

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 403**

51 Int. Cl.:

**C07C 39/205** (2006.01)

**C07C 39/215** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61K 31/03** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/AU2012/000482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12149608**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12779889 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022 EP 2709975**

54 Título: **Hidroxiestilbenos prenilados**

30 Prioridad:

**04.05.2011 AU 2011901663**

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

**06.05.2022**

73 Titular/es:

**KYNAN DUKE IP, LLC (100.0%)  
2307 Princess Ann Street  
Greensboro, NC 27408, US**

72 Inventor/es:

**DUKE, COLIN CHARLES;  
TRAN, VAN HOAN y  
DUKE, RUJEE KYOKAJEE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 909 403 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

Hidroxiestilbenos prenilados

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de estilbeno prenilados y al uso de dichos compuestos en el tratamiento de enfermedades y trastornos médicos, por ejemplo, el cáncer y el envejecimiento de la piel.

10 **Antecedentes de la invención**

El propóleo, también conocido como pegamento de las abejas, es una sustancia resinosa compleja recolectada por las abejas obreras (*Apis mellifera*) de los exudados y secreciones de los tallos y brotes tiernos de ciertos árboles y arbustos. Las abejas lo utilizan para sellar las grietas y agujeros en sus panales y protegerlos contra las infecciones microbianas.

El propóleo es una rica fuente de sustancias bioactivas y su uso medicinal se remonta a las civilizaciones antiguas. En la actualidad, el propóleo se encuentra ampliamente disponible como producto natural para la salud y se utiliza ampliamente en cosmética. Sin embargo, su uso en la medicina moderna es limitado, en gran medida debido a la gran variación de composición química que surge debido a que las abejas melíferas lo recolectan de diferentes fuentes vegetales o de una mezcla de las mismas. La composición del propóleo depende de la flora circundante a la que acceden las abejas y por tanto, las diferencias en la flora pueden causar diferencias en las composiciones del propóleo. Por ejemplo, se sabe que los flavonoides son los principios activos farmacológicos principales presentes en el propóleo europeo, las benzofenonas polipreniladas son las sustancias principales en el propóleo cubano y venezolano y los derivados del ácido cinámico prenilados son predominantes en el propóleo brasileño.

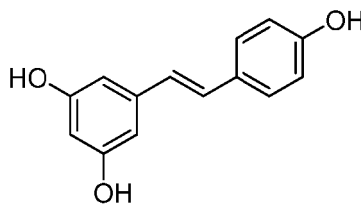
El reconocimiento del origen botánico del propóleo producido por las abejas melíferas permite situar las colmenas en ubicaciones favorables, de tal forma que puede producirse propóleo de una sola fuente botánica, posibilitando la fabricación de medicinas de alta calidad y eficacia.

Las características medicinales únicas del propóleo se determina por la capacidad de recolección selectiva de las abejas melíferas, ya que pueden reconocer los materiales naturales que son relativamente no polares y que tienen propiedades antibióticas. Como ya se ha indicado, la fuente común del propóleo es los exudados foliares y florales de los brotes, que tienen un carácter altamente antibiótico para proteger el delicado tejido vegetal en crecimiento frente al ataque de microorganismos. También se ha informado de que las abejas melíferas recogen los exudados de tejidos vegetales heridos o enfermos. Dichas fuentes son potencialmente ricas en sustancias antibióticas producidas por las plantas en respuesta a lesiones o ataques de insectos, microorganismos y virus.

En estudios anteriores no se ha esclarecido si las abejas simplemente recolectan un material vegetal conocido como propóleo o si se produce una modificación o adición metabólica por parte de las abejas. Sin embargo, no parece haber pruebas de que haya una cantidad significativa de material añadido proveniente de las abejas o pruebas sólidas de transformación metabólica.

Por consiguiente, es necesario conocer mejor la composición del propóleo en zonas geográficas específicas para que sea posible utilizarlo aprovechando todos sus beneficios.

En los trabajos que han dado lugar a la presente invención, los inventores realizaron un análisis prospectivo de muestras de propóleo aisladas de la Isla de los Canguros (Australia del sur) y sorprendentemente, descubrieron que a diferencia de otros propóleos que normalmente contienen flavonoides como constituyentes activos, el propóleo de la Isla de los Canguros contiene estilbenos, más concretamente nuevos polihidroxiestilbenos prenilados (pPHOS) que tienen una estructura central similar al resveratrol (representado a continuación).



**Resveratrol**

El resveratrol es el constituyente del vino tinto que se cree que facilita la baja incidencia de infartos entre los franceses, a pesar del elevado consumo de comidas fuertes. De hecho, se ha demostrado que el resveratrol inhibe la oxidación de las LDL, que causan la aterosclerosis y la cardiopatía coronaria. El resveratrol es también un compuesto importante en la medicina preventiva anti-envejecimiento y también se ha descubierto que tiene una acción

antineoplásica y antioxidante.

Sin embargo, a pesar de sus propiedades terapéuticas, el resveratrol muestra una muy baja biodisponibilidad oral y se metaboliza rápidamente en el intestino e hígado, produciéndose conjugados con glucuronato y sulfato. La eficacia *in vivo* del resveratrol solo se observa a concentraciones elevadas (hasta 5 g) o en el caso de la administración directa, tal como la administración intravenosa o local.

Recientemente, GlaxoSmithKline (GSK) Pharmaceutical realizó ensayos clínicos de fase IIa de su formulación patentada de resveratrol (3-5 g), SRT501 en el tratamiento del mieloma múltiple; sin embargo, se detuvieron los ensayos ya que la formulación ofrecía una eficacia mínima y varios pacientes en el ensayo desarrollaron insuficiencia renal.

Los derivados de resveratrol procedentes del cacahuete han mostrado actividad antineoplásica (CHENG-PO HUANG *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 58 (2010) 12123-12129) y propiedades antiinflamatorias (BANKIM PATEL *et al.*, *Phytotherapy Research*, 19 (2005) 552-555 y documento CN 1566054 A). Ciertos estilbenoides prenilados del cacahuete, como la araquidina-1 y la araquidina-3 han mostrado actividades antineoplásicas particularmente elevadas (VICTORS. SOBOLEV *et al.*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (2011) 1673-1682) además de las actividades antifúngicas y antiinflamatorias (SIRACUSA, L. *et al.*, *Fitoterapia*, 82 (2011) 546-556). También se ha demostrado que el piceatanol muestra altas propiedades antiinflamatorias (BAMBANG DJOKO *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 2376-2383).

Se conocen las propiedades antiangiogénicas de otros análogos del resveratrol (documento GB2411353) y para el tratamiento de la inflamación (documento JP 07/017859) y del envejecimiento de la piel (documento WO 03/009807). Es conocido el uso de derivados de estilbeno en composiciones cosméticas, en particular para el tratamiento de la hiperpigmentación (documento WO 03/010121).

Se ha notificado la presencia de hidroxiestilbenos prenilados en plantas, principalmente de las familias de las moráceas (familia de las moreras, incluidas *Morus alba* (mora) y varias especies de *Artocarpus*) y las fabáceas (familia de las leguminosas, incluidas *Arachis hypogaea* (cacahuete) y *Glycyrrhiza*, Genjiro Kusano *et al.*, *Natural Medicines* (2002) 29-135.). Otra fuentes incluyen *B. papyrifera* (US 2003/0125377). Según se ha informado, los compuestos aislados mostraron actividades antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes, lo que sugiere que el grupo prenilo no afecta negativamente a las actividades biológicas de los hidroxiestilbenos. Se ha demostrado que los hidroxiestilbenos prenilados muestran actividad antineoplásica (compuestos 95 y 96, FUKAI T *et al.*, *Anticancer Research*, 20 (2000) 2525-2536). Además, los compuestos ES32 y ES33 divulgados en el documento WO 2009/012910 se identifican como tratamientos para el cáncer y la inflamación.

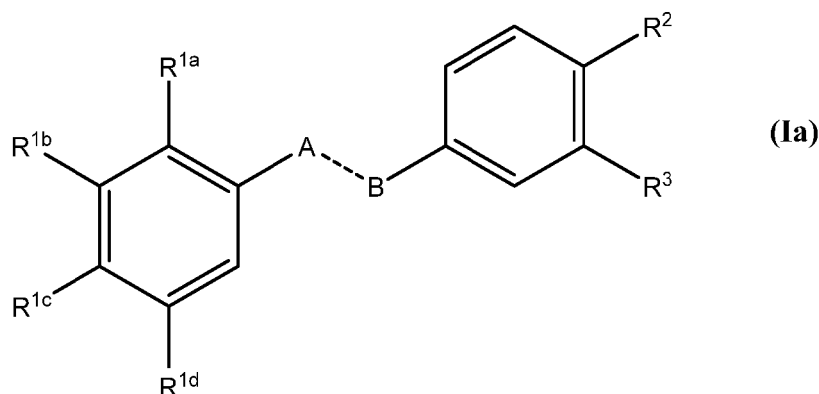
De hecho, los hidroxiestilbenos prenilados pueden evitar el problema de la baja disponibilidad de los hidroxiestilbenos, como el resveratrol, debido a su naturaleza lipófila. Dada la presencia de uno o más grupos prenilo, los compuestos pueden tener la capacidad de atravesar más fácilmente las membranas celulares y puede evitarse la formación de conjugados con glucuronato y sulfato, lo que mejoraría la biodisponibilidad de los compuestos y en general representarían candidatos farmacológicos superiores para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Anteriormente, se había demostrado que el derivado de tetrametoxi del resveratrol tenía la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica en ratas más fácilmente que el resveratrol.

Por consiguiente, los nuevos derivados de pPHOS aislados de las muestras de propóleo de la Isla de los Canguros son prometedores candidatos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

## Sumario de la invención

Durante los estudios que desembocaron en la presente invención, los inventores han aislado y sintetizado diversos nuevos derivados de polihidroxiestilbenos prenilados (pPHOS) y llevaron a cabo experimentos *in vitro* en los que estos nuevos compuestos han mostrado una elevada potencia y selectividad en un conjunto de líneas celulares de cáncer, en particular en líneas celulares de leucemia y melanoma. En otros experimentos preliminares, se observó que una serie de los nuevos derivados de pPHOS modulan la actividad de la enzima SIRT1, lo que indica que los nuevos compuestos de pPHOS de la presente invención pueden dar lugar a agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (Ia)



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 5  $R^{1a}$  se selecciona entre  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
 $R^{1b}$  se selecciona entre H, OH,  $OR^4$ ,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
10  $R^{1c}$  se selecciona entre H, OH,  $OR^{4a}$ ,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
 $R^{1d}$  se selecciona entre H, OH,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
en donde al menos uno de  $R^{1b-1d}$  es OH;  
 $R^2$  se selecciona entre OH,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
15  $R^3$  se selecciona entre OH,  $OR^4$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$ , u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;  
 $R^4$  se selecciona entre, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo o bencilo;  
 $R^{4a}$  se selecciona entre etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo o bencilo;  
y A---B se selecciona entre  $CH=CH$ ,  $CH=CHX$  o  $-CH_2-CH_2X$ , donde  $X=(CH_2)_pCH_2$  y p es un número entero  
20 seleccionado entre el grupo que consiste en 0, 1, 2 o 3.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ia) de acuerdo con el primer aspecto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (Ia) de acuerdo con el primer aspecto o una composición farmacéutica del mismo de acuerdo con el segundo aspecto, para su uso en el tratamiento del cáncer, la inmunosupresión, la inflamación, una infección bacteriana, una infección fúngica o el envejecimiento de la piel.

### Descripción de las realizaciones preferentes de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva se entenderá que la palabra "comprenden" y sus variaciones, tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas indicado, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Aunque es posible que, para su uso en un tratamiento, puede administrarse en forma del compuesto químico en bruto una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos como se definen en el presente documento o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; en un aspecto de la presente invención el principio activo se presenta como una composición farmacéutica. Por consiguiente, en una realización adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ia) de acuerdo con el primer aspecto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclado con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los portadores, diluyentes o excipientes han de ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

Cuando corresponda, los compuestos de la presente invención, incluidos los compuestos de fórmula (Ia) pueden estar en forma de y/o pueden administrarse como una sal farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que son toxicológicamente seguras para la administración sistémica. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse entre sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, entre otros, sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y

similares, así como cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina, entre otros, pero sin limitación, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, trietanolamina y similares.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente o sustancia encapsulante sólida o líquida que puede usarse de manera segura en la administración sistémica. Dependiendo de la vía de administración concreta, pueden usarse diversos portadores bien conocidos en la técnica. Estos portadores o excipientes pueden seleccionarse entre un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y agua despirogenada.

10 Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un compuesto de estequiometría variable formado por un soluto (en la presente invención, un compuesto de fórmula (Ia) o una sal o derivado fisiológicamente funcional del mismo) y un disolvente. Dichos disolventes, para los fines de la invención no pueden interferir con la actividad biológica del soluto. Algunos ejemplos de disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, metanol, etanol y ácido acético. Concretamente, el disolvente utilizado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, agua, etanol, ácido acético, glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos. Un disolvente particular es agua.

20 La administración de los compuestos de fórmula (Ia) puede ser en forma de un "profármaco". Un profármaco es una forma activa de un compuesto que se transforma *in vivo* en la forma activa. Los profármacos adecuados incluyen ésteres, ésteres de fosfonato, etc., de la forma activa del compuesto.

25 Debe entenderse que además de los ingredientes específicamente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión.

Los compuestos de la presente invención pueden ser adecuados para el tratamiento de enfermedades en un paciente humano o animal. En una realización, el paciente es un mamífero, incluido un ser humano, caballo, perro, gato, oveja, vaca o primate. En una realización, el paciente es un ser humano. En una realización adicional, el paciente no es un ser humano.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa aquella cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca, por ejemplo, por un investigador o médico. Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado una mejora en el tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. La expresión también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

40 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la defensa contra o la inhibición de un síntoma, el tratamiento de un síntoma, el retraso de la aparición de un síntoma, la reducción de la gravedad del desarrollo de un síntoma y/o la reducción del número o el tipo de síntomas que padece un individuo, en comparación con no administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención. El término tratamiento abarca el uso en un contexto paliativo.

45 Los expertos en la materia apreciarán que al preparar los compuestos de la invención puede ser necesario y/o deseable proteger a uno o más grupos sensibles en la molécula para prevenir efectos secundarios no deseables. Los grupos protectores adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención son de sobra conocidos para los expertos en la materia y pueden usarse de manera convencional. Véase, por ejemplo, "Protective groups in organic synthesis" por T. W. Greene y P. G. M. Wuts (John Wiley & sons 1991) o "Protecting Groups" por P.J. Kocienski (Georg Thieme Verlag 1994). Algunos ejemplos de grupos protectores de amino adecuados incluyen grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos protectores de tipo uretano aromáticos (por ejemplo, benciloxycarbonilo (Cbz) y Cbz sustituido), grupos protectores de uretano alifáticos (por ejemplo, 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), t-butiloxycarbonilo (Boc), isopropiloxycarbonilo, ciclohexiloxycarbonilo) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, bencilo, tritilo, clorotritilo).

De acuerdo con el tercer aspecto de la invención, los cánceres a tratar son leucemia, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata o cáncer de mama. Lo más preferentemente, el cáncer que se va a tratar es leucemia o melanoma.

60 El efecto antitumoral de los compuestos de la presente invención puede aplicarse como una terapia única o puede implicar, además, una o más sustancias y/o tratamientos diferentes. Dicho tratamiento conjunto puede lograrse mediante la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. En el campo de la oncología médica, es práctica normal usar una combinación de diferentes formas de tratamiento para tratar a cada paciente con cáncer tal como una combinación de cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. En particular, se sabe que la irradiación o el tratamiento con agentes antiangiogénicos y/o reductores de la permeabilidad vascular

puede mejorar la cantidad de tejido hipóxico dentro de un tumor. Por tanto, la eficacia de los compuestos de la presente invención puede mejorar mediante el tratamiento conjunto con radioterapia y/o con un agente antiangiogénico.

Los componentes individuales de dichas combinaciones se pueden administrar por separado en momentos diferentes durante el transcurso de la terapia o de manera concurrente en formas de combinación divididas o individuales. Por lo tanto, se entiende que la presente invención abarca todos estos regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término "administrar" se debe interpretar en consecuencia. Se entenderá que el alcance de las combinaciones de los compuestos de la presente invención con otros agentes antineoplásicos incluye, en principio, cualquier combinación con cualquier composición farmacéutica útil para el tratamiento del cáncer.

Cuando se combinan en la misma formulación, se apreciará que los dos compuestos deben ser estables y compatibles entre sí y los otros componentes de la formulación y pueden formularse para administración. Cuando se formulan por separado, pueden proporcionarse en cualquier formulación conveniente, idealmente de un modo que sea conocido en la técnica para dichos compuestos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral (incluida bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluida la bucal, sublingual o transdérmica) o vaginal o parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, cremas o preparaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones orales o parenterales estériles. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, asociando el principio activo con los portadores o excipientes. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden prepararse como gránulos, comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico adecuados para administración oral y formulaciones de liberación retardada.

Cuando se usa un compuesto en combinación con un segundo agente terapéutico activo contra la misma enfermedad, la dosis de cada compuesto puede ser diferente a cuando el compuesto se usa solo. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente las dosis adecuadas.

De acuerdo con el primer aspecto, en realizaciones preferidas de la invención, dos o más de  $R^{1b-1d}$  son H. En otras realizaciones preferidas, uno de  $R^{1b-1d}$  es H y en otras realizaciones, ninguno de  $R^{1b-1d}$  son H.

En una realización preferida, al menos uno de  $R^{1a-1d}$  es  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , y en otra realización preferida, al menos uno de  $R^{1a-1d}$  es  $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ .

En ciertas realizaciones, al menos dos de  $R^{1b-1d}$  son OH.

En otra realización, al menos uno de  $R^{1b-1c}$  es  $\text{OR}^4$  u  $\text{OR}^{4a}$  y  $R^4$  es metilo o bencilo y en otra realización más,  $R^{4a}$  es bencilo.

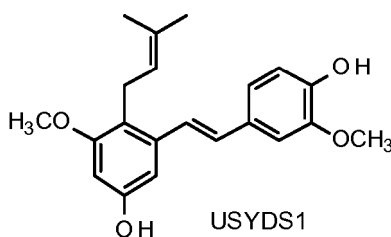
En realizaciones preferidas de la invención de acuerdo con el primer aspecto, al menos uno de  $R^2$  o  $R^3$  es hidroxilo. En otra realización preferida, tanto  $R^2$  como  $R^3$  son hidroxilo.

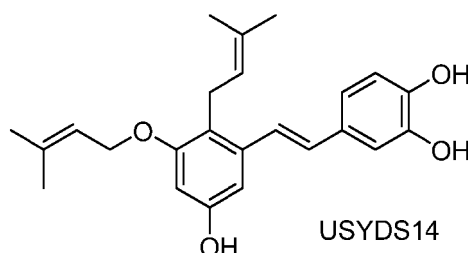
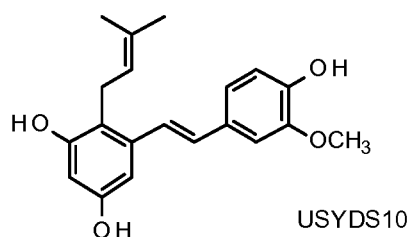
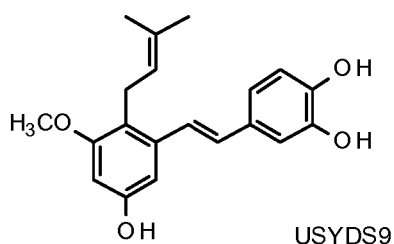
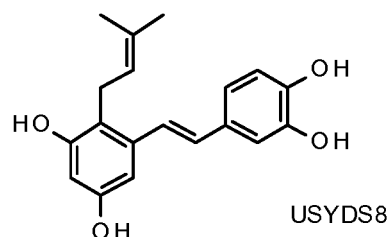
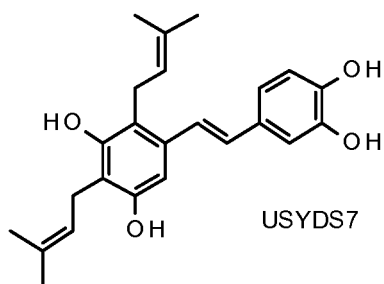
En otra realización,  $R^3$  es  $\text{OR}^4$  y  $R^4$  es metilo y en otra realización más,  $R^4$  es bencilo.

En realizaciones preferidas de la invención, el grupo A---B en la fórmula (Ia) es  $\text{CH}=\text{CH}$  o  $\text{CH}=\text{CHX}$ -, donde  $\text{X}=(\text{CH}_2)_p\text{CH}_2$ , y p es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 0, 1, 2 o 3.

En otras realizaciones de la invención, el grupo A---B en la fórmula (Ia) es  $\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{X}$ , donde  $\text{X}=(\text{CH}_2)_p\text{CH}_2$ , y p es independientemente un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 0, 1, 2 o 3.

Preferentemente, el compuesto de acuerdo con el primer aspecto o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en:





5

En los ensayos *in vitro* preliminares para determinar la actividad antineoplásica de los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados, los inventores observaron la inhibición dependiente de la estructura del crecimiento de células cancerosas para todos los derivados, USYDS1, USYDS7 a USYDS10, USYDS14 y el ejemplo comparativo USYDS2. La mayoría de estos compuestos, mostraron una potente inhibición de prácticamente todas las líneas celulares de leucemia (CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR). En algunas líneas celulares, la proliferación se inhibió a concentraciones nanomolares. USYDS1 mostró la actividad más potente, seguido de USYDS10, USYDS9, el ejemplo comparativo USYDS2 y después USYDS14 en la inhibición de la proliferación de células cancerosas. También se ha observado inhibición dependiente de la estructura de la proliferación de células cancerosas para los derivados USYDS10 y 14. Un estudio de estructura-actividad muestra que la C-prenilación en la posición 2 con el grupo metoxi en la posición 3 muestra la mayor potencia frente a la inhibición de las células cancerosas.

La mayoría de los pTHOS en este estudio tienen estructuras construidas a partir de la estructura del piceatannol, un compuesto de origen natural conocido, que muestra un amplio espectro de actividad biológica. En la actualidad, está atrayendo atención por sus propiedades antineoplásicas, debido a su capacidad para inhibir la proliferación de una gran variedad de células tumorales, entre las que se incluyen de leucemia, linfoma; cánceres de mama, próstata, colon y melanoma. Se ha sugerido que sus efectos antineoplásicos están mediados por la detención del ciclo celular; la regulación por aumento de Bid, Bax, Bik, Bok, Fas; P21WAF1, la regulación por reducción de Bcl-xL; BCL-2, cIAP, la activación de las caspasas, la pérdida de potencial mitocondrial y la liberación de citocromo C. También se ha demostrado que el piceatannol inhibe la activación de algunos factores de transcripción, incluida la señalización de NF- $\kappa$ B, que desempeña una función crucial en la respuesta al estrés celular causado por los radicales libres, la radiación ultravioleta, las citocinas o los antígenos microbianos, JAK-1, un factor de transcripción clave en la vía de STAT que controla las actividades celulares en respuesta a las citocinas extracelulares.

Se ha observado que el pTHOS descrito en este estudio muestra un espectro de actividad biológica similar a la mostrada por el piceatannol. Además, el pTHOS (es decir, USYDS1, valores de  $IC_{50}$ : 0,02  $\mu$ M - 5  $\mu$ M) mostró una potencia aproximadamente 250 veces mayor que el piceatannol (valores de  $CI_{50}$ : 5  $\mu$ M - 100  $\mu$ M) en la inhibición de la proliferación de prácticamente todos los tipos de células tumorales. Por lo tanto, el pTHOS presente en esta solicitud será un candidato principal atractivo para la investigación y desarrollo farmacéutico y como herramienta biológica para entender mejor la fisiopatología del cáncer.

La potente citotoxicidad del compuesto USYDS1 y el compuesto del ejemplo comparativo USYDS2 puede explicarse

en términos de su hidrofobia aumentada, demostrada mediante sus valores de coeficiente de partición log calculados (Log P). USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2 tienen valores de Log P de prácticamente el doble que el hidroxiestilbeno resveratrol. Los efectos de Log P en los compuestos terapéuticos se refieren principalmente a la penetración y distribución en tejidos. Unos mayores valores de Log P permitirán que los compuestos atraviesen más fácilmente las membranas celulares y entren en las células.

En otros experimentos preliminares, se observó que algunos ejemplos concretos de derivados de hidroxiestilbeno prenilados muestran una inhibición dependiente de la concentración de la enzima SIRT1, un miembro de la familia de proteínas sirtuina (proteínas reguladoras de la información silenciosa dos, Sir 2).

Las sirtuinas han surgido como reguladores clave para el envejecimiento y la longevidad en organismos modelo. Los estudios acerca de la genética y la fisiología de las sirtuinas han demostrado que esta familia de enzimas desempeña un papel en diversos procesos celulares, incluido el silenciamiento génico, la muerte celular, el metabolismo de los ácidos grasos, la protección neuronal y la prolongación del tiempo de vida.

Sin desear quedar ligados a una teoría concreta, se propone que la modulación de la actividad de SIRT1 podría dar lugar al desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, entre las que se incluyen cáncer, síndrome metabólico, obesidad, trastornos neurodegenerativos y enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

## Breve descripción de las figuras

La **figura 1** es una colección de algunos de los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados sintetizados y aislados.

La **figura 2** es un esquema que resume la síntesis de los nuevos derivados de polihidroxiestilbenos O y C-prenilados.

La **figura 3** muestra las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la proliferación de células cancerosas humanas, para diversas líneas celulares, con el compuesto USYDS 1.

La **figura 4** muestra las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la proliferación de células cancerosas humanas, para diversas líneas celulares, con el compuesto del ejemplo comparativo USYDS2.

La **figura 5** muestra las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la proliferación de células cancerosas humanas, para diversas líneas celulares, con el compuesto USYDS9.

La **figura 6** muestra las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de la proliferación de células cancerosas humanas, para diversas líneas celulares, con el compuesto USYDS7.

La **figura 7** representa gráficamente el efecto de los compuestos de estilbeno en la depuración de radicales libres.

La **figura 8** representa gráficamente la inhibición dependiente de la concentración de la enzima desacetilasa sirtuina-2 (SIRT1) dependiente de NAD mediante los compuestos de estilbeno.

## Modos para llevar a cabo la invención

A fin de entender mejor la naturaleza de la invención, a continuación se describirán del siguiente modo una serie de ejemplos:

### Materiales

Se capturaron en tubos de plástico abejas melíferas que habían sido observadas recolectando en juncos (*Lepidosperma viscidum*), se cerraron los tubos y se congelaron. Se cortaron y combinaron secciones de las patas traseras de las abejas que sostenían el propóleo. Se recogieron resinas de las plantas y se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Se obtuvieron muestras de plantas y se secaron a 40 °C en una estufa ventilada (Thermoline, NSW Australia) durante una noche para obtener especímenes de muestra para que los identificase un botánico, el Profesor Murray Henwood, John Ray Museum, Universidad de Sydney, Sydney, Australia, y se registraron como *Lepidosperma viscidum* quimiotipo 1a, muestra número Duke 100222-42 y *Lepidosperma viscidum* quimiotipo 2a, muestra número Duke 100221-21.

Para recoger muestras de propóleo se utilizaron 76 colmenas formadas por 3 cajas de 10 bastidores, cada una equipada con una estera de propóleo bajo la tapa de la colmena. Las colmenas numeradas individualmente se utilizaron en los colmenares ubicados en la región central del sur de la Isla de los Canguros.

Se adquirieron de Merck láminas para cromatografía en capa fina recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> y gel de sílice 60H para la cromatografía en columna corta en fase normal (NPSCC). Las placas de TLC se visualizaron con una lámpara de luz mineral UVGL-58, multibanda UV-254/366.



Todos los reactivos utilizados en el aislamiento y la síntesis, incluidos los disolventes para RMN deuterados, tales como cloroformo-*d* y metanol-*d*<sub>4</sub>, dimetilsulfóxido deuterado (d<sub>6</sub>-dimetilsulfóxido) se adquirieron de Sigma-Aldrich Pty Ltd (Castle Hill, NSW, Australia). Los disolventes, incluido el hexano, diclorometano, acetato de etilo, isopropanol, etanol, metanol y ácido acético eran de calidad analítica y se compraron a Ajax Fine Chem, Taren Point, NSW, Australia, o a Asia Pacific Specialty Chemical Ltd (APS).

Para evaporar la fracción de disolvente se utilizó un evaporador rotatorio Rotavapor modelo R-114 con una temperatura del baño de agua en el intervalo entre 40-60 °C. Se utiliza una bomba de vacío V-700 o una bomba de membrana Vacuubrand MD 4C NT (Vacuubrand GMBH, Wertheim, Alemania) con el controlador de vacío V-800 o V-850. El secado final se realiza con una estufa de vacío Napco 5831 (NAPCO, Salt Lake City, EE. UU.) utilizando una bomba de vacío DirectTorr (Sargent-Welch, Buffalo, EE. UU.).

La HPLC preparativa se realizó en un sistema LC-8A de gradiente preparativo de Shimadzu en una columna de fase inversa (Grace, Alltima C18 5 µm 22 mm DI × 250 mm), con un volumen de inyección de 500 µl, eluyendo con metanol (75 %) y agua a 10 ml/min y detectando a 280 nm con un detector de UV-Vis (Shimadzu SPD-20A). La HPLC analítica se realizó en UFLC de Shimadzu, bomba LC-20AD, automuestreador SIL-20A HT, con una columna Hewlett-Packard, NUCLEOSIL 100C18, 5 µm, 4 mm × 125 mm, volumen de inyección de 20 µl, eluido con metanol-agua-ácido acético (70:29,8:0,2) a 1 ml/min y detectado a 230 nm con un detector UV-Vis (Shimadzu SPD-20A).

Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se realizaron en un sistema Varian 400 MHz con un automuestreador SMS (Palo Alto, California, EE. UU.). Los espectros de RMN se referenciaron al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se obtuvieron en un instrumento ThermoFinnigan TSQ 7000 (sistema de CL-EM/EM) y un sistema de EM/EM de trampa iónica Finnigan Polaris (Finnigan, San Jose, EE. UU.) utilizando un sistema de datos Xcalibur 1.2.

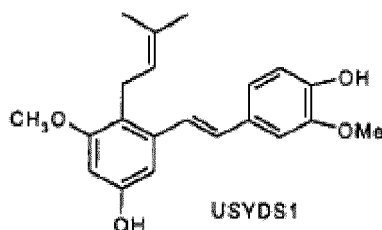
#### *Determinación de los perfiles químicos de RMN <sup>1</sup>H de los especímenes de plantas y propóleo*

Se extrajeron muestras de resina de la base del tallo (0,1 g), las patas traseras de las abejas (0,01 g) y propóleo de las colmenas (1,0 g) con acetato de etilo a temperatura ambiente durante 15 min. Se filtraron los extractos, se secaron a presión reducida y se analizaron mediante RMN <sup>1</sup>H y HPLC. Se observó que las muestras del junco de tipo 1 contenían hidroxiestilbenos prenilados y cinamatos como componentes principales, mientras que las del junco de tipo 2 mostraron únicamente estilbenos prenilados como componentes principales, como se ha comentado anteriormente. Posteriormente se seleccionaron muestras de propóleo para el aislamiento de los componentes.

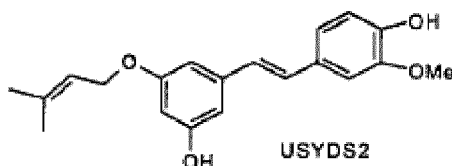
#### **Aislamiento e identificación de polihidroxiestilbenos prenilados de propóleos de la Isla de los Canguros.**

##### Método general

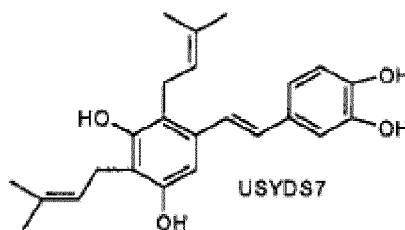
Se extrajo propóleo (10 g) con diclorometano a temperatura ambiente con agitación durante 1 h. El extracto se sometió a purificación utilizando cromatografía en columna corta en fase normal (NPSCC). Se empleó un gradiente escalonado de fase móvil (2 × 100 ml) consistente en diclorometano (DCM) y acetato de etilo (EtOAc) al 0, 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 50 y 100 % para eluir los componentes que se analizaron por TLC y RMN. La purificación posterior de los compuestos, en caso de que fuese necesaria, se llevó a cabo en el mismo NPSCC con diferentes fases móviles consistentes en hexano y EtOAc o hexano e isopropanol. También se empleó la HPLC preparativa en fase normal cuando fue necesario para purificar adicionalmente los compuestos (Shimadzu LC-8A). Los compuestos se eluyeron a través de una columna de sílice (Alltima® sílica 10 µm, 10 cm × 250 cm) con un caudal de 10 ml/min con una fase móvil de isopropanol al 2 % en hexano a temperatura ambiente. La elución de los compuestos se supervisó con un detector UV (UV/Vis SPD-20A) a 280 nm. Las estructuras y la identidad de estos compuestos purificados se caracterizaron mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C que incluía espectrometría de masas de alta resolución. También se llevaron a cabo análisis estructurales detallados del compuesto aislado cuando fue necesario mediante 2D-RMN utilizando Coherencia de Enlace Múltiple Heteronuclear de Gradiente (GHMBC).

**Derivados de polihidroxiestilbeno prenilados aislados:****(E)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-4',5-dihidroxi-3,3'-dimetoxiestilbeno (USYDS1).**

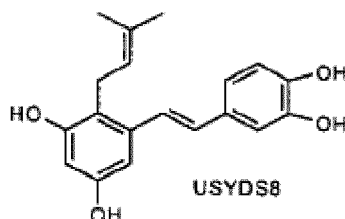
Líquido de color amarillo claro.  $C_{21}H_{24}O_4$  RMN de  $^1H$  (metanol- $d_4$ , 400 MHz):  $T_r$  14,64 min.  $\delta$  7,16 (d,  $J=16$  Hz, H), 7,07 (d,  $J=4$  Hz, H), 6,94 (dd,  $J=8$ , 4 Hz, H), 6,86 (d,  $J=19$  Hz, H), 6,78 (d,  $J=8$  Hz, H), 6,63 (d,  $J=4$  Hz, H), 6,34 (d,  $J=4$  Hz, H), 5,06 (m, H), 3,89 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,39 (m, 2H), 1,80 (s a, 3H), 1,66 (s a, 3H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  158,5, 154,4, 146,7, 145,6, 138,1, 130,6, 130,4, 130,3, 124,3, 123,7, 120,7, 120,6, 114,5, 108,2, 103,9, 98,2, 55,9, 55,7, 25,8, 24,5, 18,0; CL-EM:  $m/z$  339 ( $M-1$ )<sup>-</sup>, HRESIMS:  $m/z$  341,1749 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, calc. 341,1747 para  $C_{21}H_{25}O_4$ .

**Ejemplo comparativo: (E)-3-(3-metil-2-buteniloxi)-4',5-dihidroxi-3'-metoxiestilbeno (EJEMPLO COMPARATIVO USYDS2).**

Líquido de color amarillo claro.  $C_{20}H_{22}O_4$  RMN de  $^1H$  (metanol- $d_4$ , 400 MHz):  $T_r$  15,46 min.  $\delta$  7,12 (d,  $J=4$  Hz, 1H), 7,01 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,97 (dd,  $J=8$ , 4 Hz, 1H), 6,88 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,78 (d,  $J=8$  Hz, 2H), 6,56 (m, 1H), 6,24 (m, 1H), 5,46 (m, 1H), 4,52 (d,  $J=4$  Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 1,79 (s a, 3H), 1,76 (s a, 3H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  160,2, 156,9, 146,7, 145,5, 139,9, 138,6, 129,9, 129,2, 126,2, 120,6, 119,4, 114,7, 108,4, 105,9, 105,4, 101,5, 65,0, 55,9, 25,8, 18,2; CL-EM  $m/z$  325 ( $M-1$ )<sup>-</sup>, HRESIMS  $m/z$  327,15938 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, calc. 327,1591 para  $C_{20}H_{23}O_4$ .

**(E)-2,4-di(3-metil-2-buten-1-il)-3,3',4',5-tetrahidroxiestilbeno (USYDS7).**

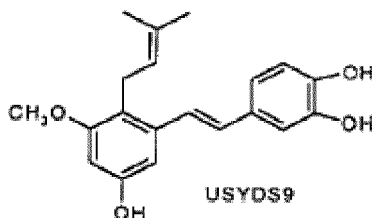
Sólido de color blanquecino.  $C_{24}H_{28}O_4$  RMN de  $^1H$  (metanol- $d_4$ , 400 MHz):  $T_r$  10,46 min.  $\delta$  7,07 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,94 (d,  $J=4$  Hz, 1H), 6,79 (dd,  $J=8$ , 4 Hz, 1H), 6,73 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,71 (d,  $J=8$  Hz, 1H), 6,62 (s, 1H), 5,21 (m, 1H), 5,10 (m, 1H), 3,41 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 1,81 (s a, 3H), 1,78 (s a, 3H), 1,68 (s a, 6H); CL-EM:  $m/z$  379 ( $M-1$ )<sup>-</sup>; HRMS: 379,19148 [ $M-1$ ]<sup>-</sup>, (calculado 379,19092 para  $C_{24}H_{27}O_4$ ).

**(E)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-3,3',4',5-tetrahidroxiestilbeno (USYDS8).**

$C_{19}H_{20}O_4$  RMN  $^1H$  (acetona- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7,07 (d,  $J=2$  Hz, 1H), 7,15 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,89 (dd,  $J=8$ , 2 Hz, 1H), 6,81 (d,  $J=8$  Hz, 1H), 6,80 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 6,63 (d,  $J=2$  Hz, 1H), 6,35 (d,  $J=2$  Hz, 1H), 5,15 (t,  $J=7$  Hz, 1H), 3,42

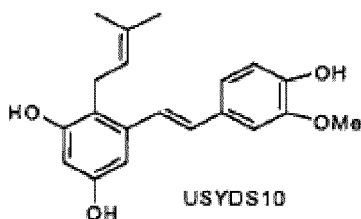
(d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,81 (s, 3H), 1,65 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  155,9, 155,8, 145,4, 145,3, 138,4, 130,1, 129,7, 129,4, 124,5, 123,9, 117,4, 119,0, 115,4, 112,9, 103,4, 101,6, 24,0, 25,0, 17,2. HRESIMS: ( $m/z$ ) 313,1434 ( $M+H$ ) $^+$ , calc. 313,1440 para  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_4$ .

5 **(E)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-3',4',5-trihidroxi-3-metoxiestilbeno (USYDS9).**



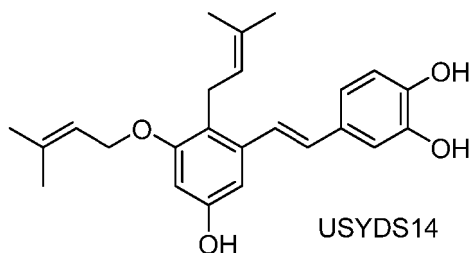
10  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$  RMN  $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  7,16 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 7,07 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,90 (dd,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 6,85 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,82 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6,71 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,39 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 5,09 (1H, t,  $J = 7$  Hz, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,40 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,80 (s, 3H), 1,64 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  158,5, 156,3, 145,3 (2C), 138,0, 130,1, 130,0, 129,6, 123,7, 124,2, 119,1, 118,9, 115,3, 112,9, 103,7, 98,1, 55,0, 25,0, 23,9, 17,2. HRESIMS:  $m/z$  327,1592 ( $M+H$ ) $^+$ , calc. 327,1596 para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4$ .

15 **(E)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-3',4',5-trihidroxi-3'-metoxiestilbeno (USYDS10).**



20  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$  RMN  $^1\text{H}$ : (acetona- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  7,13 (d,  $J = 16$  Hz, 1H) 7,02 (dd,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,92 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6,85 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,66 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,30 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 5,20 (t,  $J = 7$  Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,43 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,75 (s, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  155,4, 154,4, 146,7, 145,7, 138,8, 133,6, 131,2, 130,1, 124,2, 122,5, 120,5, 117,7, 114,6, 108,4, 105,3, 102,5, 55,9, 25,8, 25,1, 18,0. HRESIMS:  $m/z$  349,1411 ( $M+Na$ ) $^+$ , calc. 349,1416 para  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{Na}$ .

25 **(E)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-3-(3-metil-2-buteniloxi)-3',4',5-trihidroxiestilbeno (USYDS14).**



30 Sólido incoloro, rendimiento de 12 mg. IEN-EM:  $m/z$  379 [ $M - 1$ ] $^-$ , RMN  $^1\text{H}$  (metanol- $d_4$  400 MHz):  $\delta$  7,07 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,96 (d,  $J = 4$  Hz, 1H), 6,80 (dd,  $J = 8, 4$  Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,74 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6,61 (d,  $J = 4$  Hz, 1H), 6,32 (d,  $J = 4$  Hz, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 4,48 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 1,78 (m, 6H), 1,75 (m, 3H), 1,66 (m, 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  16,75, 16,80, 23,84, 24,45, 24,54, 64,86, 99,04, 103,41, 112,39, 114,96, 118,71, 119,14, 120,14, 123,54, 123,97, 129,51, 129,70, 130,01, 136,78, 137,95, 145,08, 145,09, 155,59, 157,47. HRMS: 379,19148 [ $M - 1$ ] $^-$ , (calculado 379,19092 para  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_4$ ).

35 **Modificación química y síntesis de los polihidroxiestilbenos prenilados**

**A. Síntesis de los polihidroxiestilbenos prenilados**

40 **1. Preparación del éster metílico del ácido 3,5-dihidroxibenzoico (1)**

A una solución de ácido 3,5-dihidroxibenzoico (10 g, 64,9 mmol) en metanol anhidro (150 ml) se le añadió gota a gota cloruro de acetilo (2 ml, 28,1 mmol). La mezcla se calentó a reflujo en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 17 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml), después se lavó con hidrogenocarbonato de sodio saturado (3 × 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 × 100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío, obteniéndose **1** en forma de un sólido incoloro (9,80 g, 90 %): mp 167-168 °C (lit.<sup>1</sup> mp 168-169 °C); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ 8,66 (s, 2H), 7,00 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 6,59 (t, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H).

## 2. Preparación del éster metílico del ácido 3-hidroxi-5-benciloxibenzoico (2)

A una suspensión de NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 3,3 g, 137,3 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (DMF) (100 ml) se le añadió una solución de **1** (10 g, 59,5 mmol) en DMF anhidra (30 ml) a 0 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>, seguido de la adición gota a gota de bromuro de bencilo (6,4 ml, 53,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se inactivó con agua fría (50 ml), se acidificó con HCl 1 M frío (20 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 × 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 × 50 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El producto se purificó utilizando NPSCC usando un gradiente por etapas que consistía en cloroformo/etanol, obteniéndose **2** en forma de un sólido de color blanquecino (4,5 g, 60 %): mp 97-98 °C (lit.<sup>3</sup> mp 98 °C); C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,01 (s, 1H), 7,43-7,33 (m, 5H), 7,24 (dd, *J* = 2,0, 1,2 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 2,0, 1,2 Hz, 1H), 6,70 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 3,90 (s, 3H).

## 3. Preparación de ácido 3-hidroxi-5-benciloxibenzoico (3)

A una solución de **2** (4,5 g, 16,7 mmol) en metanol (30 ml) se le añadió NaOH 1 M (60 ml, 60 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a 45 °C durante 4 horas en atmósfera de N<sub>2</sub>, seguido de la adición de HCl 1 M (50 ml) para acidificar la solución antes de extraerla con acetato de etilo (3 × 40 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 × 30 ml) y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se evaporó al vacío, obteniéndose **3** en forma de un sólido de color blanquecino (4,02 g, 94 %): mp 196-198 °C; C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ 7,42-7,33 (m, 5H), 7,21 (dd, *J* = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 7,11 (dd, *J* = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 6,68 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H).

## 4. Preparación de ácido 3-hidroxi-5-metoxibenzoico (4).

El compuesto del título se preparó como se ha descrito anteriormente utilizando yoduro de metilo en lugar de bromuro de bencilo, obteniéndose **4** en forma de un sólido de color blanquecino, mp 199-200 °C (lit.<sup>4</sup> mp 199-200 °C); C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>) δ 8,01 (s, 2H), 7,16 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H), 7,13 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H), 6,15 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H).

## 5. Preparación de ácido 3-acetoxi-5-benciloxibenzoico (5)

A la solución de **3** (4,02 g, 17,6 mmol) en anhídrido acético (20 ml, 21,6 mmol) se le añadió piridina (10 %, 0,15 ml, 1,76 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se inactivó con agua (30 ml), se acidificó con HCl 0,1 M (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 40 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 × 30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. El disolvente se evaporó al vacío y se volvió a cristalizar a partir de una mezcla (1:1) de hexano/acetato de etilo, obteniéndose **5** en forma de cristales de color rosado (3,86 g, 96 %): mp 133-134 °C; C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (dd, *J* = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 7,43-7,34 (m, 5H), 6,99 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,1 (s, 2H), 2,32 (s, 3H).

## 6. Preparación de ácido 3-acetoxi-5-metoxibenzoico (6)

El compuesto del título se preparó como se ha descrito en 5. El compuesto **4** se utilizó para obtener **6** en forma de un sólido de color blanquecino: mp 151-153 °C; C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,50 (dd, *J* = 2,0, 1,4 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J* = 2,0, 1,4 Hz, 1H), 6,90 (t, *J* = 2,0 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 2,32 (s, 3H).

## 7. Preparación de 3-metoxi-4-benciloxibenzaldehído (7)

A una suspensión de NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 1,6 g, 66,6 mmol) en DMF anhidra (50 ml) a 0 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> se le añadió vainillina (4-hidroxi-3-metoxi benzaldehído, 4 g, 26,3 mmol) en DMF anhidra (20 ml) lentamente con una jeringa, seguido de la adición gota a gota de bromuro de bencilo (3 ml, 25,2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, se inactivó con agua fría (30 ml), se acidificó con HCl 1 M (15 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 × 40 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 × 30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se secaron a presión reducida, obteniéndose **7** en forma de un aceite incoloro (6 g, 92 %): mp 60-62 °C (lit.<sup>6</sup> mp 61-62 °C); C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,84 (s, 1H), 7,43-7,31 (m, 7H), 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,25 (s, 2H), 3,95 (s, 3H).

## 9. Preparación de 4-etenil-2-metoxi-1-benciloxibenceno (9).

A una suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (6,5 g, 18,2 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF) (15 ml) en

atmósfera de N<sub>2</sub> a 0 °C se le añadió *terc*-butóxido de potasio (2,3 g, 20,5 mmol) y la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de bencil vainillina (**7**) (4 g, 16,5 mmol) en THF anhidro (15 ml) y se agitó durante 2 horas, después se inactivó con agua fría (20 ml), se acidificó con HCl 0,1 M (20 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 × 40 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con cloruro de sodio acuoso al 20 % (20 ml) y después se secaron a presión reducida. El producto se purificó utilizando NPSCC usando una fase móvil por etapas que consistía en hexano/acetato de etilo, obteniéndose **9** en forma de un sólido incoloro (3,37 g, 85 %); mp 53-54 °C (lit.<sup>8</sup> mp 50-51 °C); C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,28 (m, 5H), 6,99 (d, J = 2 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 4, 1 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 4 Hz, 1H), 6,68 (dd, J = 17, 1 Hz, 1H), 5,64 (dd, J = 17, 1 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,14 (d, J = 1 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H).

#### 11. Preparación de **E-1-[3-acetoxi-5-benciloxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (11)**:

A una solución de cloruro de *N,N*-bis(2,6-diisopropil)dihidroimidazolio (0,093 g, 10 %, 0,217 mmol) y Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,048 g, 10 %, 0,217 mmol) en xileno (3 ml) en atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente se le añadió el cloruro ácido de **5** (0,7 g, 2,17 mmol) en 2 ml de xileno, seguido de la adición de 4-etilmorfolina (0,04 ml, 0,316 mmol) y el reactivo **9** (0,627 g, 2,61 mmol) en xileno (3 ml). La mezcla se calentó a 130 °C durante 18-22 horas. El disolvente se evaporó al vacío y el producto se purificó utilizando NPSCC (hexano/acetato de etilo 3:1 como fase móvil) obteniéndose **11** en forma de un aceite de color amarillo (0,33 g, 31,6 %); C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,28 (m, 13H), 7,06 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 17 Hz, 1H), 6,97 (dd, J = 6, 2 Hz, 1H), 6,89 (m, 1H), 6,62 (t, J = 2 Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 2,30 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,39, 159,78, 151,81, 149,79, 148,32, 139,82, 137,00, 136,57, 130,48, 129,78, 128,63 (2C), 128,58 (2C), 128,10, 127,88, 127,55 (2C), 127,24 (2C), 126,02, 119,98, 113,95, 112,02, 110,50, 109,48, 107,28, 71,0, 70,27, 56,02, 21,19; CL-EM *m/z* (%): 481 (M+1)<sup>+</sup>, 503 (M+Na)<sup>+</sup>; HRMS: *m/z* 503,1828 (M+Na)<sup>+</sup>, calc. 503,1834 para C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>Na.

#### 13. Preparación de **E-1-[3-acetoxi-5-metoxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (13)**.

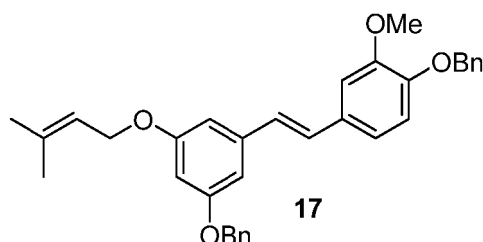
El compuesto del título se preparó como se ha descrito en **11** para condensar el cloruro ácido de **6** con el reactivo **9**, obteniéndose el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino; mp 104-106 °C; C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,30 (m, 8H), 7,07 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,03 (d, J = 16 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 6,90 (d, J = 16 Hz, 1H), 6,88 (m, 1H), 5,18 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 2,31 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,41, 160,58, 151,83, 149,78, 148,31, 139,76, 137,00, 130,49, 129,72, 128,58 (2C), 127,88, 127,24 (2C), 126,07, 119,97, 113,94, 111,73, 109,67, 109,46, 106,54, 71,01, 56,02, 55,50, 21,18; CL-EM *m/z* 405 [M+1]<sup>+</sup>; HRMS *m/z* 405,1695 (M+H)<sup>+</sup>, calc. 405,1702 para C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub>.

#### 14. Preparación de **E-1-[3-hidroxi-5-benciloxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (14)**

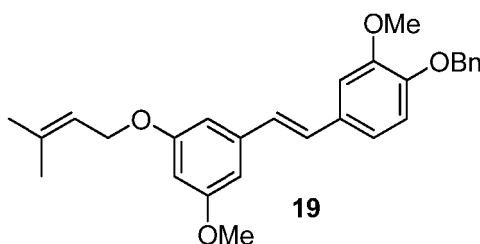
A una solución de estilbeno **11** (0,04 g, 0,083 mmol) en disolvente mixto (MeOH/THF/H<sub>2</sub>O, 3/3/3 ml) se le añadió NaOH (0,02 g, 0,35 mmol) a 0 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La solución se acidificó con HCl 0,1 M (5 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 × 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con cloruro de sodio acuoso al 20 % (10 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron al vacío. El producto se purificó utilizando NPSCC (fase móvil de hexano/acetato de etilo) seguido de recristalización, obteniéndose **14** en forma de un sólido incoloro (0,016 g, 44,5 %); mp 114-115 °C; C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7,45-7,28 (m, 10H), 7,06 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 16 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 16 Hz, 1H), 6,71 (t, J = 2,0 Hz, 1H), 6,59 (t, J = 2 Hz, 1H), 6,38 (t, J = 2 Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 3,95 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 160,29, 156,78, 149,76, 148,19, 139,92, 136,98, 136,84, 130,65, 129,20, 128,61 (2C), 128,57 (2C), 128,02, 127,88, 127,49 (2C), 127,26 (2C), 126,54, 119,94, 113,96, 109,45, 105,97, 105,69, 101,54, 71,02, 70,01, 56,03; CL-EM: 461 (M+Na)<sup>+</sup>, 439 (M+1)<sup>+</sup>; HRMS *m/z* 439,1908 (M+H)<sup>+</sup>, calc. 439,1909 para C<sub>29</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>.

#### 16. Preparación de **E-1-[3-hidroxi-5-metoxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (16)**.

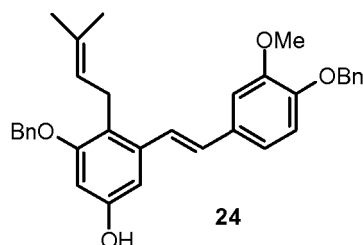
Se llevó a cabo la hidrólisis básica de **13** como se ha descrito para el compuesto **14**, obteniéndose el compuesto del título en forma de un sólido amarillento; mp 110-112 °C; C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,28 (m, 5H), 7,07 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 16 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 8, 2 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 17 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 8 Hz, 1H), 6,62 (t, J = 2 Hz, 1H), 6,57 (t, J = 2 Hz, 1H), 6,31 (t, J = 2 Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,81 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,08, 156,86, 149,73, 148,16, 139,85, 136,96, 130,69, 129,11, 128,57 (2C), 127,90, 127,29 (2C), 126,61, 119,95, 113,97, 109,47, 105,72, 104,73, 100,72, 71,03, 56,03, 55,36; CL-EM, *m/z* 384 (M+Na)<sup>+</sup>, 363 (M+1)<sup>+</sup>; HRMS *m/z* 363,1592 (M+H)<sup>+</sup>, calc. 363,1596 para C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>.

**17. Preparación de *E*-1-[3-(3-metil-2-buteniloxi)-5-benciloxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (17)**

A la suspensión de NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,0051 g, 0,213 mmol) en DMF anhidro (5 ml) en atmósfera de N<sub>2</sub> a 0 °C, se le añadió el estilbena **14** (0,04 g, 0,091 mmol) gota a gota en DMF (3 ml), seguido de la adición gota a gota de bromuro de 3,3-dimetilalilo (0,011 ml, 0,091 mmol).<sup>2</sup> La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2-3 horas, después se inactivó con agua fría (5 ml), se acidificó con HCl 0,1 M enfriado (5 ml) y se extrajo con éter dietílico (3 × 10 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 × 10 ml) y se secaron a presión reducida. El producto se purificó usando NPSCC (hexano/acetato de etilo como fase móvil), obteniéndose **17** en forma de un aceite amarillento (0,02 g, 43,3 %); C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,46-7,28 (m, 10H), 7,07 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6,73 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6,68 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6,48 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 5,52 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 4,52 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 3,95 (s, 3H), 1,80 (d, *J* = 1 Hz, 3H), 1,76 (d, *J* = 1 Hz, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,21, 160,12, 149,78, 148,14, 139,49, 138,35, 137,03, 136,94, 130,76, 128,94, 128,59 (2C), 128,56 (2C), 127,94, 127,86, 127,54 (2C), 127,24 (2C), 126,97, 119,87, 119,53, 113,98, 109,43, 105,38, 105,32, 101,14, 71,01, 70,09, 64,84, 56,03, 25,85, 18,22; CL-EM: *m/z* 529 (M+Na)<sup>+</sup>, 507 (M+1)<sup>+</sup>; HRMS *m/z* 507,2528 (M+H)<sup>+</sup>, calc. 507,2535 para C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>.

**19. Preparación de *E*-1-[3-(3-metil-2-buteniloxi)-5-metoxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (19).**

La prenilación de **16** se llevó a cabo como se ha descrito para el compuesto **17**, obteniéndose el compuesto del título en forma de un cristal blanquecino; mp 66-69 °C; C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,45-7,28 (m, 5H), 7,08 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6,64 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 6,40 (t, *J* = 2 Hz, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,53 (d, *J* = 7 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 1,81 (d, *J* = 1 Hz, 3H), 1,76 (d, *J* = 1 Hz, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,91, 160,23, 149,76, 148,14, 139,46, 138,35, 137,04, 130,78, 128,90, 128,56 (2C), 127,87, 127,25 (2C), 127,02, 119,86, 119,56, 113,98, 109,44, 104,96, 104,49, 100,37, 71,02, 64,82, 56,04, 55,36, 25,86, 18,22; CL-EM: *m/z* 453 (M+Na)<sup>+</sup>; HRMS *m/z* 453,2036 (M+Na)<sup>+</sup>, calc. 453,2042 para C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na.

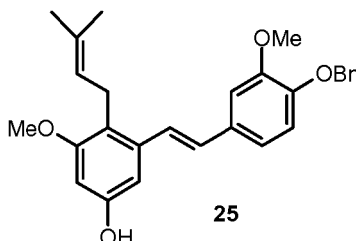
**24. Preparación de *E*-1-[2-(3-metil-2-butenil)-5-hidroxi-3-benciloxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (24)**

A una solución de **17** (0,024 g, 0,061 mmol) en tolueno (30 ml) se le añadió Florisil de malla 100-200 (0,24 g, 10×) y se calentó a 110 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>, durante 4 horas. La mezcla de reacción se filtró, se evaporó al vacío y el residuo de color pardo rojizo se purificó utilizando NPSCC (hexano/acetato de etilo como fase móvil) obteniéndose un sólido de color parduzco (0,014 g, 58,3 %). El producto se recrystalizó a partir de una mezcla de hexano/acetato de etilo (3:1), obteniéndose **24** en forma de un sólido de color blanquecino; mp 145-150 °C; C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,46-7,28 (m, 10H), 7,20 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6,97 (dd, *J* = 8, 2 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6,68 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6,40 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,17 (m, 1H), 5,05

(s, 2H), 4,69 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,48 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,73 (d,  $J = 1$  Hz, 3H), 1,67 (d,  $J = 1$  Hz, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157,60, 154,27, 149,76, 148,08, 138,31, 137,14, 137,04, 131,18, 130,59, 130,35, 128,56 (2C), 128,49 (2C), 127,86, 127,78, 127,23 (2C), 127,21 (2C), 124,74, 123,63, 121,13, 119,85, 113,99, 109,47, 104,31, 99,53, 71,03, 70,29, 55,98, 25,77, 24,69, 18,01.

5

## 25. Preparación de *E*-1-[2-(3-metil-2-butenil)-5-hidroxi-3-metoxifenil]-2-[3-metoxi-4-benciloxifenil]eteno (25).



25

La reordenación de **19** se llevó a cabo como se ha descrito para el compuesto **24**, obteniéndose un sólido de color rosado: mp 161-162 °C;  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_4$  RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,46-7,28 (m, 5H), 7,19 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 7,06 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,97 (dd,  $J = 8, 2$  Hz, 1H), 6,88 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,87 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6,66 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,40 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,13 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,42 (d,  $J = 6$  Hz, 2H), 1,80 (d,  $J = 1$  Hz, 3H), 1,68 (d,  $J = 1$  Hz, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158,56, 154,35, 149,76, 148,07, 138,11, 137,04, 131,21, 130,63, 130,24, 128,56 (2C), 127,86, 127,22 (2C), 124,73, 123,61, 120,78, 119,84, 113,99, 109,42, 103,88, 98,21, 71,03, 55,97, 55,68, 25,77, 24,46, 17,98; CL-EM:  $m/z$  453 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , 431 ( $\text{M}+1$ ) $^+$ ; HREM  $m/z$  431,2217 ( $\text{M}+1$ ) $^+$ , calc. 431,2222 para  $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_4$ .

15

## 26. Preparación de (*E*)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-3,4',5-trihidroxi-3'-metoxi-estilbeno (26, equivalente a USYDS10).

20

A una solución de **24** (0,02 g, 0,035 mmol) en etanol puro (6 ml) se le añadió 1,4-ciclohexadieno (3 ml) y Pd-C (10 %, 0,0035 mmol). La mezcla se agitó en atmósfera de  $\text{N}_2$  y se calentó a 80 °C durante 4 horas. La solución se filtró y se evaporó al vacío, obteniéndose un residuo oleoso que se purificó utilizando NPSCC (hexano/acetato de etilo como fase móvil), seguido de HPLC en fase normal (hexano/isopropanol 2:1 como fase móvil), obteniéndose el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo claro: Datos similares a los de USYDS10.

25

## 27. Preparación de (*E*)-2-(3-metil-2-buten-1-il)-5,4'-dihidroxi-3',3-dimetoxi-estilbeno (27, equivalente a USYDS1).

30

El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito para el compuesto **25**, obteniéndose **27** en forma de un aceite de color amarillo claro;  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4$  RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,17 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 7,01 (dd,  $J = 12, 2$  Hz, 1H), 7,0 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,91 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6,87 (d,  $J = 16$  Hz, 1H), 6,66 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 6,36 (t,  $J = 2$  Hz, 1H), 5,15 (m, 1H), 4,64 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,42 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 1,81 (d,  $J = 1$  Hz, 3H), 1,68 (d,  $J = 1$  Hz, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158,57, 154,37, 146,68, 145,60, 138,18, 130,61, 130,44, 130,27, 124,28, 123,67, 120,73, 120,58, 114,55, 108,26, 103,88, 98,18, 55,88, 55,71, 25,79, 24,48, 17,98; CL-EM:  $m/z$  339 ( $\text{M}-1$ ); HRMS  $m/z$  363,1566 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , calc. 363,1572 para  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$ .

35

## Evaluaciones biológicas de los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados

### 40 1. Actividad antineoplásica de los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados.

**A)** Se evaluó la inhibición de la proliferación celular de dos derivados de polihidroxiestilbeno prenilados, a saber, USYDS1 y USYDS7, como se muestra en las tablas 1 y 2 a continuación, frente a 60 líneas celulares en un intervalo de concentraciones ( $1 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M) en el National Cancer Institute (NCI), EE. UU.

45

*Metodología del cribado del cáncer in vitro: Método general adoptado del NCI*

Las líneas celulares tumorales humanas se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 5 % y L-glutamina 2 mM. En un experimento típico, las células se inocularon en placas de microtitulación de 96 pocillos en 100  $\mu\text{l}$ , con densidades de siembra en el intervalo de 5.000 a 40.000 células/pocillo, dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas celulares individuales. Tras la inoculación de las células, las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C,  $\text{CO}_2$  al 5 %, aire al 95 % y humedad relativa del 100 % durante 24 horas antes de la adición de los fármacos.

50

Después de 24 h, se fijaron *in situ* dos placas de cada línea celular con ácido tricloroacético (TCA), para representar una medida de la población celular de cada línea celular en el momento de la adición del fármaco. Los fármacos experimentales se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 400 veces mayor que la concentración

55

de ensayo máxima y se almacenan congelados antes de su uso. En el momento de la adición del fármaco, se descongeló una alícuota del concentrado congelado y se diluyó a dos veces la concentración de ensayo máxima deseada con medio completo que contenía 50 µg/ml de gentamicina. Se añadieron alícuotas de 100 µl del fármaco en los pocillos de microtitulación adecuados que ya contenían 100 µl de medio, obteniéndose así las concentraciones de fármaco finales deseadas.

Después de la adición del fármaco, las placas se incubaron durante 48 h más a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, 95 % de aire, y humedad relativa del 100 %. Para las células adherentes, el ensayo se terminó mediante la adición de TCA frío. Las células se fijaron *in situ* mediante la adición cuidadosa de 50 µl de TCA frío al 50 % (m/v) (concentración final, TCA al 10 %) y se incubaron durante 60 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las placas se lavaron cinco veces con agua corriente y se secaron al aire. Se añadió a cada pocillo solución de sulforrodamina B (SRB) (100 µl) al 0,4 % (m/v) en ácido acético al 1 % y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se eliminó el colorante no unido lavando cinco veces con ácido acético al 1 % y las placas se secaron al aire. El colorante unido se solubilizó posteriormente con base trizma 10 mM y se leyó la absorbancia en un lector de placas automatizado a una longitud de onda de 515 nm. Para las células en suspensión, la metodología fue la misma, salvo por que el ensayo se terminó fijando las células sedimentadas en el fondo de los pocillos añadiendo cuidadosamente 50 µl de TCA al 80 % (concentración final, TCA al 16 %) y la absorbancia se leyó en un lector de placas automatizado a una longitud de onda de 515 nm. Se calcularon el valor de CI<sub>50</sub> (concentración necesaria para una inhibición del 50 % de la proliferación celular), el valor de TGI (concentración necesaria para una inhibición total de la proliferación celular) y el valor de CL<sub>50</sub> (concentración necesaria para un 50 % de letalidad o muerte celular) para cada uno de USYDS1 y USYDS7 y los resultados se presentan en las tablas 1 y 2 a continuación.

**Tabla 1: Efecto del pPHOS USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2 en la proliferación de células cancerosas humanas.**

Compuestos	USYDS1 (µM)			Ejemplo comparativo USYDS2 (µM)		
Leucemia	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>
CCRF-CEM	0,35	24,6	>100	5,06	>100	>100
HL-60 (TB)	0,02	0,06	68,9	1,34	9,77	>100
K-562	0,04	11,7	>100	0,48	>100	>100
MOLT-4	0,43	12,3	80,2	4,16	28,3	>100
RPMI-8226	0,11	14,8	>100	4,32	52,8	>100
SR	0,04	24,4	>100	0,54	>100	>100
<b>Cáncer de pulmón no microcítico</b>						
A549/ATCC	0,50	11,3	40,3	3,28	13,0	42,1
EKVX	10,8	24,3	54,4	9,04	25,2	66,4
HOP-62	0,44	16,0	42,2	4,44	18,5	43,4
HOP-92	0,06	12,3	39,6	3,98	21,1	60,1
NCI-H226	3,13	13,3	45,6	5,43	19,1	46,4
NCI-H23	0,28	15,1	62,5	2,89	23,6	>100
NCI-H322M	11,8	25,7	55,9	9,64	22,7	52,3
NCI-H460	0,23	1,38	42,0	2,47	10,9	58,7
NCI-H522	0,02	-	44,8	1,14	3,57	14,7
<b>Cáncer de colon</b>						
COLO 205	3,86	16,1	42,6	17,3	31,7	57,9
HCC-2998	1,07	11,5	35,8	4,61	17,3	46,4
HCT-116	0,30	11,1	40,4	2,09	11,9	40,0
HCT-15	0,05	16,1	>100	0,76	17,8	97,3
HT29	4,73	15,3	44,4	17,4	32,2	59,6
KM12	0,32	13,9	46,7	2,09	11,7	45,0
SW-620	0,04	15,1	44,3	0,53	14,0	40,7
<b>Cáncer del SNC</b>						
SF-268	0,25	14,1	50,2	4,50	19,2	51,6
SF-295	0,65	16,2	55,7	3,94	14,7	49,2
SF-539	0,04	14,4	48,6	1,92	13,8	50,2
SNB-19	0,17	19,3	51,5	5,02	20,4	53,6
SNB-75	0,03	20,2	72,0	2,14	10,3	55,8
U251	0,37	10,9	36,0	2,96	14,7	41,0
<b>Melanoma</b>						
LOX IMVI	0,05	16,2	58,8	1,56	19,4	>100
MALME-3M	3,47	25,8	78,3	1,88	26,2	94,9
M14	0,04	13,9	44,0	0,53	15,4	49,4
MDA-MB-435	0,03	13,8	43,0	0,34	11,0	41,3
SK-MEL-2	0,32	10,6	38,0	1,25	9,59	41,6
SK-MEL-28	10,9	23,8	51,7	5,04	19,4	46,7



(continuación)

Compuestos	USYDS1 (µM)			Ejemplo comparativo USYDS2 (µM)		
Leucemia	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>
SK-MEL-5	0,05	0,75	5,99	1,58	11,5	34,3
UACC-257	2,53	17,7	45,4	7,89	20,6	46,0
UACC-62	1,62	18,3	46,6	3,73	15,9	44,6
<b>Cáncer de ovario</b>						
IGROV1	2,65	27,9	>100	5,84	46,7	>100
OVCAR-3	0,26	-	37,3	3,02	10,7	36,1
OVCAR-4	0,58	18,4	52,0	5,34	28,0	>100
OVCAR-5	6,0	21,4	55,3	10,1	24,8	60,9
OVCAR-8	0,08	11,7	50,0	2,80	14,8	44,6
ADR-RES	0,03	-	70,7	0,40	4,95	>100
SK-OV-3	0,19	11,6	34,7	3,69	14,9	38,9
<b>Cáncer renal</b>						
786-0	0,48	14,0	>100	3,55	15,9	98,8
A498	1,84	8,45	32,2	10,3	23,8	55,2
ACHN	0,07	14,0	44,6	3,76	17,5	52,1
CAKI-1	4,77	39,3	>100	6,13	>100	>100
RXF-393	0,03	-	39,1	1,35	5,46	23,6
SN12C	0,99	16,9	54,2	4,02	18,8	60,2
TK-10	4,10	15,7	40,5	4,69	14,3	40,1
UO-31	0,25	16,0	51,3	2,60	16,9	48,9
<b>Cáncer de próstata</b>						
PC-3	0,42	16,1	47,9	3,84	18,7	65,8
DU-145	0,06	12,7	38,6	3,05	12,5	37,8
<b>Cáncer de mama</b>						
MCF7	0,23	13,0	52,9	1,24	15,0	41,0
MDA-MB-231	0,15	2,43	61,2	0,25	2,10	15,7
BT-549						
HS 578T	0,02	-	>100	1,28	10,3	>100
T-47D	0,72	19,8	67,4	5,66	33,6	>100
MDA-MB-468	0,36	8,37	33,2	2,72	9,41	36,8

Tabla 2: Efecto del pPHOS USYDS7 en la proliferación de células cancerosas humanas

Compuesto	USYDS7 (µM)						
Leucemia	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>	Melanoma	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>
CCRF-CEM	2,73	8,48	71,2	LOX IMVI	1,71	3,41	6,81
HL-60 (TB)	2,39	5,06	13,8	MALME-3M	1,97	4,46	10,4
K-562	2,14	4,78	17,4	M14	1,79	3,71	7,73
MOLT-4	2,01	5,19	26,5	MDA-MB-435	2,29	6,47	31,7
RPMI-8226	2,31	6,01	61,1	SK-MEL-2	3,20	7,82	42,9
Cáncer de pulmón no microcítico				SK-MEL-28	3,65	11,8	36,7
A549/ATCC	1,88	4,06	8,78	SK-MEL-5	1,80	3,68	7,54
EKVX	4,25	14,7	44,9	UACC-257	2,18	5,93	23,0
HOP-62	3,67	15,0	51,6	UACC-62	2,80	7,84	31,5
HOP-92	1,52	4,21	14,2	Cáncer de ovario			
NCI-H226	2,28	6,24	28,1	IGROV1	3,12	8,39	36,7
NCI-H23	1,81	5,22	29,5	OVCAR-3	1,82	3,36	6,19
NCI-H322M	5,29	18,1	44,7	OVCAR-4	2,85	11,1	66,8
NCI-H460	1,64	3,22	6,33	OVCAR-5	3,04	11,6	39,0
NCI-H522	1,61	3,57	7,92	OVCAR-8	1,68	3,65	7,95
Cáncer de colon				ADR-RES	2,23	7,90	42,4
COLO 205	1,79	4,34	12,2	SK-OV-3	5,98	19,4	46,5
HCC-2998	1,95	4,26	9,34	Cáncer renal			
HCT-116	1,57	3,02	5,82	786-0	1,99	4,47	10,2
HCT-15	1,29	3,78	22,0	A498	11,1	23,8	50,8
HT29	3,64	10,8	45,8	ACHN	2,58	9,12	37,6
KM12	1,93	3,88	7,79	CAKI-1	4,24	16,2	49,0
SW-620	1,58	3,19	6,42	RXF-393	1,53	3,23	6,80
Cáncer del SNC				SN12C	1,65	3,16	6,03
SF-268	2,26	5,47	22,7	TK-10	3,62	11,2	34,3
SF-295	3,37	11,4	44,6	UO-31	1,60	3,46	7,46

(continuación)

Compuesto	USYDS7 (µM)						
Leucemia	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>	Melanoma	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>
SF-539	2,21	6,14	35,2	<b>Cáncer de mama</b>			
SNB-19	2,80	8,64	39,9	MCF7	2,10	12,0	57,9
SNB-75	2,98	12,8	49,1	MDA-MB-231	1,49	3,89	10,7
U251	1,49	2,93	5,74	HS 578T	1,84	8,09	50,9
<b>Cáncer de próstata</b>				T-47D	1,88	6,09	43,5
PC-3	2,02	4,57	11,3	MDA-MB-468	2,12	4,84	13,9
DU-145	2,65	7,62	28,3				

En resumen, todos los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados USYDS1 y USYDS7 mostraron una inhibición dependiente de la estructura de la proliferación de células cancerosas. En algunas líneas celulares, la proliferación se inhibió a concentraciones nanomolares. USYDS 1 mostró la actividad más potente en la inhibición de la proliferación de células cancerosas. Se demostró que los demás compuestos de pPHOS son inhibidores moderados. Las figuras 3 y 6 muestran curvas de dosis-respuesta para la inhibición de la proliferación de células cancerosas humanas, para las diversas líneas celulares mostradas en la tabla anterior, por los compuestos USYDS1 y USYDS7.

- 10 Cabe destacar que estos pPHOS necesitaron un exceso de al menos 10 veces en la concentración para provocar la muerte celular (valores de CL<sub>50</sub>) o provocar la necrosis, por encima de lo necesario para inhibir la proliferación celular (valores de CI<sub>50</sub>). Esto indica que los pPHOS probablemente causaban la muerte celular programada (apoptosis) o la detención del ciclo celular de las células cancerosas.
- 15 **B)** Se evaluó la inhibición de la proliferación celular de dos derivados de polihidroxiestilbeno prenilados, a saber, USYDS10 y USYDS14, como se muestra en las tablas 3 y 4 a continuación, frente a las líneas celulares indicadas en un intervalo de concentraciones ( $1 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M) en el National Cancer Institute (NCI), EE. UU.

**Tabla 3: Efecto inhibidor de la proliferación de células cancerosas de USYDS10**

	CI <sub>50</sub>	TGI	CL <sub>50</sub>
<b>Leucemia</b>			
HL-60(TB)	3,27E-7	1,88E-6	>1,00E-4
K-562	3,86E-7	3,17E-5	>1,00E-4
MOLT	5,96E-7	1,99E-5	>1,00E-4
RPMI	3,24E-7	1,63E-5	>1,00E-4
SR	1,88E-7	>1,00E-4	>1,00E-4
<b>Cáncer de pulmón no microcítico</b>			
A549/ATCC	6,60E-7	2,25E-5	>1,00E-4
EKVX	1,22E-5	7,34E-5	>1,00E-4
HOP	5,81E-7	1,77E-5	4,23E-5
HOP	3,98E-7	2,63E-5	9,32E-5
NCI-H226	5,35E-6	3,50E-5	>1,00E-4
NCI-H23	3,80E-7	1,52E-5	7,83E-5
NCI-H322M	1,18E-5	3,14E-5	8,37E-5
NCI-H460	3,81E-7	1,29E-5	6,61E-5
NCI-H522	3,49E-7	1,46E-5	4,22E-5
<b>Cáncer de colon</b>			
COLO	1,53E-5	2,97E-5	5,77E-5
HCC-2998	1,81E-6	1,19E-5	3,98E-5
HCT-116	4,80E-7	1,30E-5	4,27E-5
HCT-15	4,98E-7	2,09E-5	>1,00E-4
HT29	5,72E-6	2,13E-5	6,90E-5
KM12	4,97E-7	1,53E-5	8,58E-5
SW-620	3,62E-7	2,15E-5	8,55E-5
<b>Cáncer del SNC</b>			
SF-268	1,40E-6	4,96E-5	>1,00E-4
SF-295	2,01E-6	1,91E-5	>1,00E-4
SF-539	3,76E-7	1,29E-5	4,17E-5
SNB-19	6,13E-7	2,28E-5	>1,00E-4
SNB-75	2,36E-7	1,22E-5	3,61E-5
U251	4,19E-7	1,62E-5	7,88E-5
<b>Melanoma</b>			
LOX IMVI	5,72E-7	1,93E-5	8,00E-5
MALME-3M	1,87E-5	4,17E-5	9,29E-5
M14	2,84E-7	1,42E-5	4,16E-5
MDA-MB-435	3,85E-8	2,56E-7	>1,00E-4

(continuación)

	<b>CI50</b>	<b>TGI</b>	<b>CL50</b>
SK-MEL-2	5,76E-7	3,26E-5	>1,00E-4
SK-MEL-28	5,72E-7	1,69E-5	4,30E-5
SK-MEL-5	2,91E-7	1,27E-5	3,60E-5
UACC-257	1,17E-5	2,94E-5	7,37E-5
UACC-62	5,21E-7	1,55E-5	4,28E-5
<b>Cáncer de ovario</b>			
IGROV1	2,03E-6	>1,00E-4	>1,00E-4
OVCAR-3	3,72E-7	2,03E-5	>1,00E-4
OVCAR-4	1,03E-6	1,82E-5	5,77E-5
OVCAR-5	8,92E-6	2,80E-5	8,31E-5
OVCAR-8	4,67E-7	6,50E-5	>1,00E-4
NCI/ADR-RES	1,83E-7	8,04E-7	>1,00E-4
SK-OV-3	4,22E-7	1,14E-5	3,42E-5
<b>Cáncer renal</b>			
786-0	6,81E-7	2,01E-5	7,45E-5
A498	2,17E-6	7,85E-6	3,48E-5
ACHN	9,03E-7	3,79E-5	>1,00E-4
CAKI-1	5,39E-7	6,68E-5	>1,00E-4
RXF 393	2,21E-7		3,76E-5
SN12C	6,71E-7	2,98E-5	>1,00E-4
TK-10	9,55E-6	5,15E-5	>1,00E-4
UO-31	8,78E-7	2,17E-5	9,52E-5
<b>Cáncer de próstata</b>			
PC-3	2,27E-6	3,12E-5	>1,00E-4
DU-145	4,42E-7	2,05E-5	>1,00E-4
<b>Cáncer de mama</b>			
MCF7	3,32E-7	1,30E-5	5,06E-5
MDA-MB-231/ATCC	6,42E-7	3,20E-5	>1,00E-4
HS 578T	2,92E-7	2,60E-5	>1,00E-4
BT-549	7,98E-7	1,90E-5	4,93E-5
T-47D	1,47E-6	2,47E-5	>1,00E-4
MDA-MB-468	3,73E-7	1,44E-5	4,49E-5

Tablas 4 - Efecto inhibitor de la proliferación de células cancerosas de USYDS14

	<b>CI50</b>	<b>TGI</b>	<b>CL50</b>
<b>Leucemia</b>			
HL-60(TB)	4,06E-6	1,63E-5	>1,00E-4
K-562	8,33E-7	1,42E-5	>1,00E-4
MOLT-4	4,03E-6	2,10E-5	>1,00E-4
RPMI-8226	4,07E-6	2,45E-5	>1,00E-4
SR	6,70E-7	2,46E-5	>1,00E-4
<b>Cáncer de pulmón no microcítico</b>			
A549/ATCC	4,33E-6	1,65E-5	4,55E-5
EKVX	6,45E-6	2,12E-5	5,17E-5
HOP-62	1,43E-6	3,77E-6	9,98E-6
HOP-92	1,49E-6	7,58E-6	3,29E-5
NCI-H226	1,72E-6	3,60E-6	7,52E-6
NCI-H23	2,92E-6	1,73E-5	5,76E-5
NCI-H322M	1,25E-5	2,57E-5	5,28E-5
NCI-H460	3,87E-6	1,49E-5	5,12E-5
NCI-H522	7,50E-7	2,26E-6	5,85E-6
<b>Cáncer de colon</b>			
COLO 205	1,46E-5	2,85E-5	5,57E-5
HCC-2998	2,90E-6	1,06E-5	4,07E-5
HCT-116	4,20E-6	1,60E-5	4,66E-5
HCT-15	2,06E-6	1,04E-5	4,33E-5
HT29	1,40E-5	2,91E-5	6,09E-5
KM12	3,74E-6	1,44E-5	5,74E-5
SW-620	2,88E-6	1,67E-5	6,38E-5
<b>Cáncer del SNC</b>			
SF-268	4,65E-6	1,78E-5	4,85E-5
SF-295	3,91E-6	1,53E-5	4,31E-5
SF-539	2,96E-6	1,05E-5	3,78E-5
SNB-19	5,01E-6	2,01E-5	5,22E-5

(continuación)

	<b>CI50</b>	<b>TGI</b>	<b>CL50</b>
SNB-75	1,79E-6	7,80E-6	2,93E-5
U251	3,09E-6	1,27E-5	3,94E-5
<b>Melanoma</b>			
LOX IMVI	1,36E-6	3,37E-6	8,35E-6
MALME-3M	3,14E-6	2,18E-5	5,48E-5
M14	2,95E-6	1,36E-5	5,00E-5
MDA-MB-435	3,73E-7	8,45E-6	4,00E-5
SK-MEL-2	3,72E-6	1,25E-5	4,12E-5
SK-MEL-28	3,05E-6	1,64E-5	4,16E-5
SK-MEL-5	5,54E-7	1,87E-6	4,46E-6
UACC-257	1,02E-5	2,35E-5	5,40E-5
UACC-62	2,61E-6	1,32E-5	3,91E-5
<b>Cáncer de ovario</b>			
IGROV1	3,65E-6	1,37E-5	6,54E-5
OVCAR-3	3,52E-6	1,35E-5	4,11E-5
OVCAR-4	2,98E-6	1,36E-5	3,86E-5
OVCAR-5	1,24E-5	2,58E-5	5,36E-5
OVCAR-8	3,59E-6	1,56E-5	6,49E-5
NCI/ADR-RES	7,80E-7	1,14E-5	4,93E-5
SK-OV-3	2,85E-6	1,37E-5	3,72E-5
<b>Cáncer renal</b>			
786-0	3,44E-6	1,18E-5	4,00E-5
A498	1,30E-5	2,66E-5	5,46E-5
ACHN	2,98E-6	1,25E-5	3,65E-5
CAKI-1	3,59E-6	1,75E-5	4,54E-5
RXF 393	1,07E-6	3,58E-6	1,48E-5
SN12C	3,61E-6	1,51E-5	4,20E-5
TK-10	3,79E-6	1,21E-5	3,54E-5
UO-31	3,71E-6	1,79E-5	4,63E-5
<b>Cáncer de próstata</b>			
PC-3	6,65E-6	2,16E-5	5,50E-5
DU-145	8,20E-6	2,11E-5	4,75E-5
<b>Cáncer de mama</b>			
MCF7	2,74E-6	1,18E-5	4,19E-5
MDA-MB-231/ATCC	3,15E-6	1,43E-5	4,53E-5
HS 578T	2,71E-6	2,05E-5	>1,00E-4
BT-549	4,27E-6	1,63E-5	4,69E-5
T-47D	2,71E-6	7,84E-6	6,18E-5
MDA-MB-468	1,42E-6	4,12E-6	1,64E-5

En resumen, todos los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados USYDS10 y USYDS 14 mostraron una inhibición dependiente de la estructura de la proliferación de células cancerosas.

## 2. Valores calculados de los coeficientes de partición Log (Log P) de varios hidroxiestilbenos.

Los valores Log P calculados para USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2 y los hidroxiestilbenos conocidos se presentan en la tabla 5 a continuación.

**Tabla 5. Valores de Log P calculados de diversos hidroxiestilbenos**

<b>Compuesto comparativo USYDS2</b>	5,37	<b>Rapontigenina</b>	2,82
<b>Compuesto USYDS1</b>	5,58	<b>Compuesto USYDS1 sin un grupo prenilo.</b>	3,49
<b>Resveratrol</b>	3,14	<b>Pinosilvina</b>	3,68
<b>Piceatannol</b>	1,90		

La potente inhibición de los compuestos de pPHOS, por ejemplo, USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2, puede explicarse en términos de su hidrofobia aumentada, demostrada por sus valores del coeficiente de partición Log calculado (Log P). USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2 tienen valores de Log P de prácticamente el doble que el hidroxiestilbeno resveratrol. Los efectos de Log P en los compuestos terapéuticos se refieren principalmente a la penetración y distribución en tejidos. Unos mayores valores de Log P permitirán que los compuestos atraviesen más fácilmente las membranas celulares y entren en las células.

### 3. Efecto de los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados sobre células de piel humanas irradiadas con radiación UV.

Se cultivaron queratinocitos humanos adultos normales (NHK) (Invitrogen, Vic, Australia) en medio de crecimiento de queratinocitos Epilife complementado con calcio y suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS, que contiene 0,2 ng de EGF por ml, 5 mg de insulina por ml, 5 mg de transferrina por ml, 0,18 mg de hidrocortisona por ml, y extracto de hipófisis bovina al 0,2 %) (Invitrogen, Vic, Australia) en placas de cultivo de 12 pocillos hasta que se alcanzó un estado subconfluyente. Las células se cultivaron hasta una densidad de  $5 \times 10^3$  células por ml/pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con dióxido de carbono al 5 % y se analizaron siguiendo los protocolos descritos a continuación:

#### Determinación de las dosis óptimas de irradiación UV.

Las células, sembradas a una densidad como la descrita anteriormente, se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y después se irradiaron con una serie de dosis de UVA y UVB conocida como MED (dosis mínima de eritema, 1 MED = 25,43/intensidad de luz). Las células se volvieron a sembrar con medio de crecimiento y se incubaron durante aproximadamente 24 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con dióxido de carbono al 5 %. La viabilidad celular se midió utilizando el ensayo MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) (Promega, Vic Australia).

#### Ensayo de rescate.

Las células se lavaron dos veces con PBS, se repuso una fina capa de PBS, y después se irradiaron con las dosis óptimas de UVA y UVB, como se ha determinado anteriormente. Inmediatamente después de la irradiación, se repuso medio de cultivo fresco que contenía las muestras de ensayo a un intervalo de concentraciones y se incubaron adicionalmente en una estufa de incubación humidificada con CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 h. Se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80 °C hasta la determinación de la concentración de PGE2 y las citocinas (IL1, 6, 8, 10 y 12) utilizando kits de ELISA.

#### Ensayo de protección.

Las células se lavaron dos veces con PBS, se repuso una fina capa de PBS que contenía diferentes concentraciones de los compuestos de ensayo y después se irradiaron con dosis óptimas de radiación UVA y UVB, como se ha determinado anteriormente. Inmediatamente después de la irradiación, se repuso medio de cultivo fresco y se incubaron adicionalmente en una estufa de incubación humidificada de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 h. Se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80 °C hasta la determinación de la concentración de PGE2 y las citocinas (IL1, 6, 8, 10 y 12) usando kits de ELISA.

Los cultivos de control tratados de manera simulada se manipularon de manera idéntica, pero no se expusieron a irradiación con UV. Los compuestos de estilbeno, incluidos USYDS1, 2 y 7 y el extracto de propóleo se analizaron a concentraciones de 0,1, 1 y 10 µM o µg/ml.

Los resultados de la determinación de las dosis óptimas de irradiación UV revelaron que con una irradiación UVA y UVB de 1 MED, no hay un efecto significativo en la viabilidad celular. Por consiguiente, se seleccionaron estas condiciones para investigar los efectos de los estilbenos y el extracto de propóleo en los niveles de citocinas en el ensayo de rescate.

En una investigación preliminar sobre la modulación de la producción de citocinas en queratinocitos epidérmicos humanos (HEK) irradiados con UV, se observó que una mezcla de USYDS1 y del ejemplo comparativo USYDS2 inhibió de manera moderada la producción de IL-6, TGFα, G-CSF y GM-CSF (2-3 veces). Sin embargo, se observó que los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados aumentaron significativamente la producción de IL-8 e IL-1α (4-5 veces) en células irradiadas con UV. Se sabe que la IL-8 desempeña un papel en el inicio de la respuesta de inmunidad. Por otra parte, IL-1α (antagonista del receptor de citocinas de origen natural), desempeña un papel importante en la inhibición del efecto perjudicial de la IL-1 durante los procesos inflamatorios. Por lo tanto, estos resultados preliminares demuestran que los derivados de polihidroxiestilbeno prenilados de la presente invención pueden ser buenos candidatos para el tratamiento de afecciones asociadas con la supresión de la inmunidad y la inflamación.

### 4. Actividades antioxidantes de los estilbenos y los extractos de propóleo

#### Ensayo de actividad depuradora del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

El ensayo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) DPPH se usa comúnmente para analizar la capacidad de depuración de radicales libres de un compuesto o de extractos de productos naturales, midiendo la reducción de los radicales de DPPH<sup>•</sup> a 517 nm. En su forma de radical, el DPPH<sup>•</sup> muestra una fuerte absorción a 517 nm debido a su electrón desapareado. Tras la reducción mediante un antioxidante o depurador de radicales, desaparece la absorción y la decoloración resultante debido a la depuración del radical es estequiométrica con respecto al número de electrones captados (DPPH<sup>•</sup> + AH → DPPH:H + A<sup>•</sup>). Se llevó a cabo el ensayo de DPPH en un procedimiento por etapas como se describe a continuación.

Se agitó una solución metanólica de DPPH (0,1 mM) en un recipiente oscuro a temperatura ambiente durante 20 min. La solución se exploró a entre 400 - 750 nm para obtener una longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ , ~510 nm). Se ajustó la concentración de la solución de DPPH con metanol, obteniéndose una absorbancia máxima de aproximadamente 1,0. Se añadieron muestras de ensayo a diferentes concentraciones y la solución de antioxidante patrón (0,05 ml) a 0,95 ml de solución metanólica de DPPH en una cubeta. Las concentraciones finales de las muestras de ensayo fueron 0,1, 1, 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de la solución resultante a la longitud de onda máxima (~510 nm). Una reducción de la absorbancia indicó un efecto de depuración de los radicales libres de las muestras de ensayo. Se elaboraron curvas de dosis-respuesta de las muestras de ensayo para determinar sus valores de  $\text{CI}_{50}$  (concentraciones que muestran una reducción del 50 % en la absorbancia UV).

### Resultados

Los compuestos de pPHOS en este estudio mostraron un efecto de moderado a débil en la depuración de los radicales libres, salvo para USYDS7, que mostró un fuerte efecto. Estos resultados se muestran en la figura 10.

### 5. Efecto de los derivados de estilbeno en la desacetilasa sirtuina-2 dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (SIRT1).

SIRT1 es un miembro de la familia de Sir2 (clase III) que es una histona desacetilada dependiente de NAD. La desacetilación por la enzima SIRT1 puede actuar selectivamente sobre diversos sustratos, incluidas histonas, el supresor tumoral p53, el factor de transcripción forkhead (FOXO), el receptor y activado por proliferación de peroxisomas (PPAPy) y el coactivador-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ).<sup>10</sup> Se ha demostrado que SIRT1 está implicado en la regulación de diversos procesos fisiopatológicos, como la inflamación, el envejecimiento celular, la apoptosis/proliferación, el metabolismo y la regulación del ciclo celular (Chung, Yao *et al.* 2010). Por consiguiente, la modulación de la actividad de SIRT1 puede ser una posible diana terapéutica para controlar diversas enfermedades, por ejemplo cáncer, síndrome metabólico, obesidad, trastornos neurodegenerativos, disfunciones musculoesqueléticas y enfermedades relacionadas con el envejecimiento.<sup>11</sup>

El kit de ensayo de SIRT1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.) proporciona un método basado en fluorescencia para el cribado de inhibidores o activadores de SIRT1. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el ensayo consta de dos etapas, ambas realizadas en la misma placa de ensayo. En la primera etapa, el sustrato, que comprende la secuencia de p53 Arg-His-Lys-Lys( $\epsilon$ -acetil)-AMC (7-amino-4-metilcumarina), se incubó con SIRT1 humana recombinante, junto con su cosustrato, NAD<sup>+</sup>. La desacetilación sensibiliza al sustrato, de tal forma que el tratamiento con el revelador en la segunda etapa libera un producto fluorescente que se analizó utilizando un lector de placas fluorométrico, con una longitud de onda de excitación de 350-360 nm y una longitud de onda de emisión de 450-465 nm. Los estilbenos se analizaron a tres concentraciones (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Los datos representan dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

### Resultados

Todos los estilbenos, a excepción del resveratrol, mostraron una inhibición dependiente de la concentración de SIRT1 como se muestra en la figura 11 A y B. La modulación de la actividad de SIRT1 pudo dar lugar al desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, entre las que se incluyen cáncer, síndrome metabólico, obesidad, trastornos neurodegenerativos y enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

### 6. Actividades antibacterianas de USYDS1, el ejemplo comparativo USYDS2 y el extracto metabólico de propóleo de juncos de tipo 1

#### Sumario.

El cribado de la concentración de inhibición mínima (MIC) se realizó con 14 cepas bacterianas y 4 compuestos. Las MIC se determinaron mediante el método de microdilución de caldo de cultivo, siguiendo las guías del Instituto de Patrones Clínicos y de Laboratorio (CLSI). El cribado de MIC se realizó en placas de 96 pocillos que contenían los compuestos en diluciones seriadas de factor 2 de 64 a 0,06  $\mu\text{g/ml}$ . Las inoculaciones bacterianas se prepararon en caldo de medio de Mueller Hinton con cationes ajustados a partir de cultivos cultivados en placas de agar adecuadas que se prepararon frescas cada semana. En cada una de las placas de ensayo se incluyeron los controles de crecimiento y los controles estériles. Las placas de ensayo se incubaron en una estufa de incubación con aire ambiental a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16-20 h (24 h para MRSA), y se observó y registró la proliferación bacteriana. Todos los MIC del compuesto de referencia levofloxacino en el cribado de MIC se encuentran dentro del intervalo estándar descrito en CLSI S100-A20. La potencia de las 3 muestras de ensayo siguen el orden de USYDS1 > ejemplo comparativo USYDS2 > extracto etanólico de propóleo.

## 1. Materiales

### 1.1. Cepas

Panel de bacterias para el cribado de MIC

Microorganismo	Gramo	Cepa	<sup>1</sup> Resistencia	<sup>2</sup> Plásmido	Condiciones de cultivo	Condiciones de cribado de MIC
<i>Escherichia coli</i>	G	ATCC (25922)			TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G <sup>-</sup>	ATCC (27853)			TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G	ATCC (700603)	AMP, AZT, CFX, CPD, CAZ, CHL, PIP, TET	Sí	TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Haemophilus influenzae</i>	G <sup>-</sup>	ATCC (49247)			Agar de chocolate, CO <sub>2</sub> al 5 %, 35 ± 2 °C	HTM, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (51432)	IMI		TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Enterococcus faecium</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (700221)	VAN		TSA + sangre de oveja al 5 %, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Enterococcus faecalis</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (29212)			TSA + sangre de oveja al 5 %, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Streptococcus pyogenes</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (700492)			TSA + sangre de oveja al 5 %, CO <sub>2</sub> al 5 %, 35 ± 2 °C	CAMHB + sangre de caballo al 3 %, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (49619)	PEN		TSA + sangre de oveja al 5 %, CO <sub>2</sub> al 5 %, 35 ± 2 °C	CAMHB + sangre de caballo al 3 %, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G <sup>+</sup>	Aislado clínico	ERY		TSA + sangre de oveja al 5 %, CO <sub>2</sub> al 5 %, 35 ± 2 °C	CAMHB + sangre de caballo al 3 %, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (29213)			TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	G <sup>+</sup>	ATCC (43300)	MET, OXA		TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	G <sup>+</sup>	Aislado clínico	LEV		TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	G <sup>+</sup>	Aislado clínico	MET, ERY, CLI		TSA, aire ambiental, 35 ± 2 °C	CAMHB, aire ambiental, 35 ± 2 °C, 20 h

5

<sup>1</sup>Resistencia conocida; <sup>2</sup>Presencia de plásmido conocido

Abreviatura: TSA, agar con péptidos de soja digeridos con tripsina; CAMHB, caldo de Mueller Hinton con cationes ajustados; HTM, medio de ensayo de *Haemophilus*; AMP, ampicilina; AZT, aztreonam; CFX, cefoxitina; CPD, cefpodoxima; CAZ, ceftazidima; CHL, cloranfenicol; PIP, piperacilina; TET, tetraciclina; IMI, imipenem; VAN, vancomicina; PEN, penicilina; ERY, eritromicina; MET, meticilina; OXA, oxacilina; LEV, levofloxacino; CLI, clindamicina.

10

### 1.2. Medios y reactivos

15

Agar con péptidos de soja digeridos con tripsina (BD 211043), caldo de Mueller Hinton con cationes ajustados (BD

212322), base de medio de ensayo de *Haemophilus* (Fluka 51295), hemina (Fluka 51280),  $\beta$ -NAD (Fluka 43410), levofloxacin (Sigma 28266), sangre de oveja (Quad Five 630-500), sangre de caballo lisada (Quad Five 205-500), patrón de sulfato de bario de 0,5 McFarland, NaCl estéril al 0,85 % (m/v).

## 5 2. Métodos

### 2.1. Preparación de las cepas bacterianas

10 **A.** Revivir las cepas bacterianas del almacenamiento congelado (-80 °C) dos días antes del cribado de MIC. Extender en estrías sobre una superficie de las placas de agar adecuadas e incubar las placas durante 20-24 h a  $35 \pm 2$  °C en una atmósfera adecuada.

Estreptococos: TSA II, CO<sub>2</sub> al 5 %

Enterococos: TSA II, aire ambiental

15 *Haemophilus influenzae*: agar de chocolate, CO<sub>2</sub> al 5 %

Otras cepas en el panel: TSA, aire ambiental

20 **B.** Seleccionar 5-10 colonias aisladas en pocillos con una morfología similar y volver a sembrar en estrías sobre placas de agar fresco utilizando varillas estériles. Incubar las placas durante 20-24 h a  $35 \pm 2$  °C en una atmósfera adecuada, como se ha indicado anteriormente.

### 2.2. Preparar las placas de compuestos

25 Se prepararon soluciones madre de compuestos en DMSO al 100 % el día del cribado de MIC y se usaron inmediatamente. Concentración madre del compuesto = [(máxima concentración de ensayo)  $\times$  103  $\mu$ l/3  $\mu$ l] (por ejemplo, si la máxima concentración de ensayo necesaria es de 64  $\mu$ g/ml en las placas de ensayo, concentración madre =  $64 \times 103/3 = 2,2$  mg/ml). La potencia del compuesto de ensayo se asume como el 100 % a menos que se indique lo contrario, mientras que la potencia del compuesto de referencia se calcula según los datos de análisis del fabricante.

30 Se prepararon once diluciones de factor dos por compuesto y después se transfirieron 3  $\mu$ l a cada pocillo de la placa de ensayo. La concentración final del DMSO en el cribado de MIC es de ~3 %.

### 2.3. Preparación de la inoculación bacteriana

35 **A.** Extraer el caldo de medio del frigorífico a 4 °C y dejar que se caliente hasta temperatura ambiente.

**B.** Transferir las colonias de las placas de cultivo fresco en 5 ml de solución salina con varillas estériles y mezclar bien. Medir y ajustar la turbidez hasta el patrón de sulfato de bario de 0,5 McFarland utilizando un turbidímetro. Como alternativa, transferir 1-2 colonias en 500  $\mu$ l de solución salina y ajustar la DO<sub>625</sub> hasta ~0,1 utilizando un lector de placas.

40 **C.** Diluir el inóculo bacteriano a 1:280 para las cepas grampositivas y de cultivo exigente y a 1:400 para las cepas gramnegativas en el caldo de medio correspondiente (CAMHB, CAMHB + sangre de caballo lisada al 3 %, HTM) (por ejemplo, 35,6  $\mu$ l de inóculo en 10 ml de CAMHB o 25  $\mu$ l de inóculo en 10 ml de CAMHB).

45 *H. influenzae*: HTM

Estreptococos: CAMHB + sangre de caballo lisada al 3 %

Otras cepas en el panel: CAMHB

### 2.4. Preparar las placas de ensayo

50 **A.** Añadir 100  $\mu$ l del inóculo bacteriano a cada pocillo de las placas de compuesto, salvo en los pocillos B12, D12, F12 y H12.

**B.** Añadir 100  $\mu$ l de caldo de medio a los pocillos B12, D12, F12 y H12 de las placas de compuesto.

55 **C.** Apilar cuatro placas juntas y cubrirlas con una tapa de placas estéril. Incubar en una estufa de incubación con aire ambiental a  $35 \pm 2$  °C durante 16-20 horas (24 horas para MRSA).

### 2.5. Realizar los recuentos de colonias

60 **A.** Diluir el inóculo bacteriano (0,5 McFarland) en una serie de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> en solución salina (por ejemplo, 100  $\mu$ l de inóculo bacteriano + 900  $\mu$ l de solución salina).

**B.** Dispersar 100  $\mu$ l de cada dilución (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup>) sobre placas de CAMHA por triplicado, dejar que el líquido se empape en el agar durante 10 minutos, invertir las placas de agar e incubar durante 24 h a  $35 \pm 2$  °C.

### 2.6. Registro de las MIC y cálculo de las UFC

65 **A.** Abrir la disposición de la placa de compuestos en el sistema de gestión del compuesto y comprobar el código



de barras de la placa.

**B.** Colocar la placa de ensayo sobre el lector de MIC y ajustar el espejo de ampliación para leer cada uno de los pocillos, registrar el estado de proliferación como datos en bruto. (Opcional) Tomar una fotografía de cada una de las placas de ensayo utilizando un escáner de alta resolución y alta velocidad.

**C.** Determinar los puntos de ruptura de la MIC según la guía del CLSI.

**D.** Contar las colonias y calcular las UFC del inóculo bacteriano.

### 3. Resultados

#### 3.1. Tabla resumen de la MIC

El cribado de la MIC se realizó con 14 cepas bacterianas (11 cepas de la ATCC y 3 aislados clínicos) y 4 compuestos (USYDS1, ejemplo comparativo USYDS2 y extracto etanólico de propóleo y el compuesto de referencia levofloxacin). Las MIC se resumen en la tabla 6 a continuación. Los valores de MIC del compuesto de referencia levofloxacin obtenidos en este estudio se encuentran dentro del intervalo estándar, como se describe en S100-A20 [2]. La concentración final de DMSO en el cribado de MIC fue de ~3 % y no inhibió la proliferación de la mayoría de microorganismos.

**Tabla 6.** MIC (µg/ml) de USYDS1, el ejemplo comparativo USYDS2 y el extracto etanólico de propóleo frente a catorce cepas bacterianas. El levofloxacin es el compuesto de referencia.

Compuestos	Levofloxacin		USYDS1		Ejemplo comparativo USYDS2		Extracto etanólico de propóleo	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4	4	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>Escherichia coli</i>	<0,0625	<0,0625	16	16	64	32	>64	>64
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1	1	16	16	32	32	64	64
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 700221)	>64	>64	8	16	32	32	64	32
<i>Haemophilus influenzae</i>	<0,0625	<0,0625	32	32	32	32	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	>64	>64	>64	>64	>64	>64
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,5	0,25	16	8	32	16	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	0,25	0,25	8	8	16	16	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> (resistente al levofloxacin)	64	64	8	8	16	16	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA, resistente a la eritromicina y la clindamicina)	8	8	8	8	16	16	32	32
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	0,5	0,5	32	32	32	32	32	32
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 700942)	0,5	0,5	64	64	64	64	>64	>64
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (resistente a la eritromicina)	1	1	32	32	32	64	64	>64

### 4. Análisis

Los tetrahydroxiestilbenos prenilados USYDS1 y el ejemplo comparativo USYDS2 mostraron una actividad antibacteriana moderada con un rango de potencia de USYDS1 > ejemplo comparativo USYDS2 > extracto etanólico de propóleo.

### 7. El efecto de los compuestos USYDS1 y USYDS10 en las actividades de las cinasas

A continuación se presenta una lista de las cinasas estudiadas.

N.º	Cinasa	N.º	Cinasa	N.º	Cinasa	N.º	Cinasa
1	ABL2	20	CDK4/Ciclina D3	39	FGFR3	58	PKA $\gamma$
2	AKT1	21	CDK5/Ciclina P25	40	FGR	59	PKC $\alpha$
3	AKT2	22	CDK6/Ciclina D1	41	FLT1 (VEGFR1)	60	PKC $\beta$ I
4	AKT3	23	CDK6/Ciclina D3	42	FLT3	61	PKC $\gamma$
5	ALK1	24	CDK7/Ciclina H1/MNAT1	43	GSK3 $\alpha$	62	PKC $\epsilon$

(continuación)

N.º	Cinasa	N.º	Cinasa	N.º	Cinasa	N.º	Cinasa
6	AMPK (A1/B1/G1)	25	CHK1	44	HER2	63	PKC $\theta$
7	AMPK (A2/B1/G1)	26	c-KIT	45	IGF1R	64	PKC $\delta$
8	Aurora A	27	c-KIT(V654A)	46	InsR	65	PKC $\delta$
9	Aurora B	28	EGFR(T790M,L858R)	47	KDR	66	PKC $\zeta$
10	Aurora C	29	EphA1	48	LCK	67	PLK2
11	AXL	30	EphA2	49	NEK2	68	PLK3
12	BLK	31	EphA3	50	p38 $\beta$	69	RAF1
13	BTk	32	EphA4	51	PDGFR $\beta$	70	BRAF
14	CAMK1	33	EphB1	52	PI3K $\alpha$	71	BRAF(v599E)
15	CDK1/Ciclina A2	34	EphB2	53	PI3K $\beta$	72	RET
16	CDK1/Ciclina B	35	EphB3	54	PI3K $\gamma$	73	RON
17	CDK2/Ciclina A2	36	ERK1	55	PI3K $\delta$	74	SRC
18	CDK3/Ciclina E1	37	FGFR1(V561M)	56	PKA $\alpha$	75	TrkA
19	CDK4/Ciclina D1	38	FGFR2	57	PKA $\beta$	76	TrkB

## Experimentos

### 5 Materiales:

• *Tampón de ensayo Kinase-Glo(Plus) / ADP-Glo*

HEPES 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton-X-100 al 0,01 %, 100 µg/ml de BSA, DTT 2,5 mM, pH 7,4.

• *Tampón de ensayo Caliper*

HEPES 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Brij35 100 µl/l (30 %), DTT 1 mM, pH 7,4.

### 15 Sustratos de ensayo

La proteína MBP, MEK1 inactivo, y la proteína Rb se adquirieron de SignalChem. Poli(glu:tyr)(4:1) se adquirió de Sigma. PIP2 se adquirió de Cayman. Los sustratos peptídicos se sintetizaron en HD Biosciences, China.

20 El ATP se adquirió de Sigma. El reactivo KinaseGloPlus, el reactivo KinaseGlo y el reactivo ADP Glo se adquirieron de Promega

### Método de ensayo, formato Caliper

25 Mezclar las cinasas, el sustrato, el ATP y el compuesto en una placa de ensayo de 96 pocillos, el volumen total es de 50 µl. Incubar la placa de ensayo a 30 °C durante 1 hora. Detener la reacción añadiendo 20 µl de EDTA 35 mM y transferir 26 µl de la reacción detenida a una placa de ensayo de 384 pocillos. Leer las placas de ensayo en el lector de placas.

### 30 Método de ensayo - Formato ADP Glo

Mezclar las cinasas, el sustrato, el ATP y el compuesto en una placa de ensayo de 384 pocillos, el volumen total es de 10 µl. Incubar la placa de ensayo a 30 °C durante 1 hora. Añadir 10 µl/pocillo del reactivo ADP Glo a la placa de ensayo, incubar a 27 °C durante 40 min.

35 Añadir 20 µl/pocillo de reactivo de detección a la placa de ensayo, incubar a 27 °C durante 30 min. Leer la placa de ensayo en el lector de placas

### Procedimientos de ensayo - Formato Kinase-Glo(Plus)

40 Mezclar la cinasa, el sustrato, el ATP y el compuesto en una placa de ensayo de 384 pocillos, el volumen total es de 10 µl. Incubar la placa de ensayo a 30 °C durante 1 hora. Añadir 10 µl/pocillo de reactivo KinaseGlo(Plus) a la mezcla de reacción, y después incubar a 27 °C durante 20 min. Leer la placa de ensayo en el lector de placas.

- 45 • El efecto del cien por cien se realizó sin el compuesto y la enzima, pero con ATP y sustrato.
- El efecto del cero por cien se realizó sin compuesto, pero con ATP, sustrato y enzima.
- SB202190 es los compuestos de referencia para la cinasa p38 $\beta$ ; la estaurosporina (STSP) es el compuesto de referencia para las otras cinasas.

## Resultados

Las cinasas que inhibieron más de un 60 % se resumen en la tabla a continuación. Resulta interesante destacar que los tres compuestos inhibieron a las cinasas TrkA, PI3K $\delta$  y PI3K $\gamma$ . Tanto USYDS1 como USYDS10 parecen mostrar actividades inhibitoras similares frente a las cinasas.

Compuesto	Cinasas
USYDS1	FLT3, TrkA, CDK2/Ciclina A2, CDK4/Ciclina D3, PI3K $\alpha$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$
Ejemplo comparativo USYDS2	TrkA, PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$
USYDS10	FLT3, TrkA, KDR, FLT1, CDK2/Ciclina A2, PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$ , CLK1/Ciclina B

## 8. Estudio de toxicidad aguda de USYDS1

### Método

Se administra a un ratón una inyección i.p. única de 400 mg/kg; un segundo ratón recibe una dosis i.p. de 200 mg/kg y un tercer ratón recibe una sola dosis i.p. de 100 mg/kg. Se somete a observación a los ratones durante un periodo de 2 semanas. Se les sacrifica si pierden más de un 20 % de su peso corporal o si hay otros indicios de toxicidad significativa. En caso de que haya que sacrificar a los 3 ratones, se analizan de un modo similar los siguientes 3 niveles de dosis (50, 25, 12,5 mg/kg). Este proceso se repite hasta que se observa una dosis tolerada. Posteriormente esta dosis se designa como dosis máxima tolerada (DMT) y se usa para calcular la cantidad de material administrado a los ratones experimentales durante los ensayos antitumorales. Se permite que los ratones coman y beban a voluntad. El fármaco se disolvió en DMSO al 100 % a una concentración de 200 mg/ml.

### Resultado

Grupo	Dosis (mg/kg/dosis)	Vía	Días hasta la muerte	Superviviente/Total día 15	Volumen de inyección
1	100	i.p.	Ninguno	1/1	0,5 $\mu$ l/g de peso corporal
2	200	i.p.	1	0/1	1 $\mu$ l/g de peso corporal
3	400	i.p.	1	0/1	2 $\mu$ l/g de peso corporal

La DMT de USYDS1 se determinó como 100 mg/kg. Esta concentración indica una baja toxicidad para mamíferos y se utiliza para ensayos antitumorales adicionales. El ensayo de fibra hueca (BEC/C) para USYDS1 está en curso. El ensayo de fibra hueca es un cribado rápido preliminar para evaluar posibles nuevos compuestos quimioterápicos frente a una serie de líneas celulares de cáncer antes de su evaluación en el modelo de xenoinjerto de ratón. El modelo de fibra hueca tiene un menor tiempo de evaluación y una necesidad de compuesto reducida en comparación con los modelos de xenoinjerto tradicionales. El modelo permite la selección eficaz de tipos de células cancerosas en el xenoinjerto.

### Quimiotipos de plantas que producen resinas como fuentes de derivados de polihidroxiestilbeno prenilados

Las resinas, gomas o exudados obtenidos de plantas del género *Lepidosperma* de diferentes ubicaciones se analizaron mediante RMN  $^1\text{H}$  cuantitativa (q-RMN) para determinar el contenido de polihidroxiestilbeno prenilado, que incluyen derivados C y O-prenilados, O-metilados y no O-metilados. Las diferentes proporciones de estos derivados de polihidroxiestilbeno prenilados de las resinas forman la base para clasificar las plantas de manera correspondiente.

Hasta ahora existen al menos 3 quimiotipos diferentes de plantas de *Lepidosperma* y cada una de estas plantas muestran varios de estos subquimiotipos. El tipo 1 es la planta más común que contiene una proporción aproximadamente igual de derivados tanto C como O-prenilados. La planta de tipo 2 contiene únicamente derivados C-prenilados. Sin embargo, la planta de tipo 3 contiene derivados de polihidroxiestilbeno prenilados O-metilados.

Los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y/o modificaciones en la invención, como se muestra en las realizaciones específicas, sin apartarse del alcance de la invención como se ha descrito ampliamente. Las presentes realizaciones, por lo tanto, se deben considerar en todos los respectos como ilustrativas y no como restrictivas.

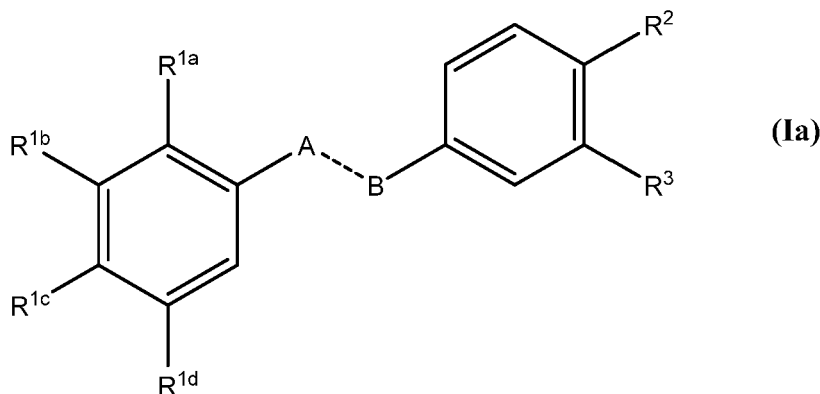
### Bibliografía

- (1) Denmark, E.; Regens, C. S.; Tetsuya, K. J. de Am. Chem. Soc. 2007, 129, 2774-2276.
- (2) Ali, I. A. I.; Fathalla, W. Heteroatom Chemistry 2006, 17, 280-288.
- (3) Krohn, K.; Thiem, J. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1977, 1186-1190.

- (4) Soerme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 1737-1743.
- (5) Andrus, M. B.; Liu, J.; Meredith, E. L.; Nartey, E. Tetrahedron Lett. 2003, 44, 4819-4822.
- (6) Rao, M. L. N.; Awasthi, D. K.; Banerjee, D. Tetrahedron Lett. 2010, 51, 1979-1981.
- 5 (7) Yang, P.-Y.; Zhou, Y.-G. Tetrahedron Asymmetry 2004, 15, 1145-1149.
- (8) Rooney, J. M. Journal of Macromolecular Science, Parte A 1986, 23, 823 - 829.
- (9) Batsomboon, P.; Phakhodee, W.; Ruchirawat, S.; Ploypradith, P. J. Org. Chem. 2009, 74, 4009-4012.
- (10) Michan, S.; Sinclair D. Biochem. J. 2007, 404, 1-13.
- (11) Yamamoto H.; Schoonjans K.; Auwerx J. Mol. Endocrinol. 2007, 21, 1745-1755.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (Ia)



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde:

$R^{1a}$  se selecciona entre  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CH-CH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

$R^{1b}$  se selecciona entre H, OH,  $OR^4$ ,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

$R^{1c}$  se selecciona entre H, OH,  $OR^{4a}$ ,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

$R^{1d}$  se selecciona entre H, OH,  $CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHCH(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

en donde al menos uno de  $R^{1b-1d}$  es OH;

$R^2$  se selecciona entre OH,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

$R^3$  se selecciona entre OH,  $OR^4$ ,  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $CH=CHC(CH_3)=CH_2$ ,  $OCH=CHCH(CH_3)_2$  u  $OCH=CHC(CH_3)=CH_2$ ;

$R^4$  se selecciona entre, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo o bencilo;

$R^{4a}$  se selecciona entre etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *t*-butilo o bencilo; y A---B se selecciona entre  $CH=CH$ ,  $CH=CHX$  o  $-CH_2-CH_2X$ , donde  $X=(CH_2)_pCH_2$  y p es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 0, 1, 2 o 3.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde ninguno, uno o dos de  $R^{1b-1d}$  son H.

3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en donde al menos uno de  $R^{1a-1d}$  es  $CH_2CH=C(CH_3)_2$  u  $OCH_2CH=C(CH_3)_2$ .

4. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde al menos dos de  $R^{1b-1d}$  son OH.

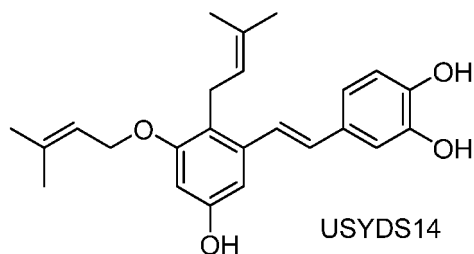
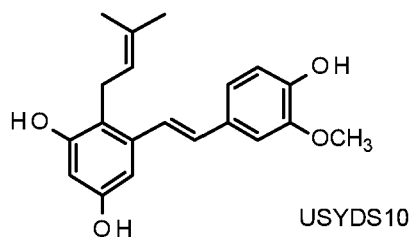
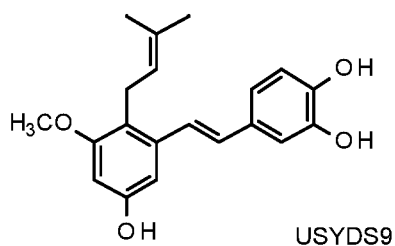
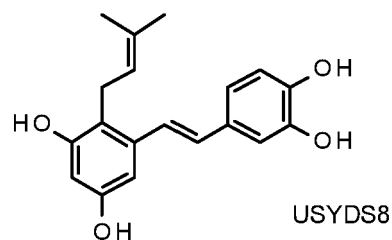
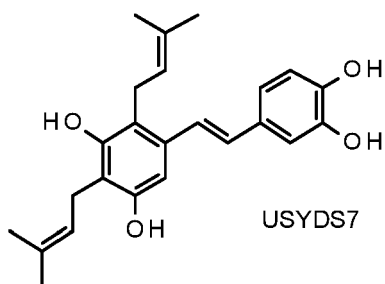
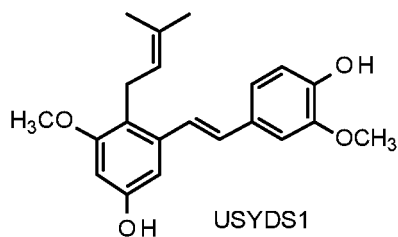
5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos uno de  $R^{1b-1c}$  es  $OR^4$  u  $OR^{4a}$  y  $R^4$  es metilo o bencilo y  $R^{4a}$  es bencilo.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno o ambos de  $R^2$  o  $R^3$  es OH.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde  $R^3$  es  $OR^4$  y  $R^4$  es metilo o bencilo.

8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde A---B es  $CH=CH$  o  $CH=CHX$ , donde  $X=(CH_2)_pCH_2$  y p es un número entero seleccionado entre el grupo que consiste en 0, 1, 2 o 3.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en:



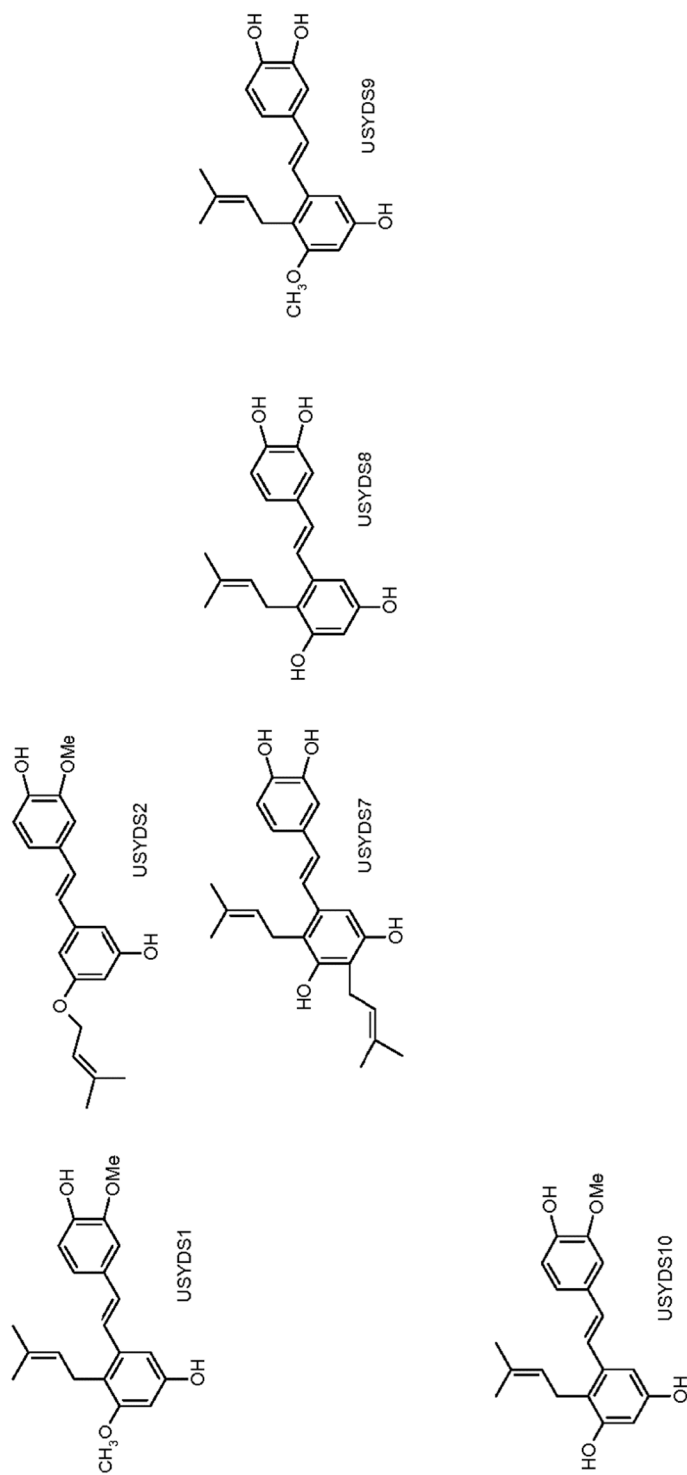
o una sal o un solvato del mismo farmacéuticamente aceptables.

10

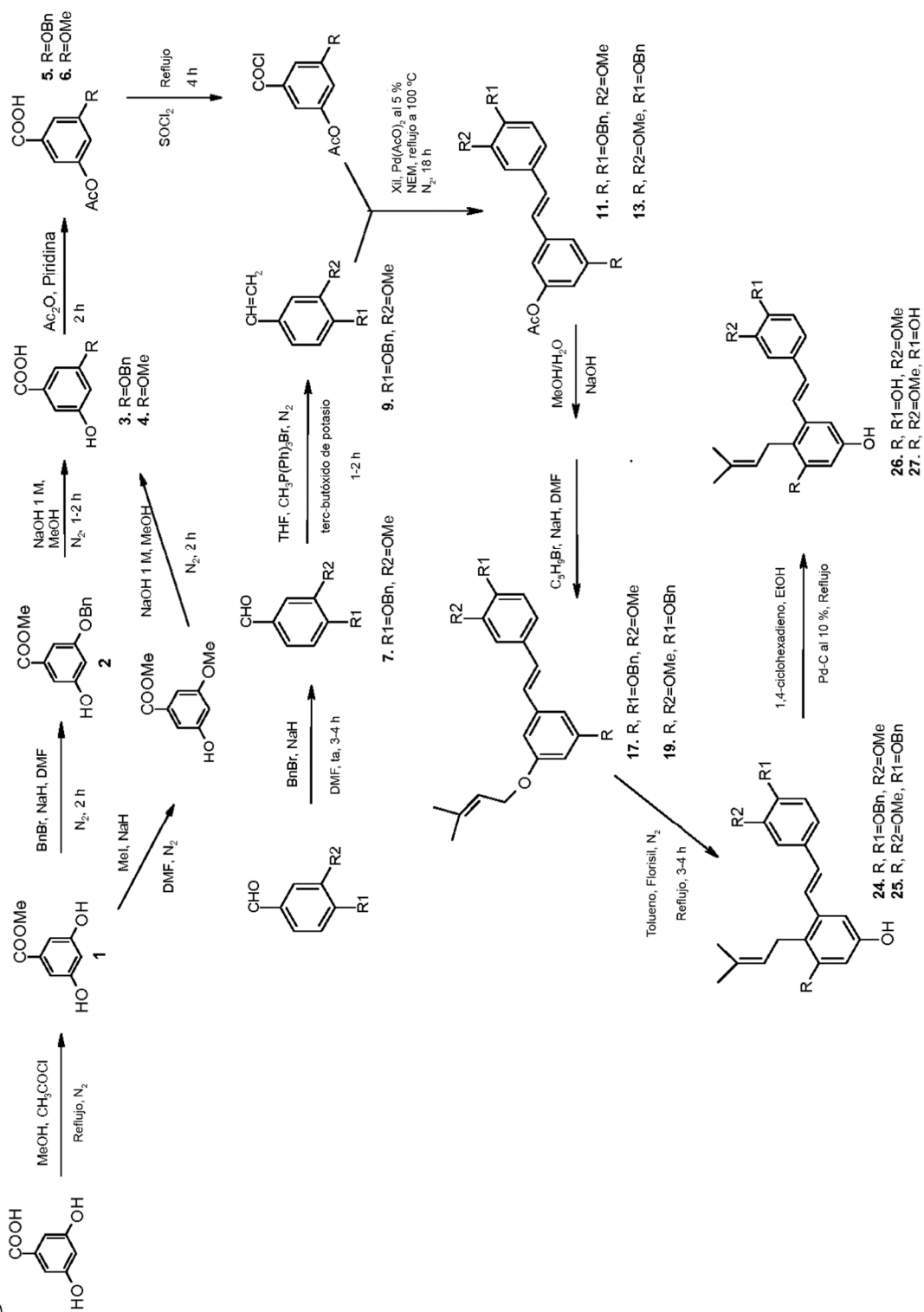
10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento del cáncer, la inmunosupresión, la inflamación, una infección bacteriana, una infección fúngica o el envejecimiento de la piel.

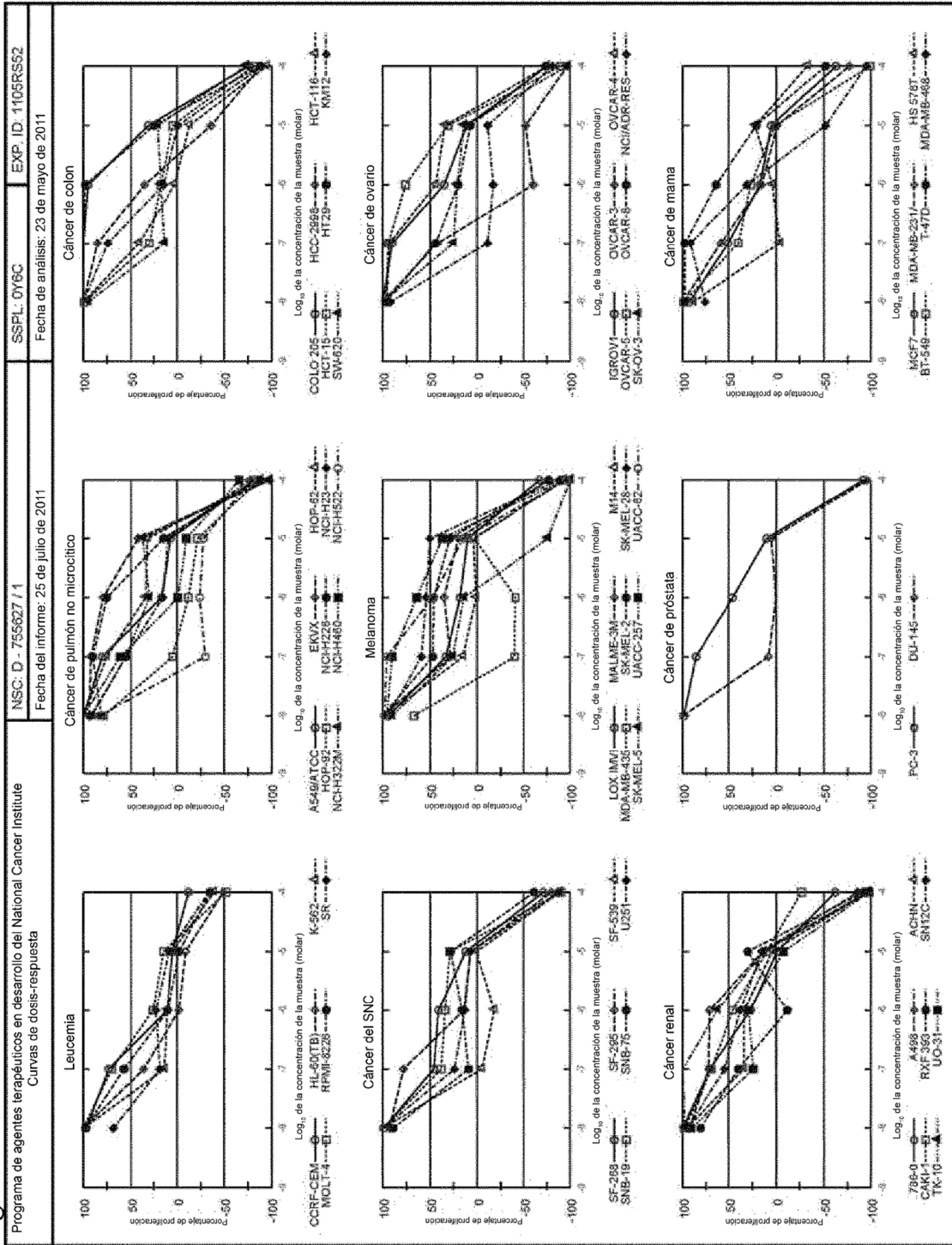
**Figura 1:**

**Figura 2:**

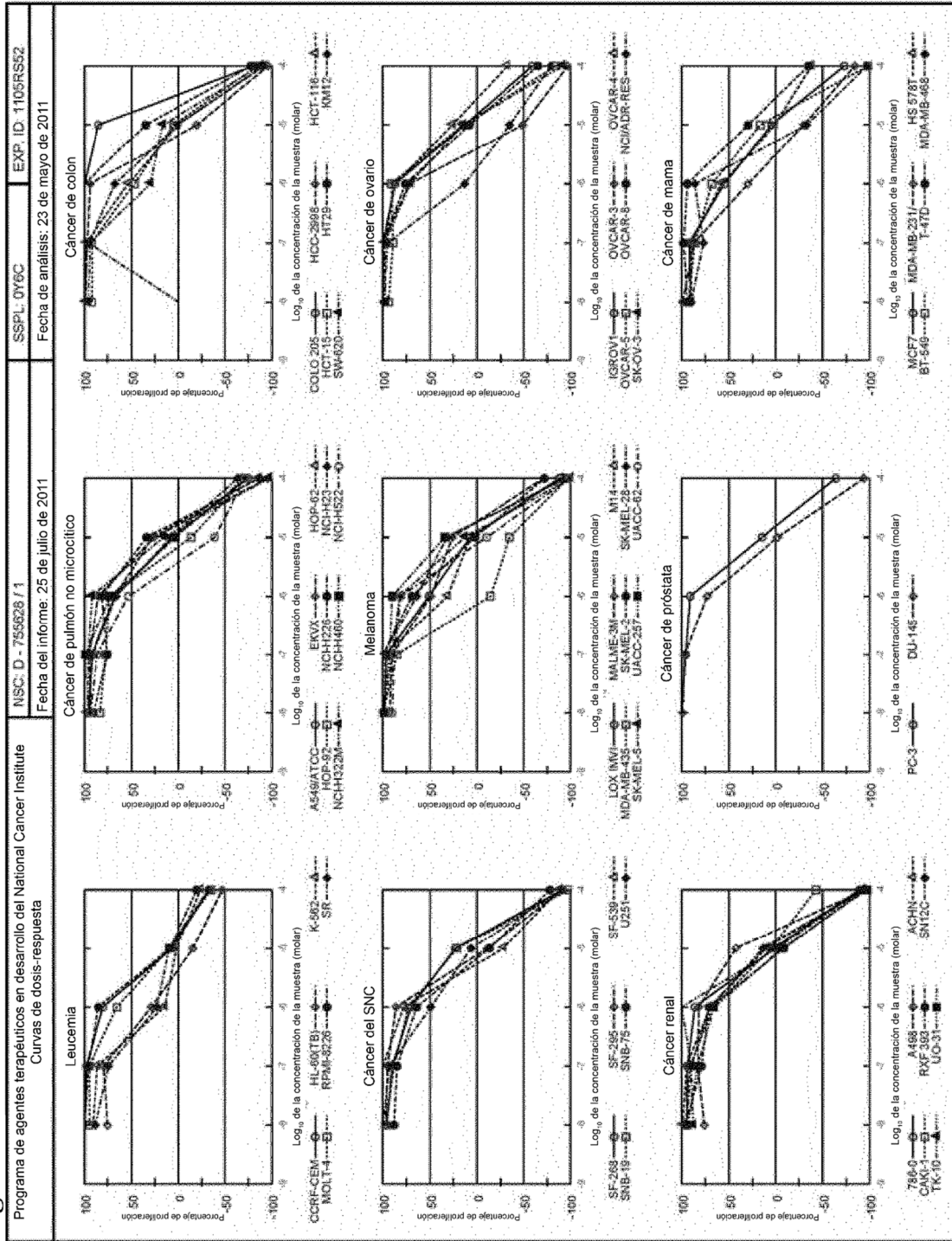




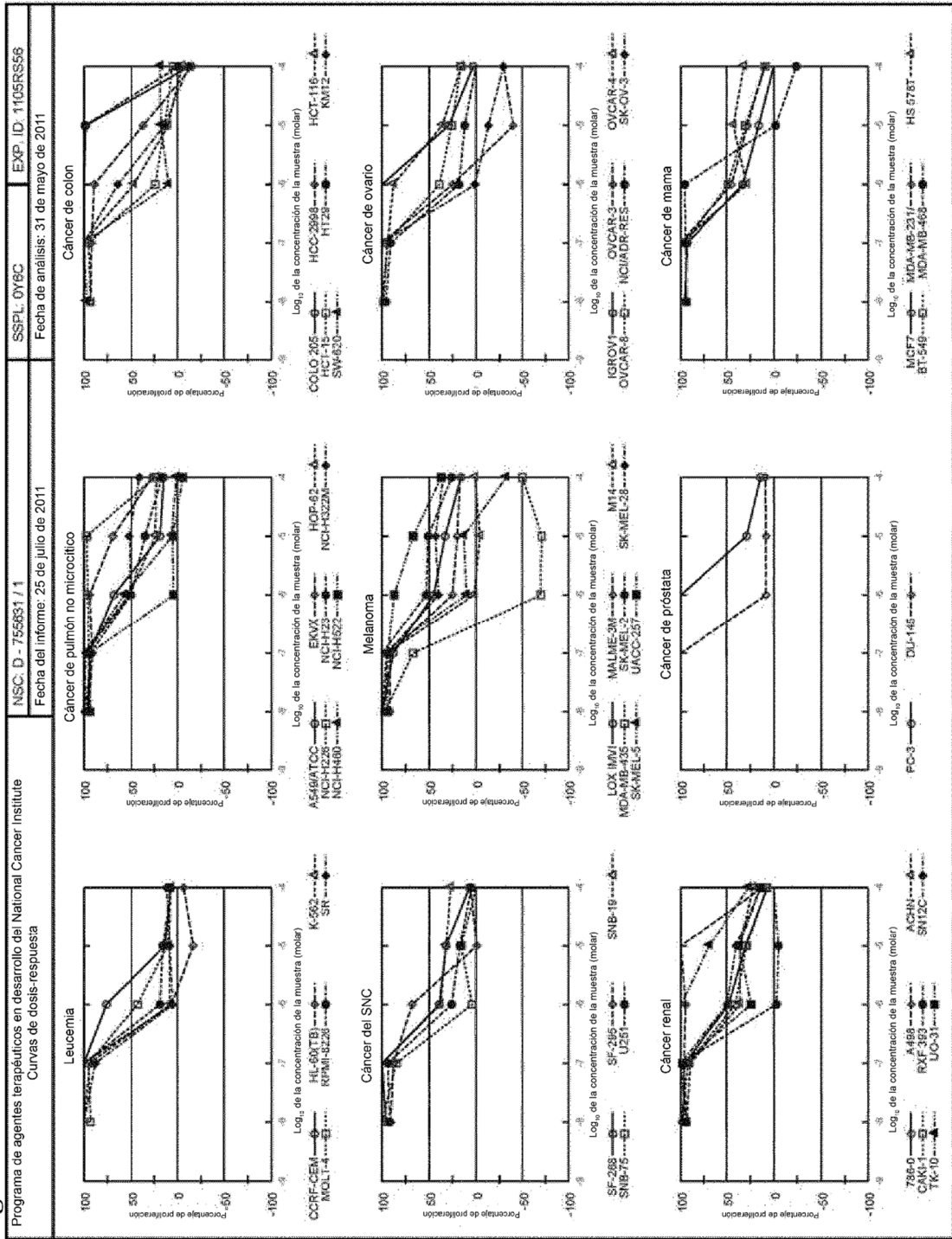
**Figura 3:**



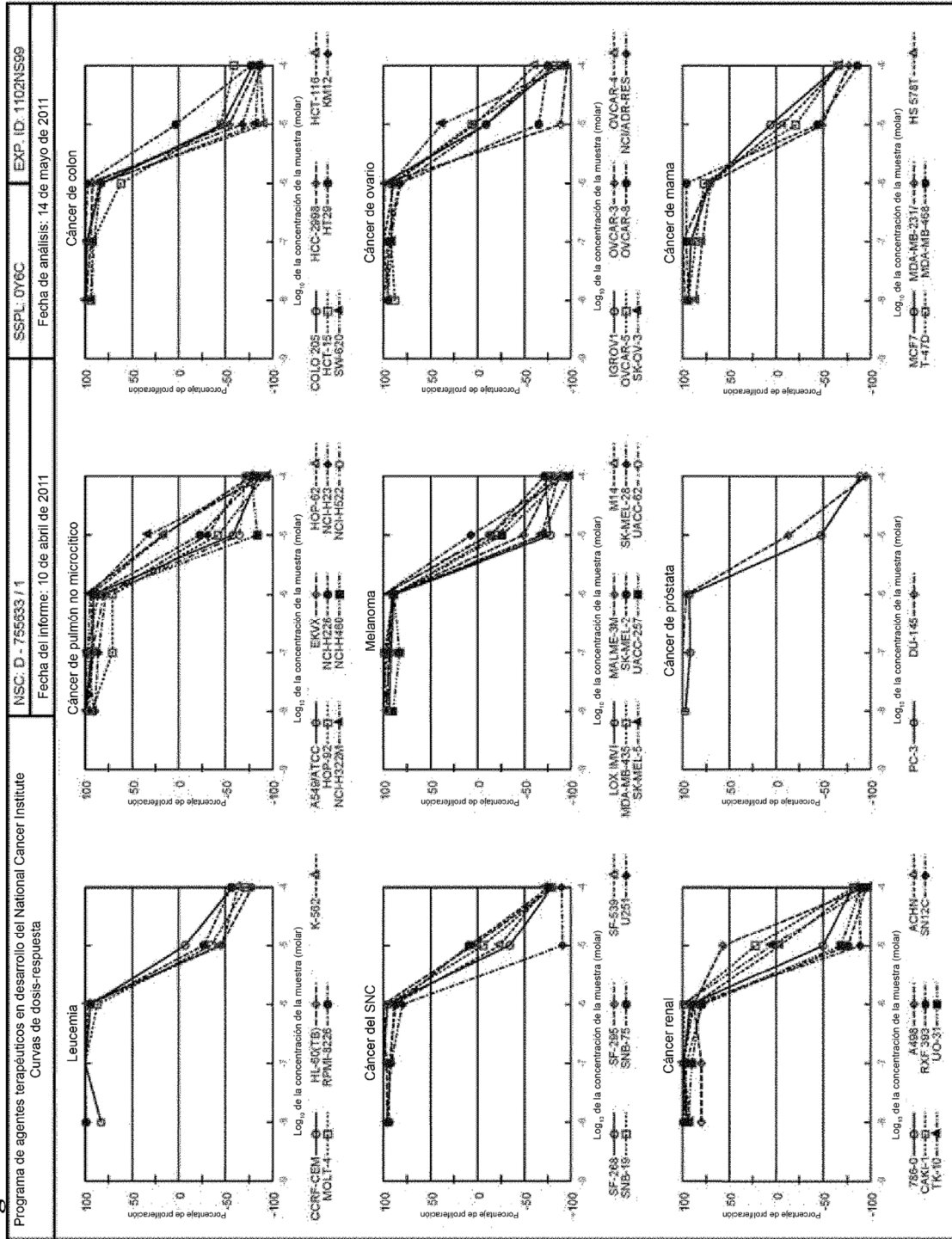
**Figura 4:**



**Figura 5:**



**Figura 6:**



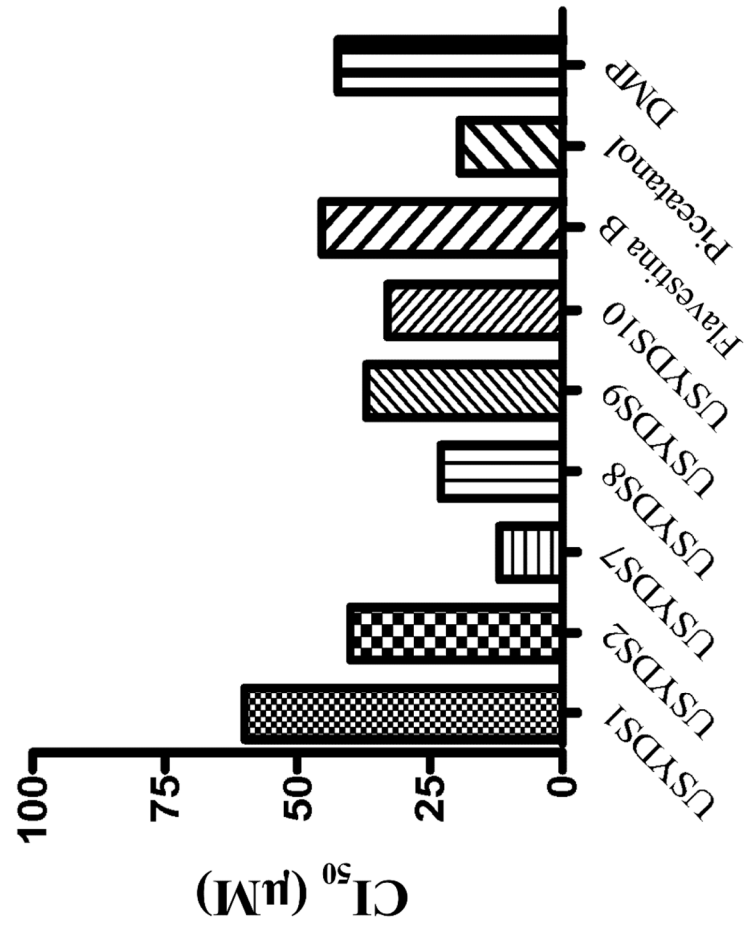


Figura 7.

Figura 8.

