierto que, en concentraciones superiores tales como 25 y 50 μM , el cotratamiento no ejerce ningún tipo de efecto neuroprotector, sino que impone toxicidad en las CGN (datos no mostrados). Por el contrario, en concentraciones inferiores, de 3 y 6 μM , el compuesto **1** y la crisina mostraron un efecto neuroprotector sinérgico significativo en comparación con las células tratadas solo con MPP⁺, MPP⁺/compuesto **1** y MPP⁺/crisina.

Ejemplo 10 Estudio del efecto neuroprotector del compuesto 1 en ratones a los que se ha inyectado MPTP

Animales y tratamiento con fármacos

[0059] En este estudio, se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J (8-10 semanas de edad, 18-22 g). Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h y se les permitió el acceso a alimentos y agua ad libitum. Se les permitió aclimatarse durante 7 días antes del tratamiento. Como se muestra en la figura 6, todos los animales se sometieron a un aprendizaje conductual (subida de barra vertical, carrera rotarod y huellas) durante un total de 4 días antes de la inyección de MPTP. A continuación, se les inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 20 mg/kg de hidrocloreto de MPTP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), en 2 h en interno para un total de 4 inyecciones. El grupo de control normal recibió solución salina (0,1 mL/10 g) por vía i.p. Una hora antes de cada inyección de MPTP, se administró por vía i.p. el compuesto **1** (5,10 y 20 mg/kg), rasagilina (1 mg/kg) y un volumen igual de vehículo (aceite de oliva, 0,1 mL/10 g). Seguidamente, se proporcionó el compuesto **1**, la rasagilina o el vehículo por vía i.g. una vez al día durante un total de 7 días (día 1-7). Cada uno de los seis grupos se constituía de 10 ratones.

Pruebas conductuales

[0060] Veinticuatro horas después de la administración de la última dosis de fármacos (en el día 8, como se muestra en la figura 6) se observaron cambios neuroconductuales en los ratones mediante las pruebas de barra vertical, rotarod y huella. Todas las pruebas se llevaron a cabo entre las 9:00 y las 14:00 con iluminación de cámara de animal normal.

[0061] La prueba de la barra vertical se llevó a cabo para detectar el deterioro del movimiento de las extremidades. Se instaló una pelota de tenis de mesa (5 cm de diámetro) sobre una barra vertical (55 cm de longitud y 1 cm de diámetro). La barra vertical se recubrió con una capa doble de gasa para evitar el deslizamiento. El animal se colocó con la cabeza hacia arriba sobre la pelota de tenis de mesa. El tiempo que tardó el animal en bajar al suelo se usó para indicar el rendimiento. Se llevaron a cabo pruebas repetidas tres veces para cada animal y los valores medios se usaron para el análisis estadístico.

[0062] La prueba de rotarod podría revelar la capacidad de coordinación motriz. Un sistema rotarod (YLS-4C, Academia de Ciencias Médicas de la Provincia de Shandong, China) se estableció en un programa de aceleración con una velocidad de inicio de 5 r.p.m. a una velocidad final de 40 r.p.m. Se permitió que los ratones ajustaran su postura para mantener el equilibrio en una barra de rotación durante la velocidad de aceleración. Se emplean haces infrarrojos para detectar si un ratón se ha caído sobre la rejilla de base que se encuentra bajo el rotarod. El sistema registra la caída como el final del experimento para dicho ratón, y se registra el tiempo total en el rotarod. Para la prueba se evaluaron 5 ratones al mismo tiempo. Se calculó el tiempo de retención medio en la barra.

[0063] En la prueba de la huella, se prepararon ratones con las patas delanteras y traseras coloreadas con tinta roja para que caminaran a través de un pasillo de 5 cm de ancho y 100 cm de largo. Sus pasos se registraron en un papel blanco absorbente.

Preparación del tejido

[0064] Los ratones se sacrificaron para la preparación del tejido el día 9 tal y como se describe en la figura 6. Los ratones de cada grupo fueron anestesiados y se les perfundió intracardialmente con un 0,9 % de cloruro sódico que contenía heparina y, a continuación, se fijaron con un 4 % de paraformaldehído (PFA). Cada cerebro se extrajo, deshidrató con alcohol graduado y se introdujo en cera de parafina, seccionado coronariamente en 5 μM . Las partes de rostral y caudal del cerebro se dividieron para la inmunohistoquímica de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

Inmunohistoquímica de anti-tirosina hidroxilasa (TH)

[0065] La inmunohistoquímica se desarrolló tal y como se ha descrito previamente (Lee, Kim et al. 2011; Levites, Weinreb et al, 2001). Resumidamente, las secciones se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie de etanol graduado. Las secciones se incubaron con un 3 % de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 10 min a

temperatura ambiente para inactivar la actividad de peroxidasa endógena, a lo que siguió la recuperación de antígenos en el tampón de citrato durante 15 min en un horno microondas a 95 °C. La unión a proteínas no específica se bloqueó con un 10 % de suero bovino en PBS (0,01 M; pH 7,4). Entre cada tratamiento, se lavaron las láminas al menos tres veces con agua desionizada durante 5 min. A continuación, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-TH de ratón (1:1000; filtro millipore, EE.UU.) diluido en el tampón Immunol Staining Primary Antibody Dilution Buffer. Posteriormente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP biotinilado durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se visualizaron las neuronas TH-positivas usando un equipo DAB según las instrucciones del fabricante (Shanghái, Gene Company, China). La reacción de la peroxidasa se detuvo después de 3 minutos. Finalmente, las secciones se cubrieron con un cubreobjetos con bálsamo neutro. Los resultados se analizaron contando los números de células TH-positivas con ampliaciones $\times 10$ en un estereomicroscopio (BX51, Olympus Corp. Japón). Las células TH positivas en 8 secciones de posición coincidente de cada ratón se contaron manualmente mediante un operador que fue cegado al tratamiento farmacológico. El número medio de células TH-positivas por sección se utilizó para representar la viabilidad de la neurona dopaminérgica.

Resultados

El compuesto 1 mejoró el deterioro del movimiento en los ratones tratados con MPTP

[0066] La pérdida de neuronas DA de la SNpc contribuye a las anomalías en el movimiento observadas en la EP. Se evaluó el movimiento de los ratones después de la inyección de MPTP. Las figuras 7A a 7D muestran que la MPTP aumentó significativamente el tiempo de descenso de la barra vertical (figura 7A), retrasó el tiempo empleado en cruzar el pasillo (figura 7B), redujo el tiempo de los ratones en la barra de rotor de rotación (figura 7C) y provocó que los ratones perdieran su marcha normal, disminuyendo la longitud de zancada (figura 7D). De tal modo, las figuras 7A a 7D muestran que el tratamiento con el compuesto 1 corrigió en gran medida las anomalías de movimiento de manera dosisdependiente.

Efecto del compuesto 1 en la pérdida de neuronas DA de la SNpc en los ratones tratados con MPTP

[0067] Una inyección de MPTP (20 mg/kg) cada 2 h para un total de cuatro dosis a lo largo de un periodo de 8 h en 1 d provocó una pérdida de aproximadamente un 40 % de neuronas DA TH-positivas en la SNpc 7 días después de la inyección, y la pérdida de células TH-positivas resultó más marcada en el la parte central que en las partes rostral y caudal (figura 8A y B). El pre y el postratamiento con el compuesto 1 redujeron significativamente la pérdida de cuerpos celulares TH-positivos inducidos por MPTP de manera dosisdependiente (figuras 8A a 8C). Se usó el mismo programa para la rasagilina, un inhibidor selectivo de la MAO-B aprobado para el tratamiento de pacientes de EP, que también evitó la pérdida de cuerpos celulares TH-positivos inducida por MPTP.

Conclusión

[0068] La presente invención proporciona tres compuestos aislados y purificados: **1** (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico), **2** (ácido (4S)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico) y **3** (ácido (4R)-4-(3-hidroxi-3-metil-6-oxociclohex-1-enil)-5-metilhexanoico), aislado a partir de *A. oxyphyllae fructus*, con efecto neuroprotector tal y como se muestra en los ejemplos anteriores; y dos compuestos sintetizados: **4** (ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) y **5** (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) con efecto neuroprotector. Estos cinco compuestos principales tienen efectos neuroprotectores que podrían desarrollarse para obtener agentes terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo la enfermedad de Parkinson). Además, la presente invención proporciona un método sencillo y fácil para extraer y purificar estos tres compuestos nuevos **1-3** a partir del *A. oxyphyllae fructus* y un procedimiento elaborado para sintetizar los compuestos **1, 4 y 5**. Asimismo, se presenta la actividad neuroprotectora *in vitro* en las CGN de los compuestos **1-5**. Además, esta invención muestra que el compuesto **1** posee actividades neuroprotectoras *in vivo* e *in vitro* para las células PC12 y el pez cebra.

[0069] Los datos presentados aquí muestran que, en el daño en las neuronas granulosas cerebrales cultivadas primarias inducido por el MPP⁺ (CGN), los compuestos **1-5** mostraron un efecto neuroprotector dependiente de la concentración en una concentración de 6-50 μM . Además, el compuesto **1** podría proteger a las células PC12 de la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA; al pez cebra de la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por la MPTP; y mejorar el deterioro del comportamiento de nado inducido por la MPTP en el pez cebra. Asimismo, el compuesto **1** podría mejorar el deterioro del movimiento en ratones tratados con MPTP y reducir la pérdida de cuerpos celulares TH-positivos inducida por la MPTP. Por añadidura, el compuesto **1** y la crisina (otro compuesto flavonoide conocido aislado a partir de *A. oxyphyllae fructus*) mostró efectos neuroprotectores sinérgicos en el daño en las CGN inducido por el MPP⁺. Estos resultados sugieren que los compuestos **1-5** solos o combinados con otros compuestos neuroactivos se pueden usar como un fármaco para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson.

[0070] Además del método de compuesto único del tratamiento descrito previamente, la combinación del compuesto **1** y la crisina muestran un efecto sinérgico. Un experto en la técnica en el curso del desarrollo de un régimen de tratamiento será capaz de determinar la dosis terapéutica óptima por administrar a un paciente usando o bien uno de los compuestos anteriores o en combinación sin experimentación excesiva.

[0071] De este modo, se han descrito completamente las formas de realización ejemplares de la presente invención. Aunque la descripción se refiera a formas de realización particulares, resultará evidente para un experto en la materia que la presente invención se puede llevar a la práctica con variaciones de estos detalles específicos. Por lo tanto, esta invención no debería interpretarse como limitada a las formas de realización aquí expuestas.

[0072] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo sentido entendido de forma común por un técnico en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos aquí para llevar a la práctica o probar la invención, los métodos y materiales preferidos se describirán a continuación. La práctica de la invención se ejemplifica en los siguientes ejemplos no limitativos. El ámbito de la invención se define únicamente por las reivindicaciones anexas, que en modo alguno se limitan por el contenido o alcance de los ejemplos.

Referencias

[0073]

An, L., S. Guan, et al. (2006). "Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells." *Food and chemical toxicology* 44(3): 436-443.

Bitzur, S., Z. Kam, et al. (1994). "Structure and distribution of N-cadherin in developing zebrafish embryos: morphogenetic effects of ectopic over-expression." *Dev Dyn* 201(2): 121-136.

Cheng, Y., G. He, et al. (2008). "Neuroprotective effect of baicalein against MPTP neurotoxicity: behavioral, biochemical and immunohistochemical profile." *Neurosci Lett* 441(1): 16-20.

Du, Y., K. R. Bales, et al. (1997). "Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(21): 11657-11662.

Graziose, R., M. A. Lila, et al. (2010). "Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods." *Curr Drug Discov Technol* 7(1): 2-12.

Im, H. I., W. S. Joo, et al. (2005). "Baicalein prevents 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic dysfunction and lipid peroxidation in mice." *J Pharmacol Sci* 98(2): 185-189.

Lee, D. H., C. S. Kim, et al. (2011) Astaxanthin protects against MPTP/MPP⁺ -induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol* 49(1):271-280.

Lee, H. J., Y. H. Noh, et al. (2005). "Baicalein attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells." *Eur J Cell Biol* 84(11): 897-905.

Levites Y., O. Weinreb, et al. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem* 78(5):1073-1082.

Li, W., M. Mak, et al. (2009). "Novel anti-Alzheimer's dimer Bis(7)-cognitin: cellular and molecular mechanisms of neuroprotection through multiple targets." *Neurotherapeutics* 6(1): 187-201.

Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* 443(7113): 787-795.

Mandel, S., T. Amit, et al. (2007). "Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents." *Prog Neurobiol* 82(6): 348-360.

Mu, X., G. He, et al. (2009). "Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro." *Pharmacol Biochem Behav* 92(4): 642-648.

Mu, X., G. R. He, et al. (2011). "Baicalein protects the brain against neuron impairments induced by MPTP in C57BL/6 mice." *Pharmacol Biochem Behav* 98(2): 286-291.

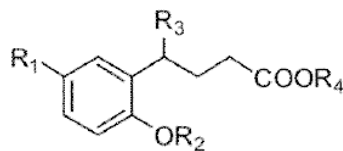
Yang, M., J. Sun, et al. (2009). "Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1216(11): 2045-2062.

5 Zhang, X., G. F. Shi, et al. (2011). "Anti-ageing effects of protocatechuic acid from *Alpinia* on spleen and liver antioxidative system of senescent mice." *Cell Biochemistry and Function* 29(4): 342-347.

10 Zhang, Z. J., L. C. V. Cheang, et al. (2012). "Ethanollic Extract of *Fructus Alpinia oxyphylla* Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Damage of PC12 Cells In Vitro and Dopaminergic Neurons in Zebrafish." *Cellular and molecular neurobiology* 32(1): 27-40.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I:



Fórmula I

donde R₁ y R₃ son independientemente alquilo (C1-C3) no sustituido o sustituido; y R₂ y R₄ son H.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde dicho compuesto es un (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) aislado y purificado.

3. Compuesto según la reivindicación 1, donde dicho compuesto es el (ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) o el (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico).

4. Composición que comprende dicho compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una sal o vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en un método de protección contra el daño neuronal o la pérdida de células neuronales, o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

6. Compuesto para usar según la reivindicación 5, donde dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.

7. Compuesto para usar según la reivindicación 5, donde dicho compuesto se aplica en combinación con la crisina, y dicho compuesto muestra un efecto sinérgico con dicha crisina para un efecto neuroprotector.

8. Método de preparación del (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) y sus estereoisómeros, que comprende las etapas de

a) reaccionar 4-metilanol con cloruro de isoburirilo para obtener 1-(2-metoxi-5-metilfenil)-2-metilpropan-1-ona;

b) reaccionar dicha 1-(2-metoxi-5-metilfenil)-2-metilpropan-1-ona con fosfonoacetato de trietilo para obtener (2E)-3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpent-2-enoato de etilo;

c) reaccionar el (2E)-3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpent-2-enoato de etilo con Pd/C en etanol en una atmósfera de H₂ para obtener 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentanoato de etilo;

d) reaccionar el 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentanoato de etilo con LAH en THF para obtener 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentan-1-ol;

e) reaccionar el 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentan-1-ol con MsCl para obtener metilsulfonato de 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentilo;

f) reaccionar metilsulfonato de 3-(2-metiloxi-5-metilfenil)-4-metilpentilo con NaCN en DMF para obtener 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanonitrilo;

g) reaccionar H₂O₂ con una suspensión de 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanonitrilo y K₂CO₃ en DMSO para obtener 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanamida;

h) reaccionar 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanamida con NaOH para obtener el ácido 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico;

i) obtener dicho (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) mediante reacción del ácido 4-(2-metiloxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico con HBr;

j) separar dicho (ácido 4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) por HPLC preparativa quiral para obtener dichos estereoisómeros;

donde dicho estereoisómero es el (ácido (S)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico) o el (ácido (R)-4-(2-hidroxi-5-metilfenil)-5-metilhexanoico).

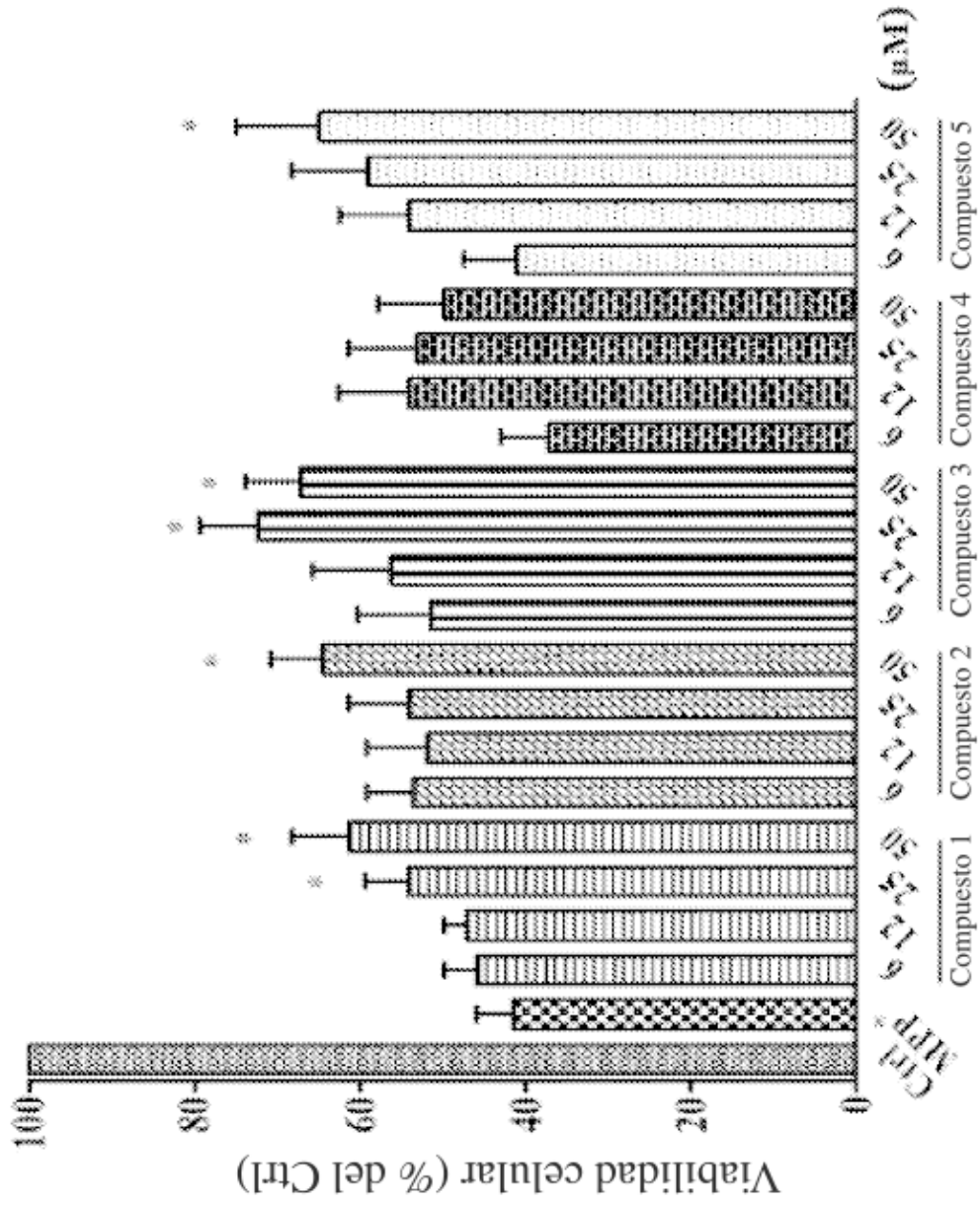


Figura 1

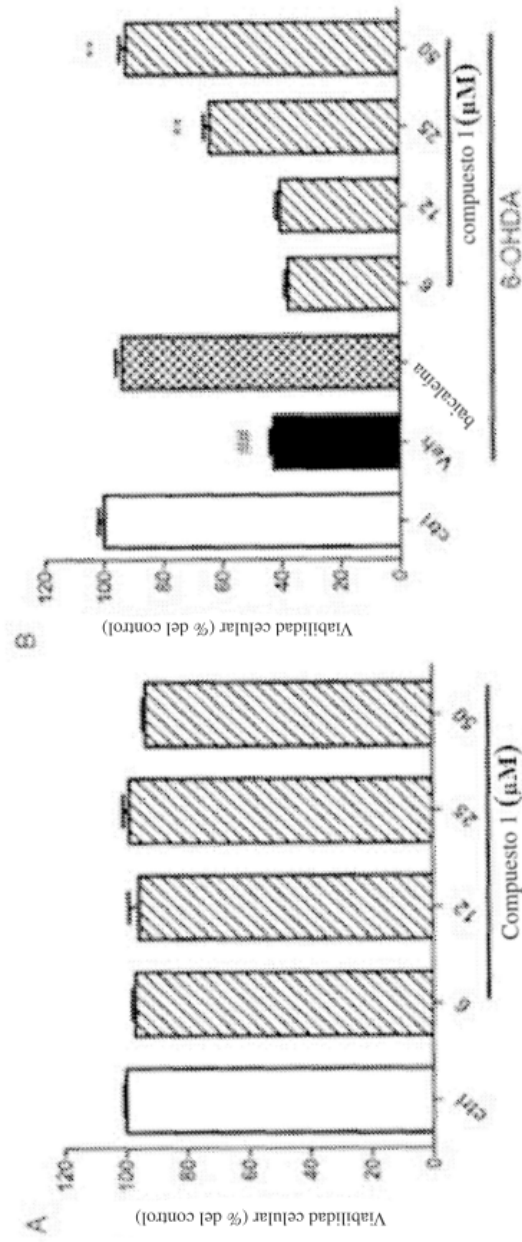


Figura 2

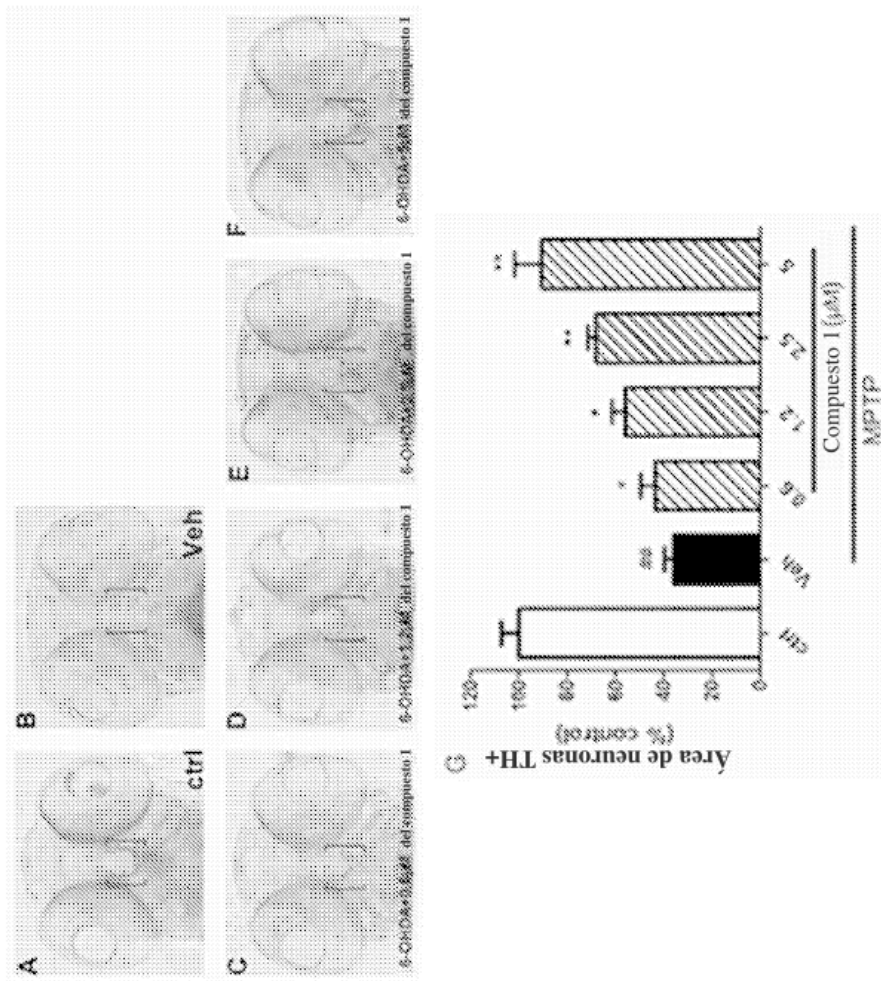


Figura 3

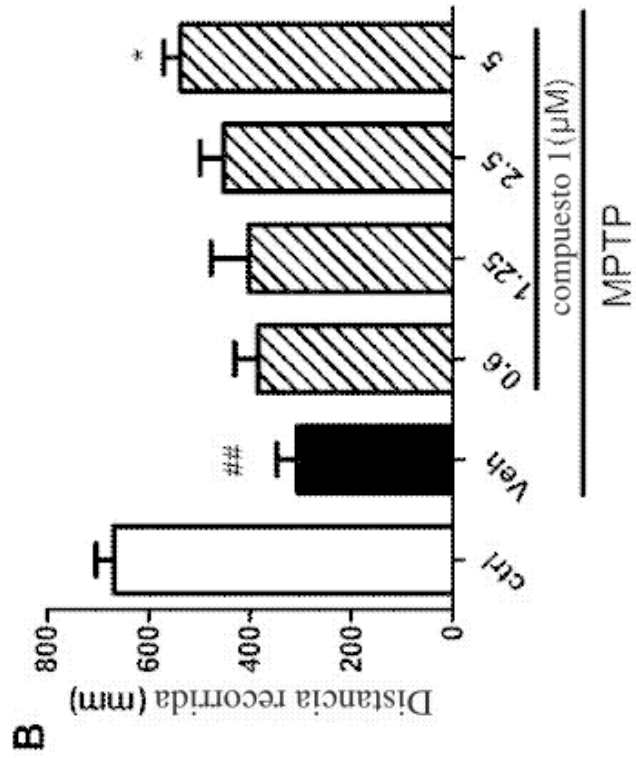
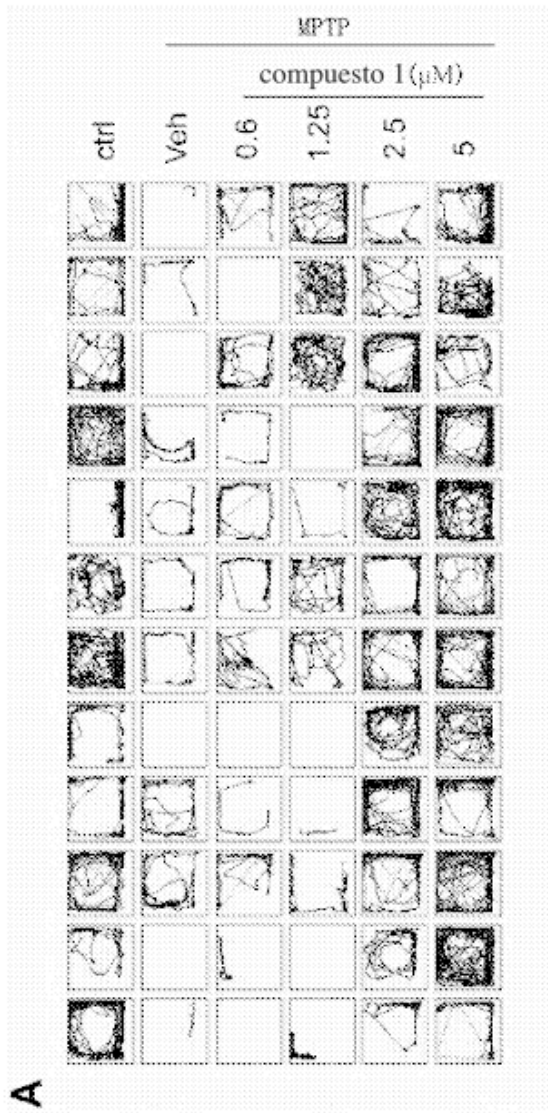


Figura 4

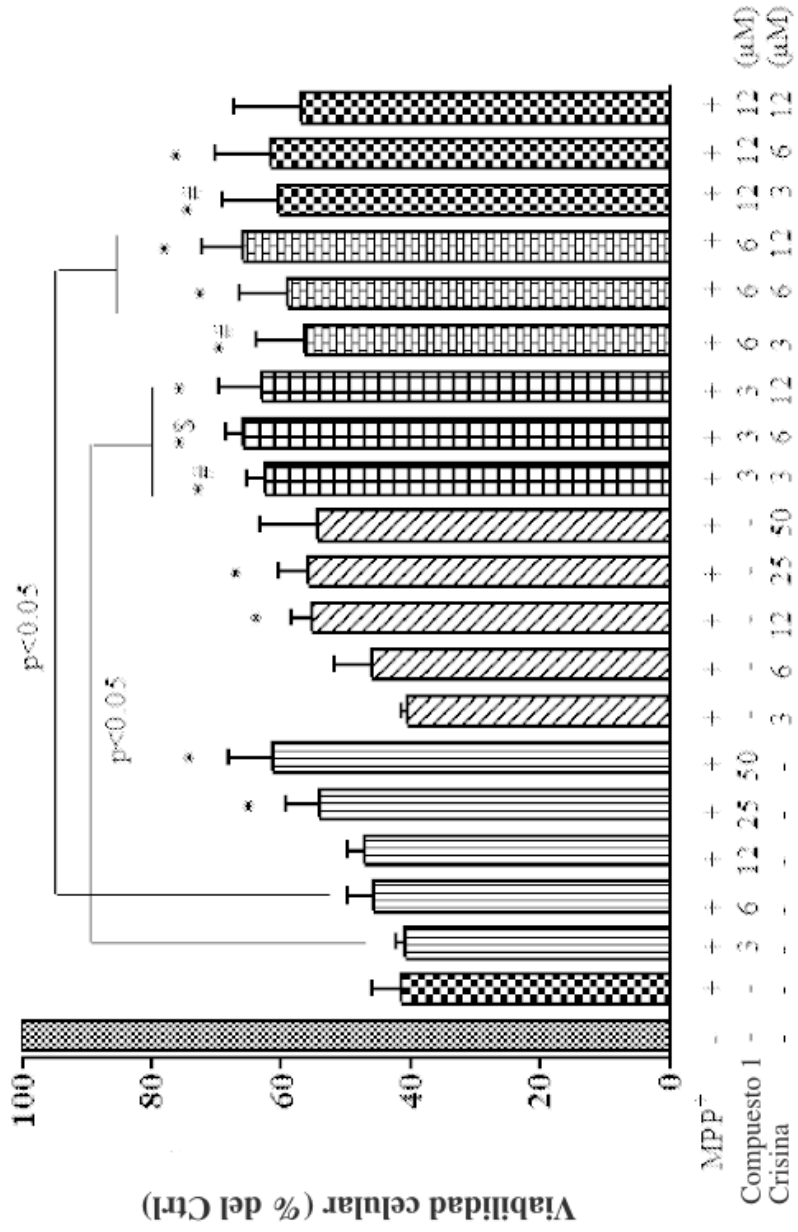


Figura 5

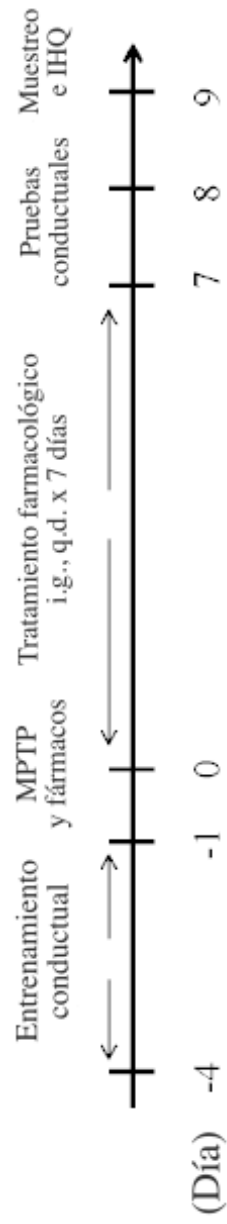


Figura 6

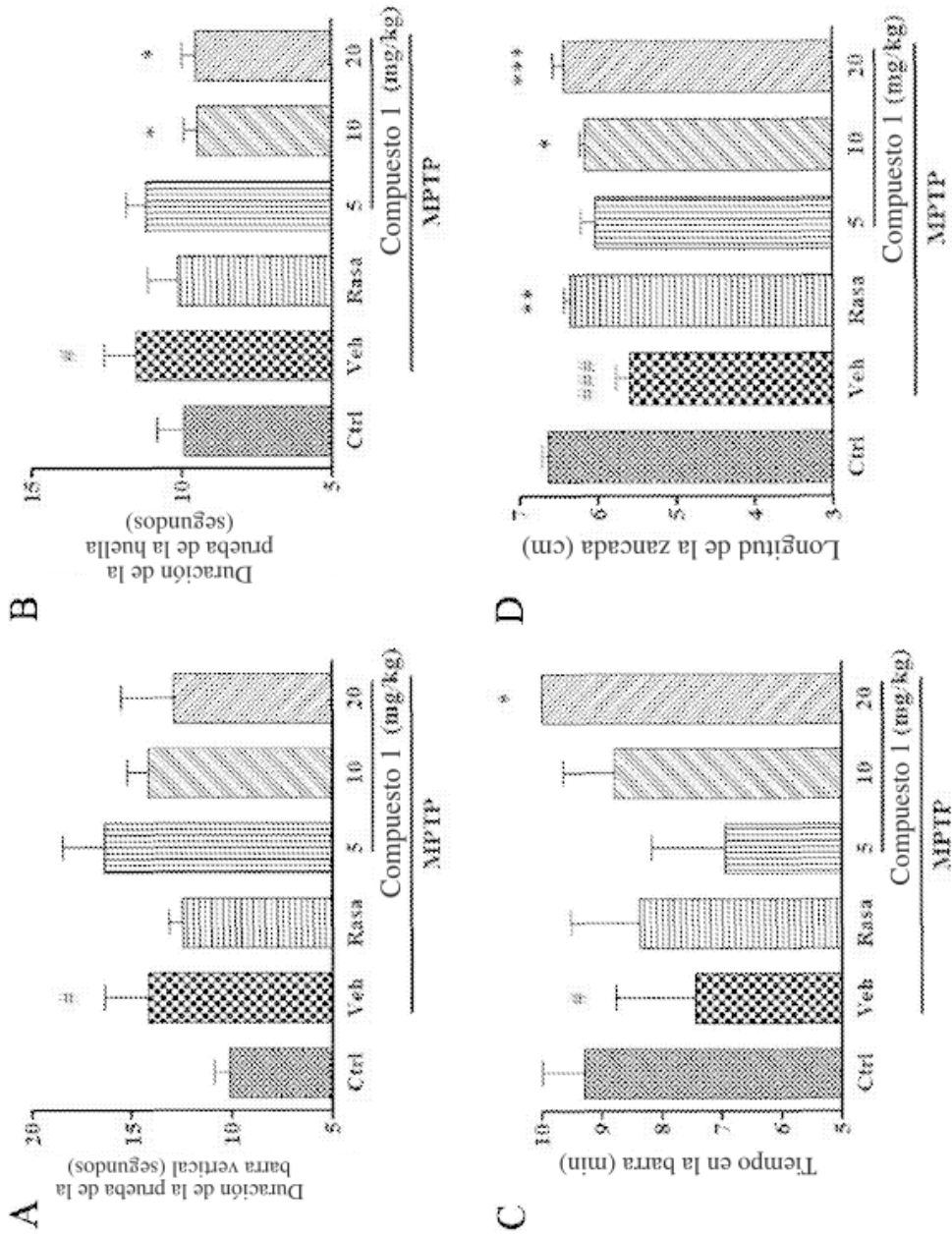


Figura 7

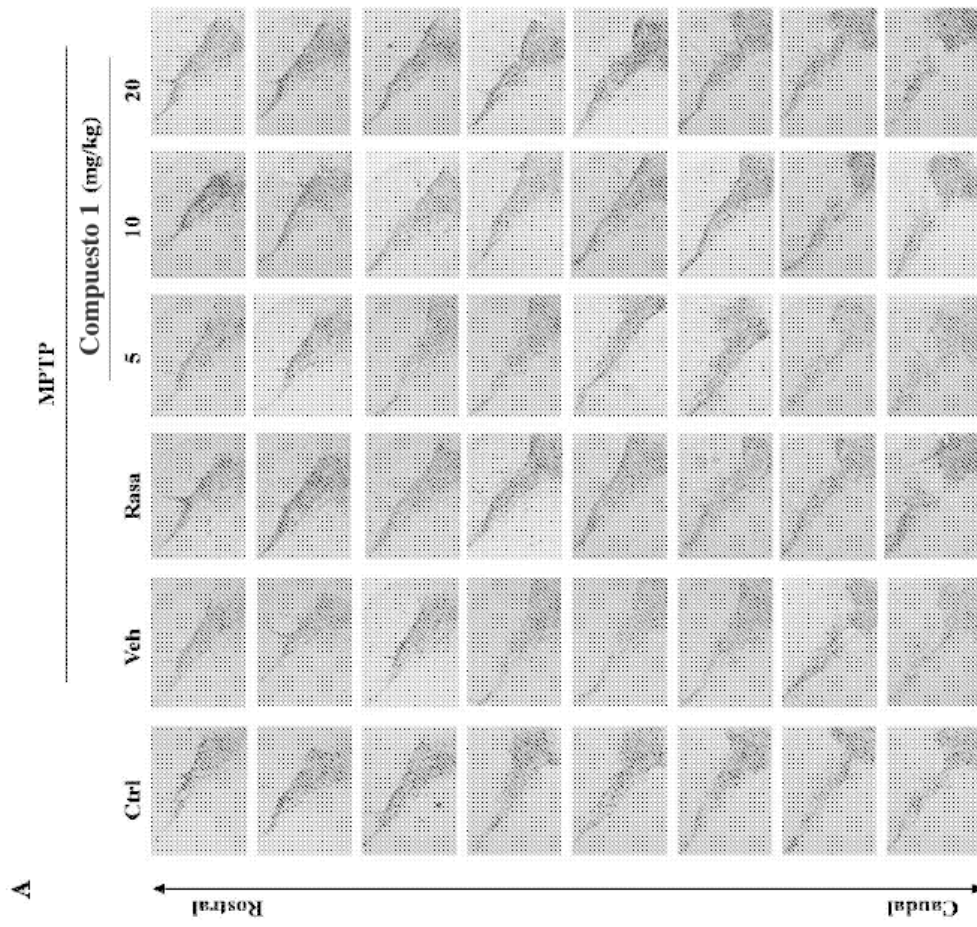
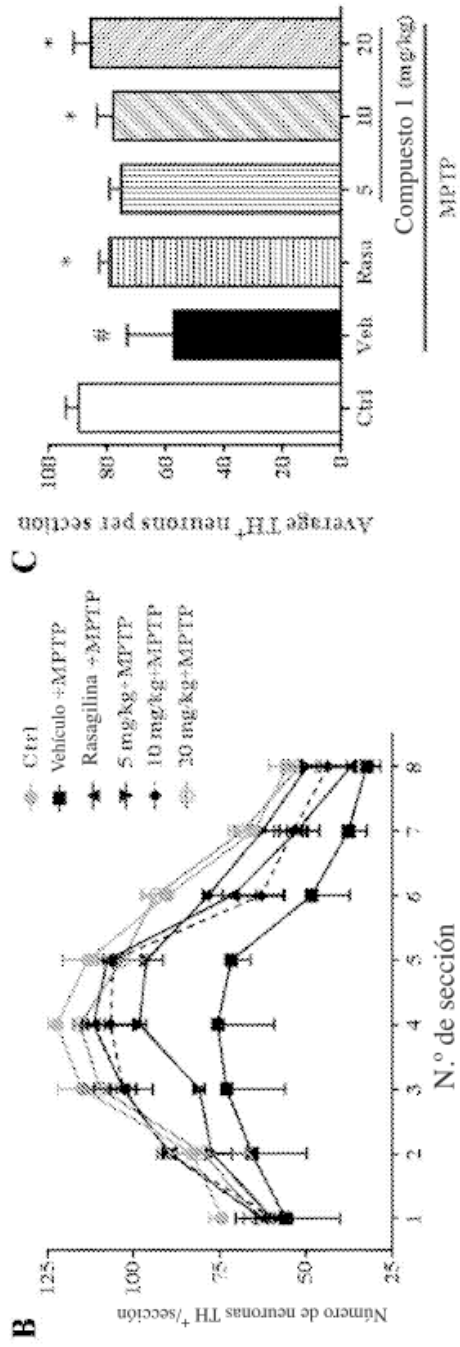


Figura 8A



Figuras 8B y 8C