



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 130**

(51) Int. Cl.:

C07D 493/04 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06721277 .9**

(96) Fecha de presentación : **24.03.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1861402**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

(54) Título: **Dímeros de isoflavonoides.**

(30) Prioridad: **24.03.2005 AU 2005901475**
06.04.2005 US 668609 P
28.10.2005 AU 2005905985

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

(73) Titular/es: **NOVOGEN RESEARCH Pty. Ltd.**
140 Wicks Road
North Ryde, New South Wales 2113, AU

(72) Inventor/es: **Heaton, Andrew y**
Kumar, Naresh

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 360 130 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

Dímeros de isoflavonoides

5 Campo de la invención

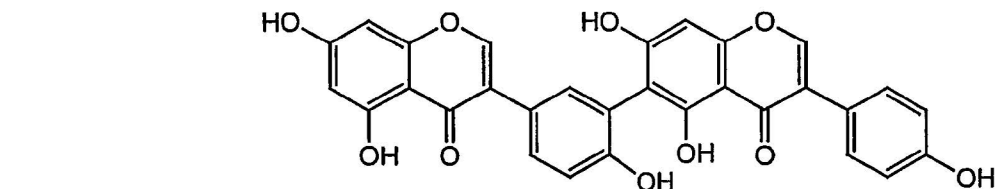
La presente invención se refiere de manera general a nuevos compuestos diméricos que presentan un esqueleto nafto[1,2-g]criseno. Los compuestos se basan en la dimerización de los sistemas de anillos (isoflavonoides) de 3-fenilcromano. Asimismo, la presente invención se refiere a la síntesis de los compuestos isoflavonoides diméricos, a composiciones que los contienen y a su utilización como agentes terapéuticos. En particular, los compuestos diméricos de la presente invención resultan útiles en el tratamiento y prevención de un abanico de importantes enfermedades humanas, entre ellas cánceres, trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunológicos, trastornos cardiovasculares y trastornos asociados a la activación de los receptores de estrógeno.

15

Antecedentes de la invención

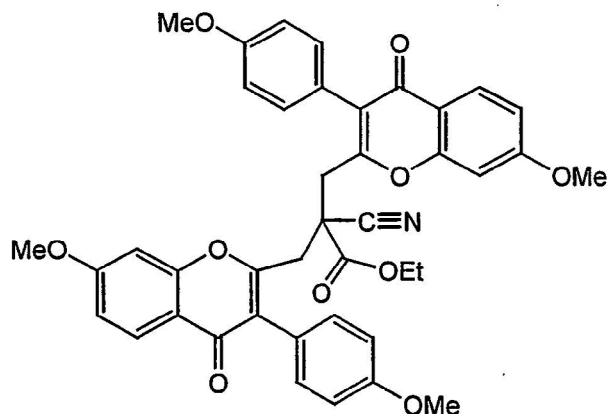
Las isoflavonas vegetales naturales es conocido que presentan un amplio abanico de efectos biológicos fundamentales sobre las células humanas, entre ellos la antioxidación y la regulación positiva y negativa de una amplia diversidad de enzimas y mecanismos de transducción de señales. La detención mitótica y la citotoxicidad de las células cancerosas humanas, la permeabilidad capilar incrementada, la adhesión celular incrementada, la respuesta incrementada de las células de músculo liso vascular a los vasorelajantes y el agonismo de los receptores de estrógeno, son sólo unos cuantos ejemplos de las respuestas de las células animales a los efectos biológicos de los isoflavonoides naturales. Algunas isoflavonas naturales comunes son la daidzeína, la genisteína, la formononetina, la biocanina A, la gliciteína, el coumestrol, la daidzina, la glicitina y la genistina.

Recientemente se ha despertado interés en las propiedades biológicas de las formas diméricas de los isoflavonoides. Algunos dímeros basados en la genisteína se ha informado que son inhibidores de la 5-alfa-reductasa que resultan útiles para el tratamiento de la prostatomegalia (patente JP n° 07-224944; publicación n° JP 09-067362). En una forma, el dímero resulta de la unión mediante un único enlace C-C de la posición 3' del grupo fenilo colgante de la genisteína con la posición 6 del anillo benzopirano de la segunda molécula de genisteína, de la manera siguiente.

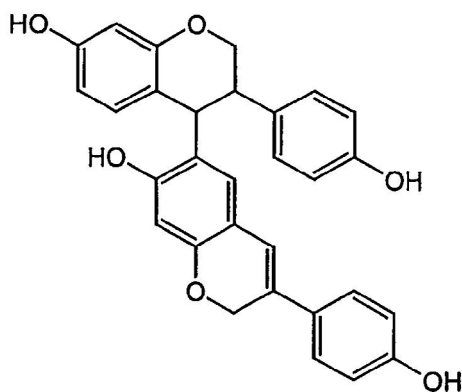


35 Dichos compuestos diméricos pueden denominarse generalmente bis-(3'→6)-isoflavonas según sus posiciones de unión. Otros compuestos descritos se basan en dímeros basados en genisteína y/o daidzeína de la misma estructura genérica de anillos.

40 Otro dímero se basa en una estructura de bis-(2→2)-isoflavona pero que presenta una molécula conectora entre las dos moléculas de isoflavona, tal como se muestra posteriormente, aunque no se le ha atribuido ninguna actividad biológica o beneficio terapéutico [Al-Maharik N.I., Kaltia S.A.A., Mutikainen I. y Wahala K., Synthesis of C-C-Bridged Bis-Isoflavones, J. Org. Chem. 65:2305, 2000].



Recientemente se ha descubierto otra clase de compuestos isoflavonoides diméricos que muestran una fuerte afinidad de unión para ambos receptores de estrógeno y por lo tanto que muestran una notable actividad fisiológica [patente WO N° 02/070502]. El compuesto dimérico cabeza de serie era un compuesto bis-(4→6)-isoflavonoide basado en el deshidroequol, tal como se indica a continuación:



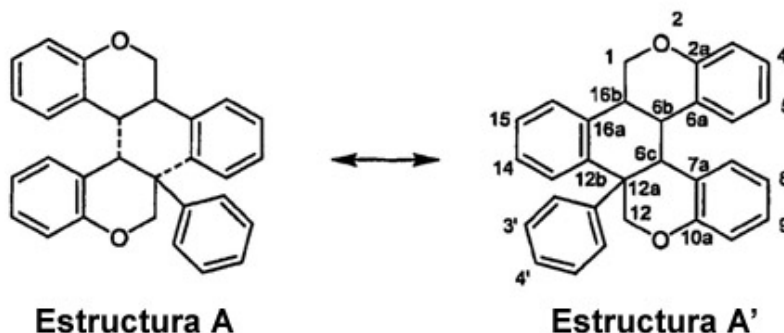
La totalidad de dichos compuestos isoflavonoides diméricos de la técnica anterior se construye mediante la unión de dos estructuras de anillos isoflavonoides mediante un único enlace carbono-carbono, o mediante una molécula conectora o molécula de puente.

A pesar de la considerable investigación y conocimientos acumulados sobre las isoflavonas y derivados de las mismas, todavía no se conoce el alcance completo de los compuestos isoflavonoides terapéuticamente útiles y de sus actividades. Además, existe una necesidad continua de nuevos agentes activos mejorados o por lo menos alternativos para el tratamiento, profilaxis, mejora, defensa y/o prevención de diversas enfermedades y trastornos.

Por consiguiente, existe una necesidad de compuestos de nueva generación que muestren propiedades fisiológicas importantes para la salud y bienestar de los animales, particularmente seres humanos, y de encontrar nuevos métodos que aprovechen dichas propiedades para el tratamiento, mejora y profilaxis de las enfermedades.

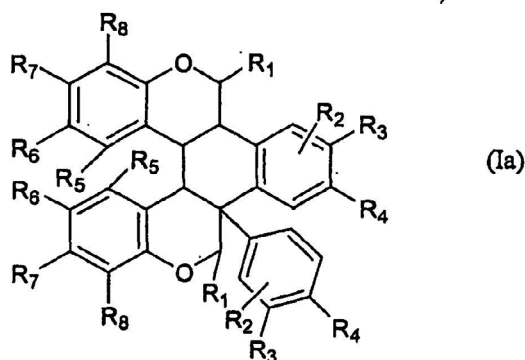
Descripción resumida de la invención

Inesperadamente, por primera vez, los presentes inventores han sintetizado una nueva clase de moléculas diméricas basada en compuestos isoflavonoides unidos mediante dos (2) enlaces sencillos carbono-carbono. El esqueleto se basa en una estructura nafto[1,2-g]-criseno tras la unión bis(4→4) y (2'→3) de dos sistemas de anillos 3-fenilcromano tal como se ilustra en la Estructura A genérica, posteriormente. Las líneas discontinuas representan los dos enlaces C-C formados durante la dimerización de los monómeros correspondientes.



El sistema de numeración proporcionado anteriormente para el 2,11-dioxo-12a-fenil-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (Estructura A') se utiliza durante toda la presente memoria en aras de la consistencia. Las moléculas diméricas de la presente invención resultan prometedoras en su utilización potencial como agentes fisiológicamente activos y en particular por su capacidad de mostrar afinidad de unión para los receptores de estrógeno. Los estudios con líneas celulares también han subrayado la notable e inesperada utilidad de los compuestos isoflavonoides diméricos de la presente invención como agentes quimioterapéuticos. Los compuestos también resultan útiles como quimiosensibilizadores, radiosensibilizadores, agentes antiinflamatorios y en aplicaciones cardiovasculares, incluyendo la vasodilatación.

De esta manera, según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula general (Ia):



en la que:

R₁ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆ o halo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆ o halo, R₉ es alquilo C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ o aril-alquilo C₁₋₆, y R₁₀ es, independientemente, alquilo C₁₋₆,

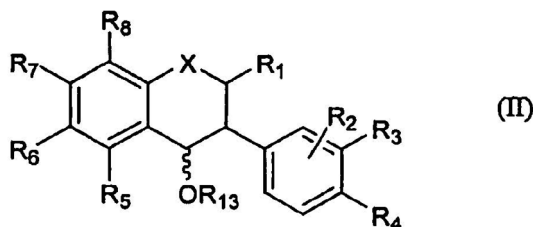
en el que arilo es fenilo o naftilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferentemente presentan los sustituyentes siguientes, en los que:

R₁ es hidrógeno, R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₄ o halo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₄ o halo, R₉ es alquilo C₁₋₄ o aril-alquilo C₁₋₄, y R₁₀ es, independientemente, metilo, etilo o t-butilo,

R₁ es hidrógeno,
R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, metilo, etilo o bromo,
R₅, R₆, R₇ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, metilo, etilo o bromo, y
R₉ es metilo, etilo, propilo, isopropilo o bencilo,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un método para la preparación de un compuesto de fórmula (Ia), incluyendo dicho método la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



en la que:

R₁ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆,

R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆, o halo,

R₅, R₆, R₇ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆ o halo,

R₉ es alquilo C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ o aril-alquilo C₁₋₆, y

R₁₀ es, independientemente, alquilo C₁₋₆,

R₁₃ es hidrógeno, R₉, C(O)R₉, Si(R₁₀)₃, alquil-C₁₋₆-sulfonilo o bencenosulfonilo,

X es O,

en el que arilo es fenilo o naftilo, con un agente de acoplamiento.

En una realización preferente, el anillo fenilo colgante de la estructura de 3-fenilcromano es donador de electrones y existe por lo menos un átomo de ortohidrógeno para facilitar la formación del enlace (2'→3) durante la dimerización. El grupo OR₁₃ alternativamente puede ser un grupo saliente seleccionado de entre halógenos tales como Cl, Br o I, hidroxilo, grupos alquilsulfonilo tales como mesilato y trifluorometanosulfonilo, grupos arilsulfonilo tales como tosilato, mesitilensulfonilo, bencenosulfonilo y bencenosulfonilo nitro-sustituido, grupos aciloxi tales como acetoxi o benzoiloxi y grupos ariloxi tales como benciloxi.

Según un tercer aspecto de la presente invención, los compuestos anteriormente definidos de fórmula (Ia) se proporcionan para la utilización en un método para el tratamiento, profilaxis o mejora de una enfermedad, incluyendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (Ia) en un sujeto.

Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona la utilización de uno o más compuestos de fórmula (Ia) en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades.

Según un quinto aspecto de la presente invención se proporciona la utilización de uno o más compuestos de fórmula (Ia) a modo de agente antiinflamatorio, agente cardiovascular, agente quimioterapéutico, quimiosensibilizador o radiosensibilizador.

Entre los trastornos inflamatorios se incluyen la enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis ulcerosa, la proctitis ulcerosa, la colitis distal y la enfermedad de Crohn. Los compuestos también resultan útiles para el tratamiento del dolor asociado a la inflamación. En una realización preferente, el tratamiento de los trastornos inflamatorios no presenta efectos secundarios cardiovasculares, es cardioprotector y/o protector intestinal.

Según un sexto aspecto de la presente invención se proporciona la utilización de un inhibidor de la

tromboxano sintasa para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de inflamación, incluyendo el dolor asociado a la inflamación. Preferentemente, el tratamiento es cardioprotector y/o intestinal protector.

- 5 Según un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un agente para el tratamiento, profilaxis o mejora de una enfermedad, comprendiendo el agente uno o más compuestos de fórmula (Ia).

En una realización preferente, la enfermedad es cáncer, un tumor o la proliferación o regulación positiva no deseada del crecimiento celular.

10

Según un octavo aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de fórmula (Ia) asociadamente con uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticos.

15

Según un noveno aspecto de la presente invención se proporciona una bebida o alimento que contiene uno o más compuestos de fórmula (Ia).

20

Según un décimo aspecto de la presente invención se proporciona un método para incrementar o restaurar la sensibilidad de las células de cáncer o de un tumor frente a la quimioterapia mediante la puesta en contacto de dichas células o tumor con un dímero isoflavonoide de fórmula (Ia). En una realización, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de receptor de crecimiento o un estimulador de receptor de muerte.

25

Según un undécimo aspecto de la presente invención se proporciona un método para incrementar o restaurar la sensibilidad de las células de cáncer o de un tumor frente a la radioterapia mediante la puesta en contacto de dichas células o tumor con un compuesto isoflavonoide de fórmula (Ia) tal como se describe posteriormente. En otra realización el paciente se somete tanto a quimioterapia como a radioterapia dentro de su régimen de tratamiento.

30

Según un duodécimo aspecto de la presente invención se proporciona un método de protección de una célula no tumoral frente a la quimioterapia o radioterapia, preferentemente quimioterapia, mediante la puesta en contacto de la células no tumorales o de una masa tumoral con un dímero isoflavonoide de fórmula (Ia).

35

En la totalidad de la presente memoria y en las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera lo contrario, el término "comprender" y variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entiende que implican la inclusión de un número entero o intervalo indicado o grupo de números enteros o intervalos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o intervalo o grupo de números enteros o intervalos.

40

Breve descripción de las figuras

45

La fig. 1 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la síntesis de PGE_2 en monocitos humanos incubados con LPS.

50

La fig. 2 muestra el efecto del compuesto 2 sobre la síntesis de PGE_2 en monocitos humanos incubados con LPS.

La fig. 3 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la síntesis de TXB_2 en monocitos humanos incubados con LPS.

La fig. 4 muestra el efecto del compuesto 2 sobre la síntesis de TXB_2 en monocitos humanos incubados con LPS.

55

La fig. 5 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la síntesis de $\text{TNF}\alpha$ en monocitos humanos incubados con LPS.

La fig. 6 muestra el efecto del compuesto 1 sobre la síntesis de $\text{TNF}\alpha$ en monocitos humanos incubados con LPS.

60

La fig. 7 muestra la actividad del compuesto 1 en macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con LPS.

La fig. 8 muestra la actividad del compuesto. 21 en macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con LPS.

5 La fig. 9 muestra el efecto del compuesto 2 sobre la contractilidad aórtica inducida por noradrenalina.

La fig. 10 muestra el efecto sinérgico del compuesto 2 y de la gemcitabina sobre las células HPAC (pancreáticas). El gráfico A ilustra la combinación de compuesto 2 y gemcitabina, mientras que B y C muestra la secuencia directa en 24 horas (compuesto 2 en primer lugar) e inversa (gemcitabina en primer lugar), respectivamente.

La fig. 11 muestra células HT-29 (colorrectales) tratadas secuencialmente con compuesto 2 (a 5 μM y 10 μM) y nueve concentraciones de gemcitabina diluidas en serie en secuencia tanto directa (A) como inversa (B).

La fig. 12 muestra el efecto sinérgico del compuesto 2 (a 1 μM y 2 μM) y del paclitaxel sobre células HT-29 (colorrectales). El gráfico A ilustra la combinación de compuesto 2 y paclitaxel, mientras que B y C muestra la secuencia directa en 24 horas (compuesto 2 en primer lugar) e inversa (paclitaxel en primer lugar), respectivamente.

La fig. 13 muestra el efecto sinérgico del compuesto 2 (a 1 μM y 2 μM) y del paclitaxel sobre células HCT-15 (colorrectales). El gráfico A ilustra la combinación de compuesto 2 y paclitaxel, mientras que B y C muestra la secuencia directa en 24 horas (compuesto 2 en primer lugar) e inversa (paclitaxel en primer lugar), respectivamente.

La fig. 14 muestra el efecto sinérgico del compuesto 2 (a 1 μM y 2 μM) y del doxirrubicina sobre células HT-29 (colorrectales). El gráfico A ilustra la combinación de compuesto 2 y doxirrubicina, mientras que B y C muestra la secuencia directa en 24 horas (compuesto 2 en primer lugar) e inversa (doxirrubicina en primer lugar), respectivamente.

La fig. 15 muestra el efecto sinérgico del compuesto 2 (a 1 μM y 2 μM) y de la doxirrubicina sobre las células HT-15 (colorrectales). El gráfico A ilustra la combinación de compuesto 2 y doxirrubicina, mientras que B y C muestra la secuencia directa en 24 horas (compuesto 2 en primer lugar) e inversa (doxirrubicina en primer lugar), respectivamente.

La fig. 16 muestra el efecto del compuesto 1 (a 10 μM) sobre la inhibición de la proliferación de las células T.

40 La fig. 17 muestra el efecto del compuesto 1 y del compuesto 2 (ambos a 10 μM) sobre la inhibición de la proliferación de las células T tras una preincubación de 24 horas.

La fig. 18 muestra una comparación entre el cambio del peso corporal tras la administración i/p de compuesto 2 (a 50 mg/kg/día) o vehículo.

45 Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han encontrado que una clase de dímeros isoflavonoides de fórmula general (Ia) muestra propiedades biológicas y farmacéuticas sorprendentes e inesperadas.

50 Los compuestos de fórmula (Ia) de la invención se cree que presentan perfiles de toxicidad favorables con células normales y buena biodisponibilidad. Inesperadamente, los compuestos de la invención muestran una actividad anticáncer significativamente mejor, o por lo menos comparable, a la de los tratamientos conocidos del cáncer.

55 Los compuestos de fórmula (Ia) son citostáticos y citotóxicos contra un amplio abanico de células de cáncer de origen humano y animal. La expresión "células de cáncer" se refiere a células que muestran características malignas y que se distinguen de las células no de cáncer por el crecimiento y comportamiento no regulados que habitualmente resulta en última instancia amenazante para la vida a menos que se trate con éxito.

60 Las células de cáncer que se ha encontrado que son sensibles a compuestos de fórmula (Ia) son de

origen epitelial (por ejemplo las células de cáncer prostático, ovárico, de cérvix, mamario, de vesícula biliar, pancreático, colorrectal, renal y pulmonar de células no pequeñas), de origen neural (por ejemplo células de cáncer de glioma) y de origen mesenquimal (por ejemplo las células de cáncer de melanoma, mesotelioma y sarcoma). Resulta altamente inusual e inesperado encontrar un grupo relacionado de

5

Ventajosamente, los compuestos de fórmula (Ia) muestran actividad citotóxica contra células de cáncer que han sido bien reconocidas como poco sensibles a los fármacos anticáncer estándares. Resulta altamente inusual e inesperado encontrar una actividad tan potente contra los cánceres leucémicos.

10

La invención también proporciona la utilización de compuestos de fórmula (Ia) para tratar pacientes con cáncer mediante la reducción de la tasa de crecimiento de dichos tumores o mediante la reducción del tamaño de dichos tumores mediante terapia con dichos compuestos solos y/o en combinación entre los mismos, y/o en combinación con otros agentes anticáncer y/o en combinación con radioterapia.

15

La utilización de compuestos de la presente invención individualmente o en terapia de combinación tal como se ha descrito anteriormente puede reducir los efectos secundarios adversos experimentados con frecuencia por los pacientes al tratarlos con tratamientos anticáncer estándares. La utilización de compuestos de la invención puede implicar que pueden utilizarse dosis inferiores en dicha terapia, lo que representa un importante avance para los individuos con cáncer.

20

Las moléculas diméricas de la presente invención se encuentran estructuralmente relacionadas con los compuestos isoflavonoides monoméricos y derivados de los mismos. Los términos "isoflavona" o "isoflavonoide" tal como se utilizan en la presente memoria debe interpretarse ampliamente que incluyen moléculas anulares de cromano o de benzopirano fusionadas que presentan un grupo fenilo colgante en la posición 3 del anillo de pirano. De esta manera, las clases de compuestos generalmente denominadas isoflavonas, isoflavenos, isoflavanos, isoflavanonas, isoflavanoles y similares se denominan genéricamente en la presente memoria isoflavonas, derivados de isoflavona o isoflavonoides.

25

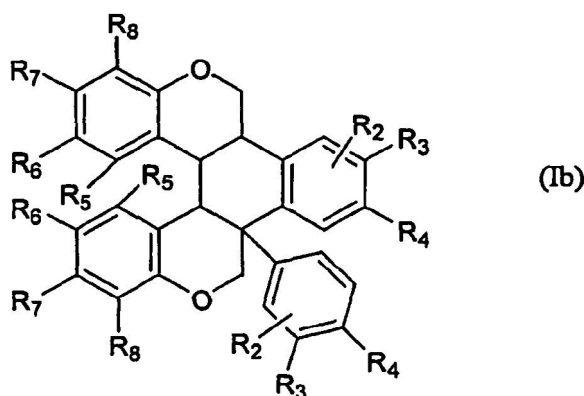
30

Las moléculas diméricas de la presente invención comprenden dos enlaces carbono-carbono que unen los dos monómeros. Las posiciones 4 en el anillo pirano de ambos monómeros isoflavonoide se unen mediante unión directa a través de un enlace carbono-carbono. El segundo enlace une la posición 2' del grupo 3-fenilo colgante de un monómero con la posición 3 del anillo pirano del segundo monómero isoflavonoide. Es decir, los métodos de la presente invención proporcionan un acceso simple y directo al sistema de anillos único 12a-fenil-nafto[1,2-g]criseno de la Estructura A genérica anteriormente indicada. Dependiendo del patrón de sustitución del grupo fenilo colgante, también puede hacerse referencia a la posición 2' correctamente como posición 6'.

35

40

Las moléculas diméricas más altamente preferentes de la presente invención se ilustran mediante la fórmula general (Ib):



45

R₂, R₃, R₅ y R₈

son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, t-butilo, fenilo o bencilo,

R₄ y R₇

son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉ o OSi(R₁₀)₃,

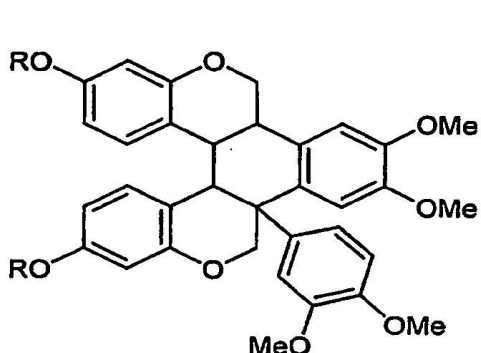
- R_6 es hidrógeno, hidroxilo, OR_9 , $OC(O)R_9$ o $OSi(R_{10})_3$,
 R_9 es metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, t-butilo o bencilo y
5 R_{10} es, independientemente, metilo, etilo o t-butilo,
más preferentemente presentan los sustituyentes siguientes, en los que:
 R_2 , R_3 y R_5 son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR_9 , $OC(O)R_9$ o metilo,
10 R_4 y R_7 son, independientemente, hidroxilo, OR_9 o $OC(O)R_9$,
 R_6 es hidrógeno, y
15 R_9 es metilo o bencilo.

Todavía más preferentemente, R_4 es metoxi, R_3 y R_4 son metoxi, y/o R_8 es metilo.

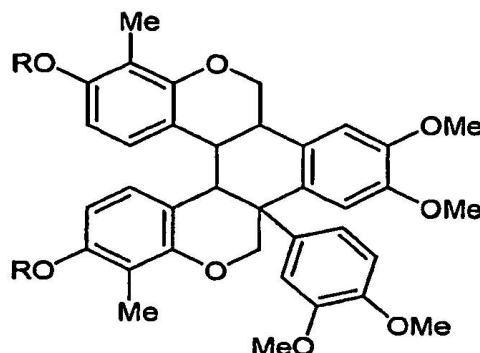
Más preferentemente, los nuevos compuestos diméricos de fórmula I son:

- 20 4,9-Dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (1)
25 4,9-Diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (1-Ac)
4,9-Dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2)
30 4,9-Diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2-Ac)

- 35 Los compuestos 1 y 2 y los derivados acetoxi 1-Ac y 2-Ac de los mismos se ilustran mediante las fórmulas estructurales siguientes:



(1) $R = H$,
(1-Ac) $R = Ac$



(2) $R = H$,
(2-Ac) $R = Ac$

Se prepararon compuestos preferentes adicionales mediante los mismos métodos con materiales de partida análogos. Los datos eran consistentes con los productos obtenidos. Los compuestos se denominan de la manera siguiente:

- 40 4,9-Dihidroxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (3),

- 5 4,9-Diacetoxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (3-Ac),
4,9-Dihidroxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidro-nafto[1,2-g]criseno (4),
- 10 4,9-Diacetoxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidro-nafto[1,2-g]criseno (4-Ac),
4,9,14-Trihidroxi-12a-(4'-hidroxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto [1,2-g]criseno (5),
- 15 4,9,14-Triacetoxi-12a-(4'-acetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (5-Ac),
4,9-Dihidroxi-15-metoxi-12a-(3'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (6),
- 20 4,9-Diacetoxi-15-metoxi-12a-(3'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (6-Ac),
4,9,15-Trihidroxi-12a-(3'-hidroxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (7),
- 25 4,9,15-Triacetoxi-12a-(3'-acetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (7-Ac).

30 El término "alquilo" se considera que se refiere a grupos alquilo tanto de cadena lineal como de cadena ramificada, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, butilo terciario y similares. El grupo alquilo presente entre 1 y 6 átomos de carbono, más preferentemente entre 1 y 4 átomos de carbono, todavía más preferentemente metilo, etilo, propilo, isopropilo o t-butilo.

El término "arilo" se refiere a fenilo y naftilo.

35 El término "halo" se considera que incluye flúor, cloro, bromo y yodo, preferentemente flúor, cloro y bromo, más preferentemente flúor. La referencia a, por ejemplo, "haloalquilo" incluye grupos alquilo monohalogenados, dihalogenados y hasta perhalogenados. Los grupos haloalquilo preferentes son trifluorometilo y pentafluoroetilo.

40 Todos los compuestos de la invención incluyen sales, tales como sales de adición de ácido, sales aniónicas y sales zwitterónicas, y en particular incluyen sales farmacéuticamente aceptables tal como sería conocido para el experto en la materia. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un grupo orgánico o inorgánico que porta una carga y que puede administrarse en asociación con un agente farmacéutico, por ejemplo en forma de contra-catión o contra-anión en una sal. Los cationes farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la materia, y entre ellos se incluyen,

45 aunque sin limitación, sodio, potasio, calcio, cinc y amina cuaternaria. Los aniones farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la materia e incluyen, aunque sin limitación, cloro, acetato, tosilato, citrato, bicarbonato y carbonato.

50 Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen aquellas formadas a partir de: ácido acético, ascórbico, aspártico, benzoico, bencenosulfónico, cítrico, cinámico, etanosulfónico, fumárico, glutámico, glutárico, glucónico, hidrocórico, hidrobromico, láctico, maleico, málico, metanosulfónico, naftoico, hidroxinaftoico, naftalenosulfónico, naftalenodisulfónico, naftalenoacrílico, oleico, oxálico, oxaloacético, fosfórico, pirúvico, p-toluenosulfónico, tartárico, trifluoroacético, trifenilacético, tricarba-alílico, salicílico,

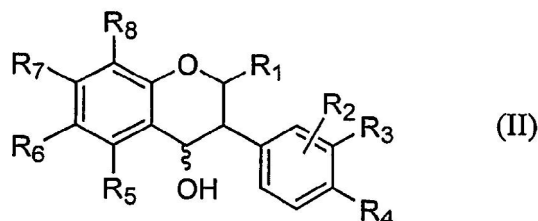
55 sulfúrico, sulfámico, sulfanílico y succínico.

La expresión "derivado farmacéuticamente aceptable" o "profármaco" se refiere a un derivado del compuesto activo que, tras la administración en el receptor, es capaz de proporcionar directa o indirectamente, el compuesto parental o metabolito, o que muestra actividad por sí mismo, e incluye, por ejemplo, derivados de fosfato y derivados de sulfonato. De esta manera, entre los derivados se incluyen solvatos, ésteres farmacéuticamente activos, profármacos o similares. Lo anterior también incluye derivados con grupos salientes fisiológicamente escindibles que pueden escindirse *in vivo*, proporcionando

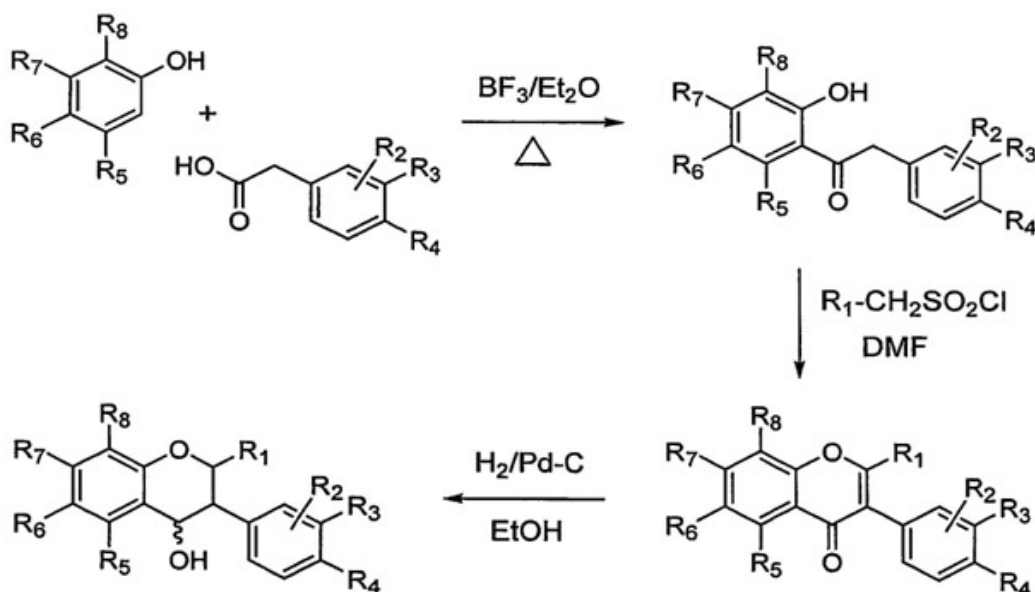
60

los compuestos de la invención o su grupo activo. Entre los grupos salientes pueden incluirse acilo, fosfato, sulfato, sulfonato y preferentemente son compuestos sustituidos con mono-aciloxi, di-aciloxi y per-aciloxi, en los que uno o más de los grupos hidroxilo colgantes se encuentra protegido por un grupo acilo, preferentemente un grupo acetilo. Típicamente, los compuestos sustituidos con aciloxi de la invención son fácilmente escindibles para formar los compuestos sustituidos con hidroxilo correspondientes.

La síntesis de los dímeros isoflavonoide de la presente invención se inicia convenientemente con isoflaván-4-oles monoméricos de la fórmula general (II):



- Dichos isoflaván-4-oles de partida o derivados de los mismos pueden obtenerse fácilmente mediante procedimientos estándares conocidos de la técnica. Las solicitudes publicadas de patente internacional WO n° 98/08503, n° 00/49009 y n° 01/17986 (todas de Novogen Research Pty Ltd.) y referencias citadas en las mismas, las exposiciones de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia, también proporcionan métodos sintéticos útiles para la producción de isoflavonas, isoflaván-4-oles y compuestos isoflavonoides relacionados a modo de monómeros de partida. Se ilustra una síntesis general representativa en el Esquema 1, posteriormente.

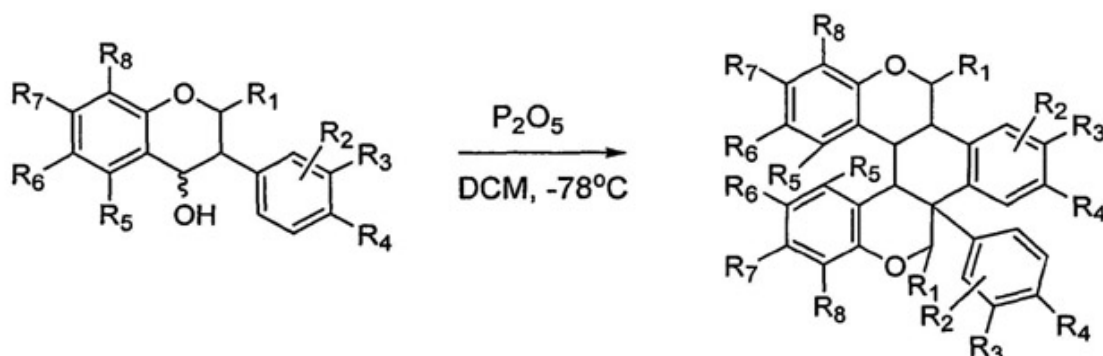


Esquema 1

Resulta posible el acceso a diversos patrones de sustitución en torno al anillo benzopirano y al anillo fenilo colgante de los isoflaván-4-oles mediante la selección de materiales de partida fenoles- R_5 - R_8 y ácido fenil-acético- R_2 - R_4 . Las reacciones de ciclización anular pueden llevarse a cabo convenientemente con reactivos de cloruro de metanosulfonilo R_1 -sustituidos, tal como sería conocido por el experto en la materia. La reacción de reducción se lleva a cabo con éxito con Pd-C o Pd-alúmina en un solvente alcohólico en presencia de hidrógeno. El experto en la materia conocerá el hecho de que pueden utilizarse otros métodos estándares de alquilación, ciclización, hidrogenación y/o reducción, según resulte apropiado.

Los monómeros isoflaván-4-ol con materiales de partida convenientes para la síntesis de las moléculas dimericas de la invención. La dimerización que rinde los derivados nafto[1,2-g]criseno se lleva a cabo

convenientemente en presencia de un reactivo de acoplamiento/deshidratación. Se ilustra una síntesis general representativa en el Esquema 2, posteriormente.



Esquema 2

5 Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, se sugiere que la reacción se produce mediante la formación de una olefina rica en electrones (isoflav-3-eno) que desactiva un carbocatión estabilizado de tipo bencílico en la posición 4 del anillo cromano en el segundo monómero. Se cree que la reorganización estimula un segundo carbocatión en la posición 3 de dicho segundo anillo de cromano, que seguidamente resulta desactivado por la posición 2' (ó 6') del grupo fenilo colgante rico en electrones. A continuación, la reorganización adicional proporciona los compuestos isoflavonoides diméricos resultantes de la invención.

10 El grupo fenilo rico en electrones preferentemente es un grupo fenilo 4 ó 2-sustituido, 2,4 ó 3,4-disustituido, ó 2,3,4 ó 3,4,5-trisustituido que presenta uno o más grupos donadores de electrones. Los compuestos 3,4-disustituidos ricos en electrones resultan más preferentes.

15 En una realización preferente, el agente de acoplamiento de elección es pentaóxido de fósforo, aunque el experto en la materia comprenderá que pueden utilizarse otros métodos y reactivos según resulte apropiado. Entre dichos métodos sintéticos adecuados alternativos se incluyen el acoplamiento mediante alquilación de Friedl-Crafts de dos isoflavonoides. Se obtienen condiciones de reacción de Friedel-Crafts típicas con reactivos tales como cloruro de aluminio, trifluoruro de boro o catalizadores ácidos de Lewis similares. La reacción de acoplamiento no se encuentra limitada a condiciones de tipo Friedel-Crafts, sino

20 que puede incluir otras condiciones de reacción que pueden generar una especie de "carbocatión" tales como la conversión de un alcohol secundario en un éster fosfínico o grupo saliente fácil similar. También pueden utilizarse condiciones de reacción de acoplamiento oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, permanganato diluido, pentaóxido de fósforo, tal como se ha indicado anteriormente, u otros compuestos oxidantes, en la síntesis de las moléculas diméricas de la invención.

25 Las reacciones de dimerización pueden llevarse a cabo entre temperaturas muy bajas y la temperatura ambiente; sin embargo, se observa generalmente que las temperaturas de reacción inferior conducen a rendimientos mejores y a mezclas de reacción más limpias. Las reacciones convenientemente se llevan a cabo a $-78^\circ C$ con baños de acetona/hielo seco.

30 Los solventes adecuados para la utilización en los métodos de la invención preferentemente deberían ser líquidos a temperatura muy baja, y entre ellos se incluyen los solventes clorados inferiores, THF y acetonitrilo. El solvente de elección es el diclorometano. Se ha encontrado que resulta preferente una elevada proporción de sustrato a solvente, y la proporción DCM:sustrato óptima es de aproximadamente 4:1 para las reacciones de deshidratación/ciclización bimoleculares favorecidas.

35 Puede utilizarse la protección y desprotección químicas de grupos funcionales, los sintones y otras técnicas conocidas por el experto en la materia, en donde resulte apropiado, para ayudar en la síntesis de los compuestos de la presente invención, y los materiales de partida de los mismos.

40 La protección de grupos funcionales en los compuestos y derivados de la presente invención puede llevarse a cabo mediante métodos bien establecidos de la técnica, por ejemplo tal como se describe en T.W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1981.

45 Entre los grupos protectores de hidroxilo se incluyen, aunque sin limitación, los ésteres de ácido carboxílico, por ejemplo los ésteres de acetato, ésteres de arilo tales como benzoato, acetales/cetales

tales como acetónido y bencilideno, éteres tales como éter o-bencílico y éter p-metoxi-bencílico, éter tetrahidropiránílico y éteres silílicos tales como éter t-butildimetil-silílico.

5 Los grupos protectores pueden eliminarse mediante, por ejemplo, hidrólisis o reducción catalizadas por ácido o basa, por ejemplo la hidrogenación. Los éteres silílicos pueden requerir que se escinda el fluoruro de hidrógeno o el fluoruro de tetrabutylamonio. La desmetilación de los grupos metoxi proporciona acceso a compuestos hidroxi-sustituídos.

10 Los monómeros isoflaván-4-ol de partida preferentes se cree que requieren sustituyentes ricos en electrones en el grupo 3-fenilo del isoflavonoide para la formación fácil de los dímeros de 2 enlaces de carbono de la presente invención. Por ejemplo, se encuentra que resultan particularmente preferentes los derivados 3-fenilo hidroxi-polisustituídos (hidroxi opcionalmente protegido) y alcoxi-polisustituídos.

15 Los presentes inventores inesperadamente han encontrado que las moléculas diméricas de la presente invención forman una familia de nuevos compuestos sustancialmente prometedores en el campo farmacéutico para el tratamiento y prevención de un abanico de importantes enfermedades humanas, incluyendo cánceres, trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunológicos, trastornos cardiovasculares y trastornos asociados a la activación de los receptores de estrógeno.

20 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención a través de su potente capacidad para inhibir la proliferación de las células de cáncer y de inducir la apoptosis muestran utilidad en la prevención y tratamiento de cánceres, un término que cualquier experto en la materia entendería que comprende el crecimiento aberrante de naturaleza tanto benigna como maligna de cualquiera o todos los tejidos corporales, de tipos epitelial, mesenquimial y neural. Lo anterior incluye, aunque sin limitación, carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, blastomas, adenomas, linfomas, leucemias y gliomas.

25 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención, a través de su potente capacidad para actuar como agonistas del h-ER β , son capaces de proporcionar soporte estrogénico, en particular a mujeres de edad perimenopáusica y menopáusica, y de prevenir y tratar problemas identificados generalmente como representativos de la retirada aguda de los estrógenos esteroideos, tales como síntomas vasomotores (sofocos y sudores nocturnos) y síntomas emocionales (ansiedad, depresión, cambios de humor), problemas identificados generalmente como representativos de la retirada subaguda de estrógenos esteroideos tales como la incontinencia urinaria y el prolapso de vejiga, y problemas identificados generalmente como representativos de la retirada crónica de estrógenos esteroideos tales como la osteopenia y la osteoporosis y la disfunción cognitiva.

30 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención a través de su potente capacidad de actuar como antagonistas de h-ER α son capaces de prevenir o de tratar condiciones en mujeres premenopáusicas generalmente consideradas como asociadas a una estimulación excesiva de los receptores de h-ER α y que conducen a condiciones tales como la mastalgia cíclica, la endometriosis, la hiperplasia endometrial, los fibroides uterinos, la enfermedad ovárica poliquística y el síndrome premenstrual.

35 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención a través de su potente capacidad de inducir vasodilatación y de reducir el vasoespasmo, resultan de utilidad en el tratamiento y la prevención de trastornos identificados generalmente como asociados a la vasopresión, causal o indirectamente, y que comprende, aunque sin limitación, la hipertensión y la cefalea migrañosa.

40 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención a través de su potente capacidad de inhibir procesos inflamatorios y de moderar procesos inmunológicos, resultan de utilidad en la prevención y tratamiento de trastornos identificados generalmente como asociados a la inflamación excesiva o a una función inmunológica disfuncional, comprendiendo, aunque sin limitación, condiciones inflamatorias del tracto gastrointestinal, incluyendo las enfermedades intestinales inflamatorias (entre ellas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn), la colangitis esclerosante, los trastornos inflamatorios de las membranas sinoviales, incluyendo la artritis reumatoide, las condiciones inflamatorias del sistema respiratorio, incluyendo el asma, así como las enfermedades autoinmunológicas, entre ellas la glomerulonefritis. Los compuestos de la invención también resultan útiles en el tratamiento del dolor asociado a inflamación. Resulta importante que los compuestos son cardioprotectores y/o protectores intestinales, lo que se cree se debe a su acción como inhibidores selectivos de la síntesis del tromboxano.

45 En particular, los compuestos diméricos de la presente invención a través de su potente capacidad de inhibir la androgénesis resultan de utilidad en la prevención y tratamiento de condiciones generalmente

identificadas como asociadas (causal o indirectamente) a la función aberrante de los andrógenos y entre ella se incluye, aunque sin limitación, la calvicie de patrón masculino (alopecia hereditaria) y el adenoma prostático.

5 Los compuestos diméricos isoflavonoides de la invención también resultan inesperadamente activos en el incremento de la sensibilidad de las células de cáncer a un amplio abanico de tratamientos anticáncer (incluyendo agentes quimioterapéuticos y terapia de radiación) con modos de acción ampliamente diferentes. También se ha encontrado que los compuestos de la invención restituyen la sensibilidad a
10 aquellos mismos agentes en células que han adquirido resistencia a dichos agentes y métodos de tratamiento.

En una realización preferente, el paciente de cáncer se pretrata con un compuesto de fórmula (Ia) previamente a la radioterapia o tratamiento con un segundo agente quimioterapéutico. Sin embargo, se contempla que pueda utilizarse cualquier secuencia para la administración de un compuesto de fórmula
15 (Ia) y la radioterapia o la administración del segundo agente quimioterapéutico o ambos.

En una realización adicional, el compuesto de fórmula (Ia) se administra tras observar resistencia, inherente o adquirida, a la radioterapia en un paciente con cáncer.

20 En una realización adicional, el compuesto de fórmula (Ia) se administra tras observar resistencia, inherente o adquirida, al agente quimioterapéutico en un paciente con cáncer.

Según otro aspecto se proporciona una terapia de combinación que comprende administrar en un sujeto sometido a radioterapia, o que próximamente será sometido a radioterapia, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (Ia). La administración puede ser secuencial o simultánea o tras el desarrollo de radorresistencia en el sujeto.
25

Según otro aspecto se proporciona una terapia de combinación que comprende administrar en un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (Ia) y un agente quimioterapéutico. La administración puede ser secuencial o simultánea o tras el desarrollo de quimiorresistencia en el sujeto.
30

En una realización preferente, la condición bajo tratamiento preferentemente es cáncer que manifiesta características malignas pero que puede incorporar estadios más tempranos de cáncer tales como lesiones premalignas (por ejemplo atipia, displasia, neoplasia intraepitelial) y cánceres benignos.
35

Las expresiones "radioterapia" o "terapia de radiación" se considera ampliamente que incluye métodos de tratamiento o terapia con partículas y/o ondas energéticas que afectan a las células cancerosas, tumores o mecanismos relacionados, y procesos biológicos. En particular, la radiación es una onda o partícula de alta energía tal como un rayo X, electrón, rayo gamma o protón utilizado en radioterapia. Más
40 preferentemente, la onda o partícula es un rayo X.

La expresión "agente quimioterapéutico" se considera ampliamente que incluye todos los fármacos, compuestos químicos, compuestos, composiciones, agentes, fármacos, polímeros, péptidos, proteínas y similares que afectan a las células cancerosas, tumores o mecanismos relacionados, y procesos biológicos.
45

Los isoflavonoides diméricos de la invención representan una prometedora clase nueva de fármacos quimioterapéuticos en la prevención y tratamiento del cáncer. La base exacta de la acción farmacológica de dichos compuestos no se conoce por completo, pero el resultado es la citostasis y la citotoxicidad. Resulta de considerable interés en esta familia de compuestos el hecho de que muestren una amplia actividad contra los cánceres humanos y animales, y que son altamente selectivos para las células de cáncer.
50

Se ha demostrado que los isoflavonoides diméricos son potentes agentes anticáncer y que inesperadamente actúan sinérgicamente con quimioterapéuticos tales como el cisplatino y la gemcitabina, aunque estos dos fármacos quimiotóxicos estándares presentan efectos anticáncer bastante diferentes dentro de la célula.
55

Más inesperadamente, los presentes inventores han encontrado que las isoflavonas o derivados incrementan o restituyen la sensibilidad de las células cancerosas y tumores a los efectos de la terapia de radiación.
60

Los regímenes de tratamiento pueden incluir un único tratamiento o un curso de tratamientos, denominados fracciones, durante varias semanas. El tratamiento fraccionado típicamente se proporciona una vez al día, por ejemplo de lunes a viernes con descansos intermitentes tales como los fines de semana para ayudar a las células normales a recuperarse. El regimen de tratamiento actual depende en gran medida del tipo de cáncer que debe tratarse y del tipo de radioterapia que debe utilizarse. El experto en la materia podrá determinar mejor el regimen más adecuado para cada individuo considerando diversos factores, incluyendo la salud del paciente, la progresión de la enfermedad y el tipo de cáncer.

En una realización preferente, las isoflavonas o derivados de las mismas se administran antes de la radioterapia. El efecto del pretratamiento es sensibilizar las células cancerosas o tumores a los efectos de la radiación. El pretratamiento de isoflavonoide debe iniciarse bien antes y/o durante la radioterapia con el fin de presentar un efecto sobre la capacidad de las células diana de resistir la radiación. En una realización preferente más amplia, el pretratamiento se lleva a cabo durante un tiempo y duración suficientes para poner en contacto las células cancerosas o tumor con el isoflavonoide administrado. Este tiempo típicamente puede ser 7 días ó 14 días, o hasta 30 días. En otra realización preferente, el tratamiento de isoflavonoide se realiza 6 días antes de la radioterapia, ó 5 días, ó 3 días ó 2 días ó 1 día antes.

En otras circunstancias puede resultar beneficioso administrar los isoflavonoides el día de la radioterapia, que todavía puede presentar el efecto de contribuir a la muerte celular mediante la eliminación de los bloqueantes de la apoptosis o el incremento de la tasa de degradación.

En el caso de que el tratamiento incluya el tratamiento fraccionado, la administración del isoflavonoide puede realizarse en los tiempos indicados antes del primer tratamiento o con sólo una parte antes de cada tratamiento de radiación.

En otra realización preferente se encuentra que la administración de los isoflavonoides puede restituir o por lo menos tratar problemas de sensibilidad que pueden producirse tras el tratamiento de radiación. A este respecto, en otra realización preferente, la administración de los isoflavonoides se realiza después del tratamiento de radiación.

Los agentes quimioterapéuticos se clasifican generalmente como agentes de interacción con el ADN, antimetabolitos, agentes interactivos con la tubulina, agentes hormonales y otros agentes, tales como la asparaginasa y la hidroxiurea. Cada uno de los grupos de agentes quimioterapéuticos puede clasificarse adicionalmente según el tipo de actividad o compuesto. Los agentes quimioterapéuticos utilizados en combinación con el compuesto isoflavonoide de fórmula (Ia) de la presente invención, o sales del mismo de la presente invención, pueden seleccionarse de entre cualquiera de estos grupos, aunque no se encuentran limitados a ellos. Para un comentario detallado de los agentes quimioterapéuticos y su método de administración, ver Dorr *et al.*, Cancer Chemotherapy Handbook, 2a edición, páginas 15 a 34, Appleton y Lang (Connecticut, 1994), incorporado en la presente memoria como referencia.

Entre los agentes de interacción con el ADN se incluyen agentes alquilantes, por ejemplo cisplatino, ciclofosfamida, altretamina, agentes de rotura de la cadena de ADN tales como la bleomicina; inhibidores intercalantes de la topoisomerasa II, por ejemplo dactinomicina y doxorubicina, inhibidores no intercalantes de la topoisomerasa II tales como etopósido y tenipósido; y el ligante del surco menor del ADN plicamidina, por ejemplo.

Los agentes alquilantes forman compuestos químicos covalentes con ADN, ARN o moléculas de proteína de la célula, o con aminoácidos, glutatión o compuestos químicos similares, de menor tamaño. Generalmente, los agentes alquilantes reaccionan con un átomo nucleofílico en un constituyente celular, tal como un grupo amino, carboxilo, fosfato o sulfhidrilo en ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos o en el glutatión. El mecanismo y el papel de estos agentes alquilantes en la terapia de cáncer no se entiende por completo.

Entre los agentes alquilantes típicos se incluyen, aunque sin limitación, muestras nitrogenadas tales como clorambucilo, ciclofosfamida, isofamida, mecloretamina, melfalán, mostaza uracilo; aziridina tal como tiotepa; ésteres de metanosulfonato tales como el busulfán; nitrosoureas tales como carmustina, lomustina, estreptozocina; complejos del platino tales como cisplatino, carboplatino; alquilador biorreductor tal como mitomicina y procarbazona, dacarbazina y altretamina.

Entre los agentes de rotura del ADN se incluyen, por ejemplo, la bleomicina.

Entre los inhibidores de la ADN topoisomerasa II se incluyen los intercalantes siguientes, tales como amsacrina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina y mitoxantrona; no intercalantes, tales como etopósido y tenipósido, por ejemplo.

- 5 Un ligante de surco menor del ADN es la plicamicina, por ejemplo.

Los antimetabolitos interfieren con la producción de los ácidos nucleicos mediante dos mecanismos principales. Determinados fármacos inhiben la producción de desoxirribonucleósidos trifosfato que son los precursores inmediatos de la síntesis de ADN, inhibiendo de esta manera la replicación del ADN. Algunos de los compuestos son análogos de purinas o pirimidinas y se incorporan en rutas anabólicas de nucleótidos. A continuación se sustituyen dichos análogos en ADN o ARN en lugar de sus contrapartidas normales.

15 Entre los antimetabolitos que resultan útiles en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, antagonistas del folato tales como metotrexato y trimetrexato; antagonistas de pirimidina tales como fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, CB3717, azacitidina, citarabina y floxuridina; entre los antagonistas de purina se incluyen mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, pentostatina y entre los inhibidores de la ribonucleótido reductasa se incluyen la hidroxiurea.

20 Los agentes de interacción con la tubulina actúan mediante la unión a sitios específicos de la tubulina, una proteína que se polimeriza formando microtúbulos celulares. Los microtúbulos son unidades celulares estructurales críticas. Al unirse a la proteína los agentes de interacción, la célula no puede formar microtúbulos. Entre los agentes de interacción con la tubulina se incluyen vincristina y vinblastina, ambos alcaloides, y el paclitaxel (Taxol), por ejemplo.

25 Los agentes hormonales también resultan útiles en el tratamiento de cánceres y tumores. Se utilizan en tumores susceptibles hormonalmente y habitualmente se derivan a partir de fuentes naturales. Entre los agentes hormonales se incluyen, aunque sin limitación, estrógenos, estrógenos conjugados y etinil-estradiol y dietilestilbestrol, clortrianisén e idenestrol; progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona y megestrol, y andrógenos tales como testosterona, propionato de testosterona, fluoximesterona y metilttestosterona.

35 Los corticoesteroides adrenales se derivan a partir de cortisol adrenal natural o hidrocortisona. Se utilizan debido a sus beneficios antiinflamatorios, así como debido a la capacidad de algunos de inhibir las divisiones mitóticas y de detener la síntesis del ADN. Entre estos compuestos se incluyen, aunque sin limitación, prednisona, dexametasona, metilprednisolona y prednisolona.

40 Los agentes hormonales de liberación de hormona luteinizante o los antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina se utilizan principalmente en el tratamiento del cáncer prostático. Entre ellos se incluyen el acetato de leuprólido y el acetato de goserelina. Impiden la biosíntesis de los esteroides en los testículos.

45 Entre los antígenos antihormonales se incluyen, por ejemplo, agentes antiestrogénicos tales como tamoxifeno, agentes antiandrógeno tales como flutamida, y agentes antiadrenales tales como mitotano y aminoglutetimida.

50 Entre los agentes adicionales se incluyen los siguientes: la hidroxiurea aparentemente actúa principalmente mediante la inhibición del enzima ribonucleótido reductasa, y la asparaginasa es un enzima que convierte la asparagina en ácido aspártico no funcional y de esta manera bloque la síntesis de proteínas en el tumor.

55 Los agentes quimioterapéuticos preferentes son cisplatino, carboplatino, taxol (paclitaxel), fluorouracilo, fluxuridina, ciclofosfamida, ifosfamida, hexametilmelamina, estramustina, mitomicina y docetaxel. La cantidad de uno o más compuestos de fórmula (Ia) que resulta necesaria en un tratamiento terapéutico según la invención dependerá de varios factores, entre ellos la aplicación específica, la naturaleza del compuesto particular utilizado, la condición bajo tratamiento, el modo de administración y la condición del paciente. Los compuestos de fórmula (Ia) pueden administrarse de un modo y en una cantidad tales como los utilizados convencionalmente (ver, por ejemplo, Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1299 (7a edición, 1985)). La dosis específica utilizada dependerá de la condición bajo tratamiento, del estado del sujeto, de la vía de administración y de otros factores bien conocidos, tal como se ha indicado anteriormente. En general, una dosis diaria por paciente puede encontrarse comprendida en el intervalo de 0,1 mg a 2 g; típicamente de 0,5 mg a 1 g; preferentemente de 20 a 200 mg.

La producción de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las indicaciones terapéuticas indicadas en la presente memoria típicamente implica la preparación de una mezcla de los compuestos de la invención (convenientemente denominados en lo sucesivo "compuestos activos") con uno o más portadores y/o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables, tal como es bien conocido de la técnica.

El portador debe ser, evidentemente, aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe resultar perjudicial para el sujeto. El portador o excipiente puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y preferentemente se formula con el compuesto en forma de una dosis unitaria, por ejemplo una tableta, que puede contener entre 0,5% y 59% en peso del compuesto activo, o hasta 100% en peso del compuesto activo. Puede incorporarse uno o más compuestos activos en las formulaciones de la invención, que pueden prepararse mediante cualquiera de las bien conocidas técnicas farmacéuticas, que consisten esencialmente en la mezcla de los componentes, opcionalmente incluyendo uno o más ingredientes accesorios.

Entre las formulaciones de la invención se incluyen aquéllas adecuadas para la administración oral, rectal, óptica, bucal (por ejemplo sublingual), parenteral (por ejemplo subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa) y transdérmica, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la condición bajo tratamiento y de la naturaleza del compuesto activo particular que se está utilizando.

La formulación que resulta adecuada para la administración oral puede presentarse en unidades discretas, tales como cápsulas, sobres, pastillas o tabletas, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de unos polvos o gránulos; en forma de una solución o de una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. Dichas formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método farmacéutico adecuado que incluya la etapa de asociar el compuesto activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios tal como se ha indicado anteriormente). En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y después, en caso necesario, conformando la mezcla resultante de manera que forme una dosis unitaria. Por ejemplo, puede prepararse una tableta mediante la compresión o moldeo de unos polvos o gránulos que contengan el compuesto activo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Pueden prepararse tabletas comprimidas mediante la compresión, en una máquina adecuada, del compuesto de flujo libre, tal como unos polvos o gránulos opcionalmente mezclados con un ligante, lubricante, diluyente inerte y/o uno o más agentes activos en superficie/dispersantes. Pueden prepararse tabletas moldeadas mediante moldeo, en un aparato adecuado, el compuesto en polvo humectado con un ligante líquido inerte.

Entre las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) se incluyen píldoras que comprenden el compuesto activo en una base saborizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto, y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las composiciones de la presente invención que resultan adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente preparaciones acuosas estériles de los compuestos activos, las cuales preferentemente son isotónicas con la sangre del receptor al que están destinadas. Dichas preparaciones preferentemente se administran por vía intravenosa, aunque la administración también puede llevarse a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular o intradérmica. Dichas preparaciones pueden prepararse convenientemente mezclando el compuesto con agua o un tampón de glicina y convirtiendo la solución resultante en estéril e isotónica con la sangre. Las formulaciones inyectables según la invención generalmente contienen entre 0,1% y 60% p/v del compuesto activo y se administran a un caudal de 0,1 ml/minuto/kg.

Las formulaciones adecuadas para la administración rectal preferentemente se presentan en forma de supositorios de dosis unitaria. Pueden prepararse mediante la mezcla del compuesto activo con uno o más portadores sólidos convencionales, por ejemplo manteca de cacao, y después conformando la mezcla resultante.

Las formulaciones o composiciones adecuadas para la administración tópica en la piel preferentemente se presentan en la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, spray, aerosol o aceite. Entre los portadores que pueden utilizarse se incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y una

combinación de dos o más de los mismos. El compuesto activo se encuentra generalmente presente a una concentración de entre 0,1% y 0,5% p/p, por ejemplo entre 0,5% y 2% p/p. Entre los ejemplos de dichas composiciones se incluyen las cremas cosméticas para la piel.

- 5 Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse en forma de parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Dichos parches convenientemente contienen el compuesto activo en forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de una concentración de, por ejemplo, entre 0,1 y 0,2 M con respecto a dicho compuesto activo.
- 10 Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden administrarse mediante iontoforesis y típicamente se presentan en forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas comprenden tampón citrato o Bis/Tris (pH 6) o etanol/agua y contienen entre 0,1 y 0,2 M de ingrediente activo.
- 15 Las formulaciones adecuadas para la inhalación pueden administrarse en forma de una composición de spray en forma de una solución, suspensión o emulsión. La composición de spray para inhalación puede comprender además un propelente farmacéuticamente aceptable tal como dióxido de carbono u óxido nítrico. Las composiciones de la invención también pueden administrarse en un ser humano en una forma de suplemento dietético. Pueden prepararse suplementos dietéticos que incorporan los principios activos mediante la adición de la composición a un alimento durante el procedimiento de preparación del alimento, tal como mediante la adición, mezcla, recubrimiento, combinación o de otro modo, a un producto alimenticio. Puede utilizarse cualquier alimento, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, carnes tales como carnes picadas, carnes emulsionadas y carnes marinadas; bebidas tales como bebidas nutricionales, bebidas deportivas, bebidas enriquecidas en proteínas, zumos, leche, sucedáneos lácteos, y bebidas para la pérdida de peso; quesos tales como quesos duros y blandos, queso crema y queso Cottage; postres congelados tales como helado, leche helada, postres congelados bajos en grasas y postres congelados no lácteos; yogures; sopas; pudins; productos de panadería; aliños para ensalada; y salsas para mojar y untar tales como mayonesa, margarina, mantequilla, sucedáneos de mantequilla, y otras salsas untarables que contienen grasas. La composición se añade al alimento en una cantidad seleccionada para que administre una dosis deseada de la composición en el consumidor del alimento. Las formulaciones alimentarias que contienen compuestos de la invención pueden prepararse fácilmente según prácticas estándares.
- 30 Los métodos terapéuticos, usos y composiciones pueden estar destinados a la administración en seres humanos o animales, tales como animales de compañía y domésticos (por ejemplo perros y gatos), aves (por ejemplo pollos, pavos, patos), animales de ganado (por ejemplo vacas, ovejas, cerdos y cabras) y similares.
- 35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" debe considerarse en su contexto más amplio. El término no implica necesariamente que un animal se encuentra bajo tratamiento hasta su recuperación total. De acuerdo con lo anterior, el término "tratamiento" incluye la mejora de los síntomas o severidad de una condición particular, o la prevención o de otro modo la reducción del riesgo de desarrollar una condición particular.
- 40 La expresión "portador, excipiente, auxiliar y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria debe considerarse que incluye cualquier portador, excipiente, auxiliar o diluyente que se considere útil para preparar una composición farmacéutica. Dichos portadores, excipientes, auxiliares o diluyentes generalmente son seguros, no tóxicos y no son indeseables ni biológicamente ni de otro modo. El término también incluye portadores, excipientes, auxiliares o diluyentes que resultan aceptables para la utilización veterinaria, así como para la utilización farmacéutica humana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portadores, excipientes, auxiliares y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables" incluye una o más de una de dichas sustancias.
- 45 El compuesto activo o profármacos derivados farmacéuticamente aceptables o sales de los mismos también pueden coadministrarse con otros materiales activos que no perjudiquen la acción deseada, o con materiales que suplementen la acción deseada, tales como antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios o compuestos antivirales. El agente activo puede comprender dos o más isoflavonas o derivados de las mismas en combinación o en una mezcla sinérgica. Los compuestos activos también pueden administrarse con agentes reductores de los lípidos, tales como probucol y ácido nicotínico; inhibidores de la agregación plaquetaria tales como la aspirina; agentes antitrombóticos tales como coumadina; bloqueantes de los canales del calcio tales como verapamil, diltiazem y nifedipina; inhibidores del enzima
- 50
- 55
- 60

conversor de la angiotensina (ACE) tales como captopril y enalapril y β -bloqueantes tales como propanolol, terbutalol y labetalol. Los compuestos también pueden administrarse en combinación con antiinflamatorios no esteroideos tales como ibuprofeno, indometacina, aspirina, fenoprofeno, ácido mefenámico, ácido flufenámico y sulindac. Los compuestos también pueden administrarse con

5

Los compuestos de fórmula (Ia) aparentemente resultan particularmente adecuados para la coadministración con otros fármacos anticáncer tales como gemcitabina, doxorubicina, cisplatino, paclitaxol y/o deshidroequol (DHE). Lo anterior puede resultar en efectos mejorados en el tratamiento en

10

La coadministración puede ser simultánea o secuencial. La administración simultánea puede llevarse a cabo con los compuestos en la misma dosis unitaria o en dosis unitarias individuales y discretas administradas simultáneamente o en tiempos similares. La administración secuencial puede realizarse en cualquier orden según resulte necesario, y típicamente requerirá que el efecto fisiológico del primer agente activo o agente activo inicial no haya desaparecido al administrar el segundo o posterior agente activo, especialmente en el caso de que se desee un efecto acumulativo o sinérgico.

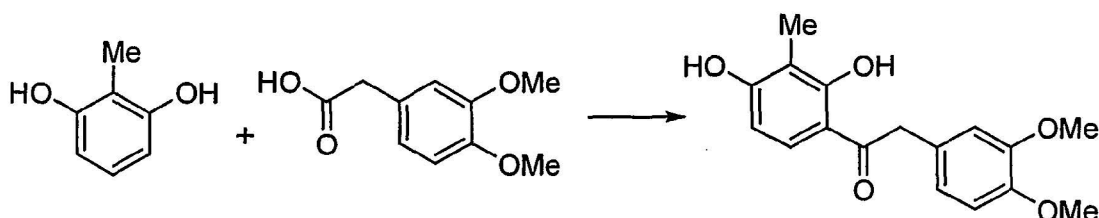
15

La invención se describe adicionalmente haciendo referencia a los ejemplos no limitativos siguientes.

20

Reacciones de condensación

Ejemplo 1.1

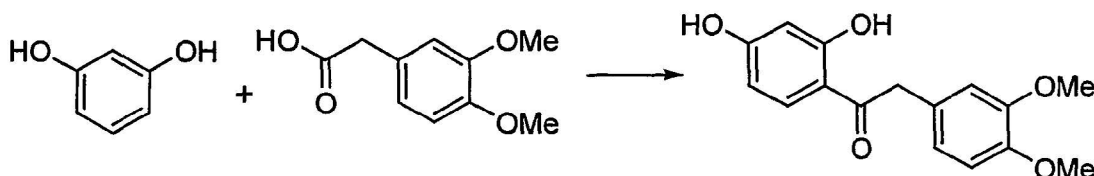


25

Se secaron 2-metil-resorcinol (62,2 g) y ácido 3,4-metoxifenil-acético (92,3 g) sobre P_2O_5 durante 4 días. Se añadió dietil-eterato de trifluoruro de boro (350 ml) a los sólidos en un matraz de fondo redondo y la mezcla se agitó bajo nitrógeno con calentamiento a 100°C durante 100 minutos. La solución se enfrió hasta la temperatura ambiente durante 2 horas y el precipitado resultante se recogió y se lavó con un exceso de agua, proporcionando 1-(2,4-dihidroxi-3-metilfenil)-2-(3,4-dimetoxifenil)-etanona en forma de un sólido marrón (93 g, 65%).

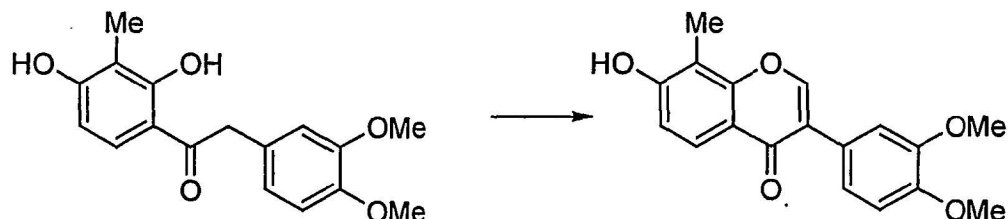
30

Ejemplo 1.2



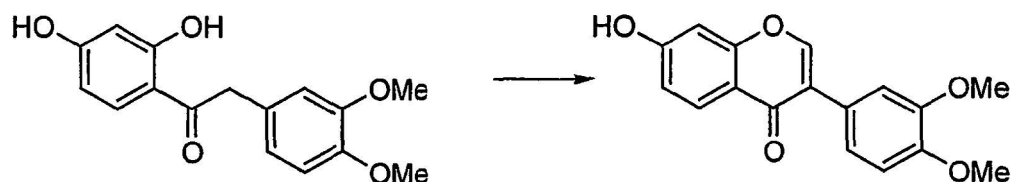
35

De un modo similar al Ejemplo 1.1, anteriormente, se secaron resorcinol y ácido 3,4-metoxifenil-acético y se hicieron reaccionar en presencia de dietil-eterato de trifluoruro de boro, proporcionando 1-(2,4-dihidroxi-3-metilfenil)-2-(3,4-dimetoxifenil)etanona. Otros productos de condensación son obtenibles mediante la utilización de los compuestos precursores apropiadamente sustituidos.

Reacciones de ciclización**Ejemplo 2.1**

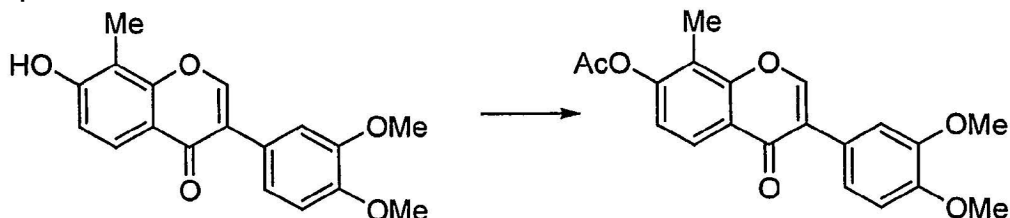
- 5 Se sometió 1-(2,4-dihidroxi-3-metil-fenil)-2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etanona (92,9 g) disuelta en DMF (140 ml, secados sobre MgSO_4 durante 15 minutos) a atmósfera de nitrógeno. Se añadió dietil-eterato de trifluoruro de boro destilado (140 ml) durante 40 minutos a la solución bajo agitación a temperatura ambiente. Se añadió una solución de cloruro de metanosulfonilo (75 ml) en DMF (190 ml) a una temperatura de entre 52°C y 55°C durante 20 minutos durante los cuales la mezcla de reacción adquirió un color amarillo. La
10 reacción se calentó bajo reflujo durante 80 minutos y se realizó un seguimiento mediante HPLC, después de lo cual se dejó que se enfriase hasta la temperatura ambiente.

- La solución marrón oscuro se vertió en agua fría agitada vigorosamente (3 porciones de 1.250 ml). Durante la noche (bajo agitación continua) precipitó el sólido amarillo. Se lavó el sólido con agua y se
15 recogió mediante filtración. Se secó el sólido, rindiendo 3-(3,4-dimetoxi-fenil)-7-hidroxi-8-metil-cromen-4-ona en forma de un sólido amarillo (94,8 g, 99%).

Ejemplo 2.2

- 20 De una manera similar a la del Ejemplo 2.1, anteriormente, a 1-(2,4-dihidroxifenil)-2-(3,4-dimetoxifenil)-etanona disuelta en DMF se añadió dietil-eterato de trifluoruro de boro seguido de cloruro de metanosulfonilo en DMF. La adición de agua a la mezcla de reacción proporcionó 3-(3,4-dimetoxifenil)-7-hidroxicromen-4-ona.

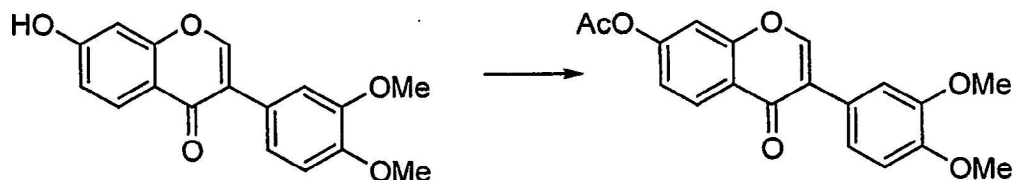
25

Reacciones de acetilación**Ejemplo 3.1**

- 30 Se suspendió 3-(3,4-dimetoxi-fenil)-7-hidroxi-8-metilcromen-4-ona (94,8 g) en anhídrido acético (450 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió piridina (23 ml) y la mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 1 hora. Se enfrió el recipiente durante la noche a -18°C, produciendo un sólido cristalino dentro de la mezcla de reacción. Ésta se filtró y se lavó el sólido con el filtrado y agua adicional (500 ml), rindiendo un sólido marrón. El lavado adicional con etanol produjo un sólido cristalino blanco. Se secó el sólido
35 durante la noche en un desecador, rindiendo 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-8-metilcromen-4-ona (44,7 g, 42%). RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,32 (s, 3H, CH_3), 2,39 (s, 3H, OCOCH_3), 3,92 and 3,93 (each s, 3H, OCH_3),

6,93 (d, 1H, J 8,3 Hz, ArH), 7,06 (dd, 1H, J 1,9 Hz 8,3 Hz, ArH), 7,13 (d, 1H, J 8,6 Hz, ArH), 7,22 (d, 1H, J 1,9 Hz, H8), 8,07 (s, 1H, H2), 8,33 (d, 2H, J 8,6 Hz, ArH).

Ejemplo 3.2

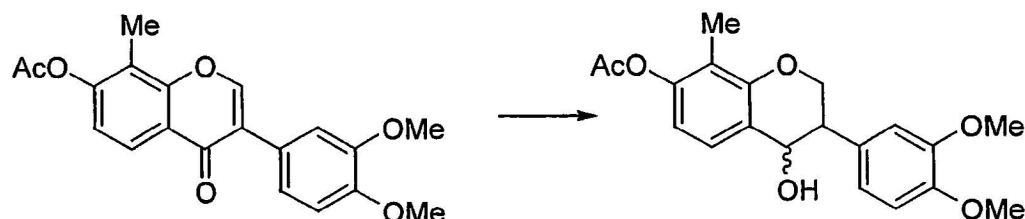


De una manera similar a la del Ejemplo 3.1, anteriormente, se hizo reaccionar 3-(3,4-dimetoxifenil)-7-hidroxicromen-4-ona (1,7 g) con anhídrido acético (10 ml) y piridina (1,9 ml), proporcionando 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-cromen-4-ona en forma de prismas incoloros (1,44 g, 74%).

RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,36 (s, 3H, OCOCH_3), 3,92 and 3,93 (each s, 3H, OCH_3), 6,93 (d, 1H, J 8,3 Hz, ArH), 7,06 (dd, 1H, J 1,9 Hz 8,3 Hz, ArH), 7,16 (d, 1H, J 1,9 Hz, H8), 7,20 (m, 1H, ArH), 7,31 (d, 1H, J 1,9 Hz, ArH), 8,00 (s, 1H, H2), 8,33 (d, 1H, J 8,7 Hz, ArH).

Reacciones de hidrogenación

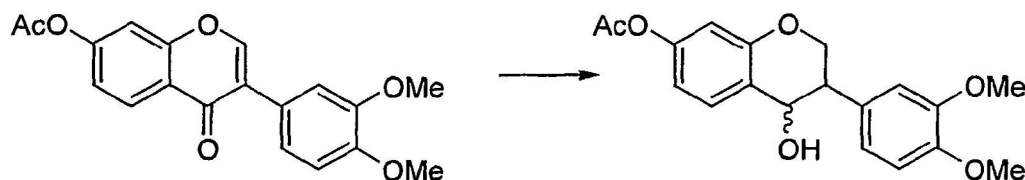
Ejemplo 4.1



En un matraz de hidrogenación de fondo redondo 3N de 1 litro, se suspendió 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-8-metilcromen-4-ona (13,9 g) y $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (2,8 g) en etanol absoluto (560 ml). Se introdujo hidrógeno en el sistema durante 42 horas hasta completar la reacción. Se separó la mezcla de reacción mediante filtración con Celite. Se eliminó el solvente al vacío, proporcionando un sólido blanco que se secó durante la noche en una línea de alto vacío, proporcionando 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-8-metilcroman-4-ol en forma de una mezcla de isómeros cis y trans (9,56 g, 68%). Dicha mezcla se utilizó en la etapa siguiente sin ninguna purificación adicional. Isómero trans: RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,02 (s, 3H, CH_3), 2,32 (s, 3H, OCOCH_3), 3,10 (ddd, 1H, H3), 3,84 and 3,86 (cada s, 3H, OCH_3), 4,24 (dd, 1H, H2a); 4,39 (dd, 1H, H2b), 4,91 (d, 1H, J 7,9 Hz, 144), 6,50-6,90 (m, 4H, ArH), 7,32 (d, 1H, J 8,7 Hz, H5).

Isómero cis: RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,03 (s, 3H, CH_3), 2,32 (s, 3H, OCOCH_3), 3,30 (dt, 1H, H3), 3,86 and 3,87 (each s, 3H, OCH_3), 4,31 (ddd, 1H, H2a); 4,54 (dd, 1H, H2b, 4,78 (bd, 1H, H4), 6,50-6,90 (m, 4H, ArH), 7,32 (d, 1H, J 8,3 Hz, H5).

Ejemplo 4.2



De una manera similar a la del Ejemplo 4.1, se suspendieron 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)cromen-4-ona (1,4 g) y Pd-C al 5% (0,24 g) en etanol absoluto (200 ml) y se introdujo hidrógeno en el sistema durante 55

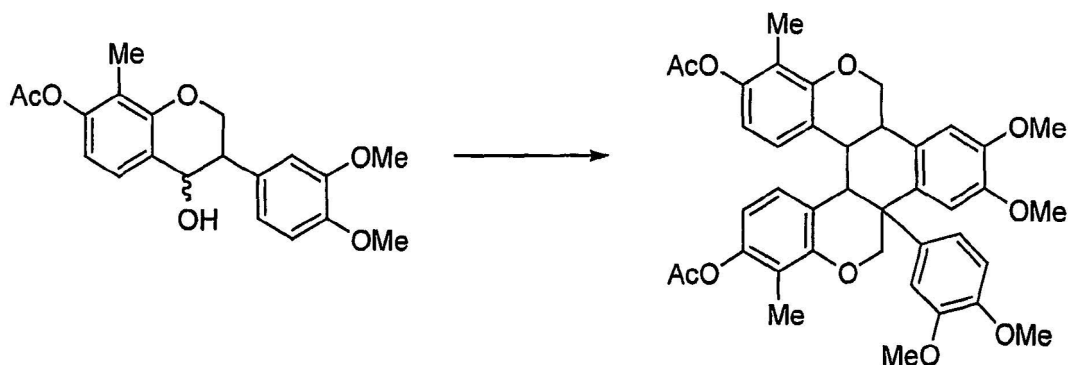
horas hasta completar la reacción. La filtración y evaporación proporcionó una mezcla cis y trans de 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)croman-4-ol (1,4 g, 100%). Esta mezcla se utilizó en la etapa siguiente sin ninguna purificación adicional.

- 5 Isómero trans: RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,29 (s, 3H, OCOCH_3), 3,14 (ddd, 1H, J 3,4 Hz, J 7,9 Hz, J 8,7 Hz, H3), 3,87 and 3,88 (each s, 3H, OCH_3), 4,24 (dd, 1H, H2a); 4,35 (dd, 1H, H2b), 4,93 (d, 1H, J 7,9 Hz, H4), 6,66-6,87 (m, 5H, ArH), 7,49 (d, 1H, J 8,7 Hz, H5).
Isómero cis: RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,29 (s, 3H, OCOCH_3), 3,30 (dt, 1H, H3), 3,87 and 3,88 (each s, 3H, OCH_3), 4,31 (ddd, in, H2a); 4,56 (dd, 1H, H2b), 4,75 (d, 1H, J 2,64 Hz, H4), 6,66 (dd, 1H, J 2,3 Hz, J 8,7 Hz, H6), 6,66-6,87 (m, 5H, ArH), 7,30 (d, 2H, J 8,3 Hz, ArH).
- 10

Reacciones de dimerización

Ejemplo 5.1

15



Método A

- Se disolvió 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-8-metilcroman-4-ol (1,08 g) en diclorometano (4 ml) y se secó sobre carbonato potásico. La mezcla de reacción se enfrió a -78°C (baño de acetona/hielo seco) durante 10 minutos. Se añadió pentaóxido de fósforo (0,563 g) y la reacción se detuvo y se mantuvo a -78°C durante 6 horas y después se agitó a $\sim 4^\circ\text{C}$ durante la noche. Se desactivó utilizando solución de hidrogenocarbonato sódico (20 ml, al 5% p/v), provocando el burbujeo de la mezcla de reacción. Se enjuagó la mezcla en un embudo de separación y se recogió la capa de diclorometano. Se extrajo la capa acuosa utilizando más diclorometano (~ 20 ml). La capa de diclorometano se redujo en un evaporador giratorio y formó un sólido violeta tras introducirlo en la línea de alto vacío. Se disolvió el sólido en eluyente y se sometió a cromatografía de columna utilizando diclorometano/petróleo ligero (60:40), con seguimiento mediante TLC. Se aisló el producto 4,9-diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2-Ac) (580 mg, 52%).
- RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,86 (s, 3H, CH_3), 2,02 (s, 3H, CH_3), 2,23 (s, 3H, OCOCH_3), 2,30 (s, 3H, OCOCH_3), 3,12 (dt J 3,5 Hz, J 11,4 Hz, 1H, CH), 3,36 (d, J 12,2 Hz, 1H, CH), 3,74, 3,83, 3,87, 3,87 (each s, 3H, OCH_3), 3,93 (dd, J 3,2 Hz, J 10,8 Hz, 1H, CHa), 4,25 (s, 1H, CH), 4,59 (d, J 11,3 Hz, CHa'), 4,77 (d, J 11,3 Hz, CHb'), 4,88 (dd, J 3,4 Hz, J 10,2 Hz, 1H, CHb), 6,30 (d, 1H, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,46-6,8 (m, 6H, ArH), 6,93 (s, 1H, ArH), 7,13 (d, 1H, J 8,6 Hz, ArH). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 9,2, 9,3 (CH_3), 20,6, 20,7 (CH_3), 32,9 (CH), 36,6 (CH), 42,9 (CH), 47,0 (C alifático), 55,7, 56,0, 56,2, 56,3 (OCH_3), 70,0 (CH_2), 72,8 (CH), 108,4, 111,2, 111,3, 112,2, 113,8, 113,9, 120,2, 123,3, 125,7 (Ar CH), 118,5, 118,9, 120,5, 121,9, 128,7, 129,2, 138,4, (ArC), 147,9, 148,0, 148,1, 148,2, 148,3, 148,9, 153,5, 154,2 (ArC), 169,2, 169,3 (COOCH_3), λ_{max} 285 nm (ϵ 14,310), u_{max} 2932, 1759, 1597, 1516, 1428, 1368, 1217, 1093, 1024, 912, 805, 729, 587 cm^{-1} . Observado: (HRESMS) m/z 703,254039; $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_{10}\text{Na}$ requiere m/z 703,251343.
- 15
20
25
30
35
40

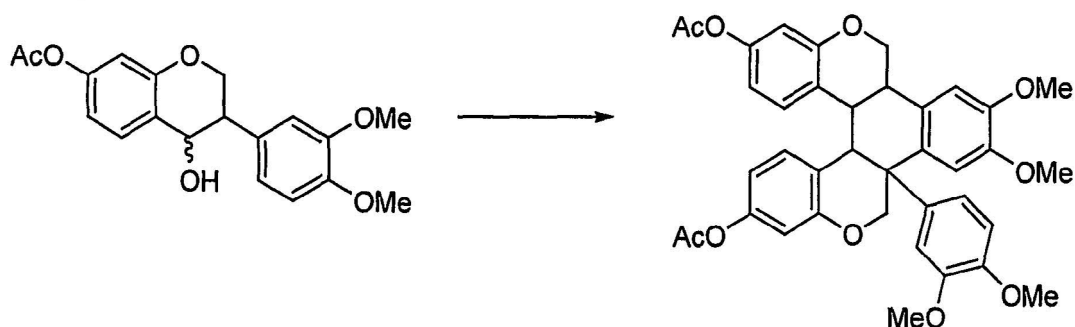
Método B

Se prepararon cuatro reactores de 20 ml según la Tabla 1, a continuación, mediante la combinación de los dos sólidos y enfriándolos a -78°C en un baño de acetona/hielo seco durante 10 minutos.

Tabla 1: reactores de monómero 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)-6-metilcroman-4-ol, P₂O₅ y DCM.

Matraz n°	Monómero (g)	P ₂ O ₅ (g)	Diclorometano (ml)
1	1,0037	0,5387	4
2	1,0156	0,4433	4
3	1,0094	0,4490	4
4	1,0101	0,6348	4

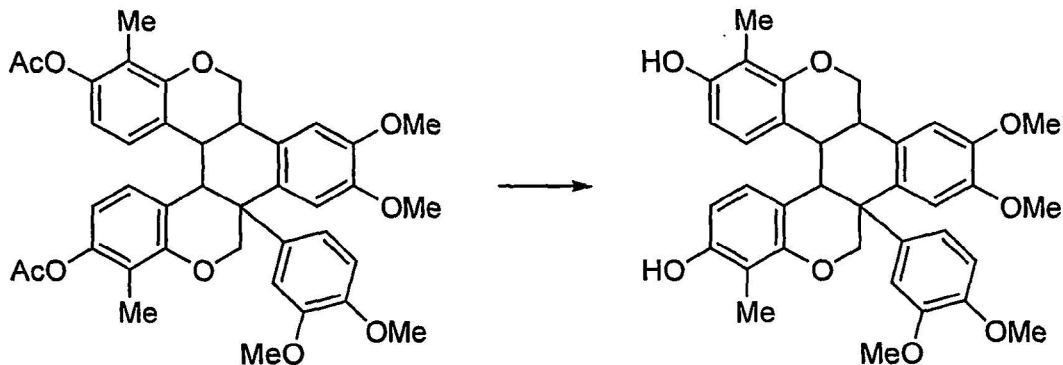
Se enfrió a -78°C el diclorometano seco sobre carbonato potásico y se añadió lentamente a los matraces. Las mezclas de reacción se mantuvieron a -78°C durante 6 a 7 horas y después se desactivaron utilizando solución de hidrogenocarbonato sódico (20 ml, al 5% p/v), lo que provocó el burbujeo de la mezcla de reacción. Se agruparon las reacciones y se transfirieron a un embudo de separación y se recogió la capa de diclorometano. Se extrajo la capa acuosa utilizando diclorometano (~20 ml). La capa de diclorometano se redujo en un evaporador giratorio y el residuo formó un sólido violeta tras secarlo en una línea de alto vacío. A continuación, los sólidos se sometieron a cromatografía de columna utilizando diclorometano/petróleo ligero (60:40). El dímero diacetoxi se aisló con éxito de las últimas fracciones (1.085 mg, 26%).

Ejemplo 5.2

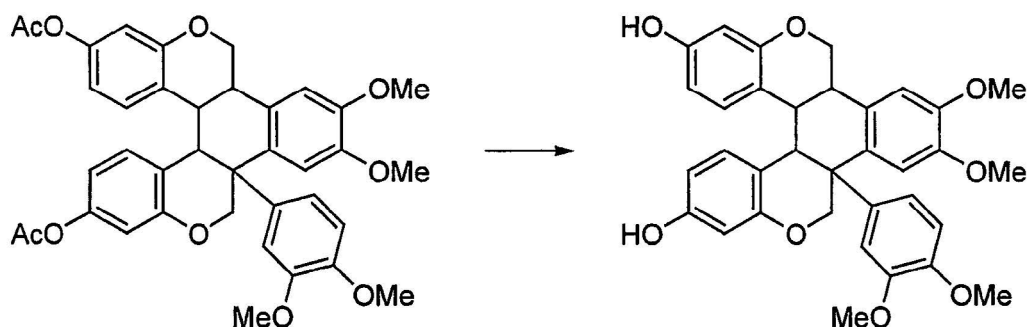
De una manera similar al método A del Ejemplo 5.1, se trató 7-acetoxi-3-(3,4-dimetoxifenil)croman-4-ol en diclorometano con pentaóxido de fósforo, proporcionando 4,9-diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxo-(1H,2H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (1-Ac) (54%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 2,20 (s, 3H, OCOCH₃), 2,27 (s, 3H, OCOCH₃), 3,09 (dt, J 3,8 Hz, J 11,7 Hz, 1H, CH), 3,36 (d, J 12,5 Hz, 1H, CH), 3,74, 3,84, 3,89, 3,89 (cada s, 3H, OCH₃), 3,95 (dd, J 3,4 Hz, J 10,9 Hz, 1H, CHa), 4,23 (s, 1H, CH), 4,59 (d, J 11,3 Hz, CHa'), 4,73 (d, 11,3 Hz, CHb'), 4,81 (dd, J 3,4 Hz, 10,9 Hz, 1H, CHb), 6,36 (dd, 1H, J 2,6 Hz, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,46 (d, J 2,3 Hz, 1H, ArH), 6,62 (d, J 2,3 Hz, 1H, ArH), 6,62-6,69 (m, 4H, ArH), 6,79 (d, J 9,1 Hz, 1H, ArH), 6,85 (d, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,91 (s, 1H, ArH), 7,24 (d, 1H, J 9,0 Hz, ArH). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 21,5, 21,6 (CH₃), 33,5 (CH), 36,8 (CH), 43,1 (CH), 49,9 (C alifático), 56,2, 56,3, 56,4, 56,5 (OCH₃), 70,5 (CH₂), 73,2 (CH₂), 108,7, 110,7, 110,8, 11,5, 112,4, 114,4, 120,8, 120,9, 126,9, 129,2, 129,3 (ArCH), 122,6, 128,8, 138,4, 148,4, 148,5, 148,6, 149,3, 150,1, 150,3, 155,8, 156,3, 169,7, 169,8 (ArC), λ_{max}284 nm (ε18,000), 212 (77250), u_{max}2993, 2833, 1762, 1611,1586, 1516, 1464, 1424, 1368, 1248, 1209, 1146, 1119, 1027, 899, 810, 763 cm⁻¹. Observado: (HRESMS) m/z 675,219688; C₃₈H₃₆O₁₀Na requiere m/z 675,220045.

Reacciones de desacetilación**Ejemplo 6.1**

5



- Se disolvió 4,9-diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (150 mg) en metanol (4 ml). Se añadió solución de hidróxido potásico (acuosa 1 M) gota a gota a la reacción hasta que el pH fuese de aproximadamente 11. Se agitó la reacción durante 90 minutos a temperatura ambiente. La solución se neutralizó con ácido acético (acuosa 1 M) y se vertió en agua bajo agitación (500 ml). El precipitado resultante se filtró y se secó, proporcionando unos polvos blancos identificados como 4,9-dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b-6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2) (50 mg, 38%).
- RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,94 (s, 3H, CH_3), 2,10 (s, 3H, CH_3), 3,02 (dt J 3,5 Hz, J 11,4 Hz, 1H, CH), 3,31 (d, J 12,4 Hz, 1H, CH), 3,74, 3,84, 3,86, 3,87 (each s, 3H, OCH_3), 3,94 (dd, J 3,2 Hz, J 10,8 Hz, 1H, CHa), 4,18 (s, 1H, CH), 4,40(brs, 1H, OH), 4,56 (d, J 11,3 Hz, 1H, CHa'), 4,60(brs, 1H, OH), 4,74 (d, J 11,3 Hz, 1H, CHb'), 4,86 (dd, J 3,4 Hz, J 10,2 Hz, 1H, CHb), 6,10 (d, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,42 (d, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,59 (d, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,60-6,8 (m, 3H, ArH), 6,79 (d, J 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,95 (s, 1H, ArH), 6,96 (d, J 8,6 Hz, 1H, ArH).

Ejemplo 6.2

- Se añadió imidazol (550 mg) a una suspensión de 4,9-diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (230 mg) en etanol absoluto (8 ml) y la mezcla se sometió a reflujo durante 45 minutos bajo argón. La solución se concentró bajo presión reducida y el producto se precipitó mediante la adición de agua destilada (10 ml). La mezcla se dejó bajo reposo durante la noche bajo refrigeración y se filtró, rindiendo 4,9-dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (1) en forma de un sólido blanco (100 mg, 50%). RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,03 (dt, J 3,4 Hz, J 11,3 Hz, 1H, CH), 3,28 (d, J 12,4 Hz, 1H, CH), 3,75, 3,84, 3,85, 3,86 (each s, 3H, OCH_3), 3,92 (d, J 10,5 Hz, 114, CHa), 4,16 (s, 1H, CH), 4,56 (d, J 11,3 Hz, CHa'), 4,68 (d, J 11,3 Hz, CHb'), 4,77 (dd, J 3,7 Hz, J 10,5 Hz, 1H, CHb), 6,13 (dd, 1H, J 2,6 Hz, J 8,3 Hz, 1H, ArH), 6,20 (d, J 2,3 Hz, 1H, ArH), 6,36 (d, J 2,3 55 Hz, 1H, ArH), 6,45 (dd, J 2,6 Hz, J 8,3 Hz, 1H, ArH), 6,62-6,67 (m, 2H, ArH), 6,72 (d, J 8,3 Hz, 1H, ArH), 6,78 (d, J 8,3 Hz, 1H, ArH), 6,93 (s, 1H,

ArH), 7,09 (d, J 9,0 Hz, 1H, ArH), 7,11 (s, 1H, OH), 7,70 (s, 1H, OH). RMN ¹H (CDCl₃): δ 33,7 (CH), 36,2 (CH), 41,7 (CH), 47,2 (aliphatic C), 55,0, 55,1, 55,3, 55,5 (OCH₃), 69,4 (CH₂), 72,1 (CH₂), 102,9 (CH), 103,2 (CH), 107,8 (CH), 108,2 (CH), 109,0 (CH), 111,4 (CH), 112,0 (CH), 113,4 (CH), 114,4, 116,0 (ArC), 120,8 (CH), max mm (ε13,028), 217 37,743). ν_{max} 3322, 2933, 1618, 1516, 1463, 1255, 1166, 1024, 834, 742 cm⁻¹. Observado: (HRESMS) m/z 591,196772; C₃₈H₃₆O₁₀Na requiere m/z 591,198918.

Los compuestos diméricos análogos relacionados se prepararon mediante los métodos anteriormente indicados, utilizando materiales de partida fácilmente obtenibles y correspondientemente sustituidos.

10 1. Actividad anticáncer

El deshidroequol (3-(4-hidroxifenil)crom-3-en-7-ol) induce efectos citotóxicos contra un amplio abanico de líneas de células cancerosas humanas e estudios recientes han demostrado que el fenoxodiol es un inhibidor fuerte de la topoisomerasa II, un disruptor del ciclo celular, inhibe la activación de la esfingosina quinasa y regula negativamente la transcripción de la metaloproteasa matricial 2 angiogénica y puede inducir apoptosis en células de cáncer ovárico quimiorresistentes mediante la regulación de la maquinaria anti-apoptótica.

Se ha observado actividad anticáncer del cisplatino en tumores testiculares, carcinoma ovárico, tumores de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer pulmonar y linfomas no de Hodgkin refractarios. El cisplatino es un complejo de coordinación plano-cuadrado (cis-diaminodicloroplatino) que se cree que entra en la célula mediante canales transmembrana o transporte facilitado de alta capacidad. Tras entrar el cisplatino en la célula, la concentración de cloro cae a 20 μM y el fármaco experimenta una hidratación fuerte, formando una especie activa cargada positivamente para la interacción posterior con nucleófilos celulares tales como el ADN y las proteínas. El cisplatino reacciona con el ADN nuclear, rindiendo una diversidad de compuestos, incluyendo entrecruzamientos entre cadenas e intracadena de ADN y entrecruzamientos ADN-proteína. El compuesto más común es un entrecruzamiento intracadena entre guaninas contiguas. Aunque se acepta de manera general que el ADN genómico es la diana farmacológica crítica de la citotoxicidad inducida por cisplatino, existe evidencia de que otros componentes celulares que resultan dañados por el cisplatino (ARN, proteínas, fosfolípidos membranales, microfilamentos citoesqueléticos y moléculas que contienen tiol) facilitan la citotoxicidad inducida por cisplatino. A continuación, los compuestos de cisplatino-ADN (daño al ADN) resultan detectados por p53 que, a su vez, inicia una cascada proapoptótica probablemente a través de la modulación de Bax/Bcl-2 y típicamente induce una detección de G1. También se ha demostrado que la necrosis es un modo de muerte celular por cisplatino. El cisplatino presenta numerosos efectos adversos, entre ellos náuseas y vómitos prácticamente universales e intratables, reacciones de tipo anafiláctico, neurotoxicidad, mielosupresión, trombocitopenia, granulocitopenia y nefrotoxicidad limitante de dosis que es acumulativa e irreversible.

40 Estudios biológicos y datos de cribado

Los estudios de cribado han identificado que el 4,9-dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,12b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2) presenta un perfil *in vitro* de toxicidad favorable contra las células normales y una actividad general comparable, y en algunos casos mejor, que el deshidroequol o el cisplatino, contra las células cancerosas representativas de los cánceres leucémico, glioma, prostático, ovárico, mamario, colorrectal y pulmonar.

Materiales y métodos - cultivos de tejido

Los fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) fueron cedidos por el Dr. Peter Parsons (Queensland Institute of Medical Research). Las células RK-13 (renales de conejo) se obtuvieron de Miller Whalley (Macquarie University). Ambos tipos celulares se cultivaron en RPMI suplementado con FCS al 10% (CSL, Australia), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y bicarbonato sódico (1,2 g/l) y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

La línea celular de cáncer pancreático humano HPAC (CRL-2119) se cultivó rutinariamente en una mezcla 1:1 de DMEM (Sigma) más medio F12 de Ham (Sigma) que contenía HEPES (15 mM), insulina (0,002 mg/ml), transferrina (0,005 mg/ml), hidrocortisona (40 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml). La línea celular de cáncer ovárico CP70 fue cedida por el Dr. Gil Mor (Yale University) y se cultivó en una mezcla 1:1 de DMEM más medio F12 de Ham y se adquirió SKOV-3 de la ATCC y se cultivó en medio 5a de McCoy. La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 se cultivó en medio L15 de Leibovitz.

Todos los cultivos se suplementaron con FCS al 10% (CSL, Australia), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y bicarbonato sódico (1,2 g/l) y se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Todas las líneas celulares restantes se adquirieron de la ATCC (Maryland, USA), excepto en los casos indicados.

Ensayos de proliferación

Se determinaron los valores de IC₅₀ para cada línea celular. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad celular apropiada según se determinó mediante análisis de la cinética de crecimiento. Los NFFs se cultivaron durante 5 días y las RK-13s durante 24 horas, en ausencia y en presencia de los compuestos de ensayo. Se evaluó la proliferación celular tras la adición de 20 µl de bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazolio (MTT, 2,5 mg/ml en PBS, Sigma) durante 3 a 4 horas a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calcularon los valores de IC₅₀ a partir de los gráficos semilogarítmicos de % de proliferación respecto al control en el eje y, frente al logaritmo de la dosis.

Ejemplo 7: Toxicidad celular normal

Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad por duplicado contra células NFF con deshidroequol (DHE9, 4,9-dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2) del Ejemplo 6.1 y cisplatino.

Tabla 2. Toxicidad relativa del deshidroequol, del compuesto 2 y del cisplatino contra fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) y células renales de conejo.

Tipo de tejido/célula	Denominación	Análogo (IC ₅₀ , µM)		Antineoplásico (IC ₅₀ , µM)
		DHE	Compuesto 2	Cisplatino
Fibroblasto	NFF	>150	23,6 ± 6,6	9,85 ± 5
Renal	Riñón de conejo	>150	36,0 ± 2,7	NT

Se encontró que el dímero 2 era menos tóxico para las células normales que el cisplatino, pero más tóxico que el deshidroequol.

Ejemplo 8: farmacocinética del compuesto 2 - oral

Se preparó 4,9-dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxo-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2) del Ejemplo 6.1 en forma de suspensiones homogéneas en CMC al 1% (m:v, agua). La formulación de compuesto 2 se administró oralmente mediante sonda en ratones BALB/c hembra a una dosis de 50 mg/kg. Se asignaron tres animales a cada punto temporal (15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas). En cada punto temporal respectivo se eutanizaron algunos animales mediante dislocación cervical y se extrajo sangre. Se analizó el compuesto 2 libre mediante espectrometría de masas y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos farmacocinéticos orales comparativos para el deshidroequol y el compuesto 2.

Tiempo	DHE (µM)		Compuesto 2 (µM)	
	Libre	Total	Libre	Total
0,25	3,3	511,5	1,332	1,393
0,5	2,9	357	4,930	6,453
1	1,5	387	6,756	10,778
4	1,3	117,6	6,314	7,634
24	0,15	0,13	1,148	1,704
Dosis*	4,6 mg/ml		8,3 mg/ml	

- Se encontró que el dímero 2 presentaba una vida media superior en tiempos de hasta 4 horas en comparación con el deshidroeuqol. Se encontró que el dímero 2 presentaba una tasa lenta de conjugación en comparación con el deshidroeuqol. Los datos de toxicidad *in vivo* demostraron que los ratones que habían recibido 50 mg/kg de 5063 (i.p.) durante 9 días consecutivos no experimentaban toxicidad, según determinaciones de pérdida de peso y de histología de órganos vitales.

Ejemplo 9: citotoxicidad *in vitro* del compuesto 2 como monoterapia contra las células de cáncer

- El dímero 2 mostró una actividad comparable a marcadamente superior contra una diversidad de líneas celulares malignas y resistentes a múltiples fármacos en comparación con los valores de IC₅₀ del deshidroeuqol o del cisplatino, tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación entre las toxicidades del deshidroeuqol, del compuesto 2 y del cisplatino contra líneas celulares representativas de diferentes malignidades.

Indicación	Denominación	Análogo (IC ₅₀ , µM)		Antineoplásico (IC ₅₀ , µM)
		DHE	Compuesto 2	Cisplatino
Ovárico	A2780	1,7 ± 0,61	10,16 ± 0,07	2,10
	CP70	1,69 ± 0,62	8,23 ± 3,73	10,30
	SKOV-3	21,83 ± 4,65	16,7 ± 10,03	5,40
Prostático	PC3	9,09 ± 8,12	7,36 ± 1,35	2,11
	LNCaP	4,8 ± 3,8	11,97 ± 4,3	>10
	DU145	5,95 ± 1,5	8,84 ± 0,47	2,07
Mamario	MCF-7	21,5 ± 13,2	10,28	3,69
	MDA-MB-468	7,9 ± 3,5	8,59 ± 0,35	0,58
Glioma	HTB-138	7,35 ± 0,89	16,37	42,30
Pancreático	CRL-2119	56,62 ± 16,8	11,23 ± 4,7	9,36
Leucémico	RPMI-8226	3,72 ± 0,08	15,16	NT
	CCRF-CEM	1,7 ± 0,68	10,31 ± 1,33	NT
Pulmonar	NCI-H23	8,75 ± 7,2	16,37	NT
	NCI-H460	10,6 ± 3,8	11,26 ± 4,97	22,29
Colorrectal	HT-29	50,45 ± 21,9	11,45 ± 6	22,7 ± 35
	HCT-15	24,4 ± 12,57	54,67 ± 28	129,9 ± 39
Melanoma	MM200	4,8	6,5	8,82
	MM96L	4,7	6,8	4,6

2. Actividad antiinflamatoria

- Las prostaglandinas, por ejemplo PGE₂ y PGI₂ y los tromboxanos (TXs), por ejemplo TXA₂, son miembros de la familia de derivados de ácidos grasos conocidos como eicosanoides (Penglis *et al.* 2000). Se encuentran implicados en respuestas tanto fisiológicas normales como inflamatorias, aunque presenta efectos contrarios sobre, por ejemplo, la liberación de citoquinas y la agregación plaquetaria. La liberación del ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos membranales proporciona el sustrato principal para la síntesis de eicosanoides. La acción de los enzimas ciclooxigenasa (COX), con independencia del isotipo, provoca la síntesis del intermediario prostaglandina PGH₂, el precursor habitual de PGE₂, PGI₂ y TXA₂.

Los prostanoideos desempeñan un importante papel modulador de la respuesta inmunológica a través de interacciones complejas con leucocitos y células parenquimales en el órgano inflamado. Pueden producir acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, dependiendo del estímulo inflamatorio, del prostanoides predominante producido y del perfil de expresión de receptores de prostanoides (Tilley *et al.* 2001).

La inhibición de la TX sintasa conduce a una formación reducida de TXs, y debido a la disponibilidad incrementada del sustrato PGH₂ para la PG sintasa, se produce un incremento de la síntesis de PGs (Carty *et al.* 2000; Penglis *et al.* 2000). Un incremento de PGE₂ puede ejercer efectos antiinflamatorios. Por ejemplo:

a. se ha informado de que PGE₂ atenúa algunas respuestas inflamatorias agudas, en particular aquellas iniciadas por la degranulación de los mastocitos (Raud *et al.* 1988).

b. la PGE₂ suprime, mientras que TXA₂ incrementa, el TNF α y la IL-1 β (Caughey *et al.* 1997). La inhibición de TXA₂ es un modo potencial de inhibir la producción inflamatoria de citoquinas, en particular la de TNF. En la actualidad, las terapias biológicas que suprimen los niveles de TNF (con anticuerpos o receptores solubles de TNF) han presentado éxito en el tratamiento de la artritis reumatoide que es refractaria o que ya no responde a otras terapias. Un agente químico que suprimiese la producción de TNF y que pudiese administrarse oralmente supondría un gran avance. La inhibición de la formación de TXA₂ podría ser un medio de suprimir la producción de TNF, una citoquina que se encuentra implicada en los indicios y síntomas de la inflamación articular y en la etapa degradativa a largo plazo de la inflamación articular que se manifiesta en la degradación del cartílago, la reducción del espacio articular y finalmente en el fallo articular.

c. PGE₂ inhibe un amplio abanico de funciones de las células T y B, incluyendo la inhibición de la activación y proliferación de los linfocitos T y la producción de Ig (Tilley *et al.* 2001). A la inversa, TXA₂ puede estimular la activación y proliferación de las células T y facilitar el desarrollo de células T citolíticas efectoras (CTLs). La alteración de dicho equilibrio en favor de la producción de PG podría facilitar la "desactivación" de una respuesta inmunológica inapropiada, tal como ocurre en las enfermedades autoinmunitarias.

d. En el asma, PGE₂ estimula la vasodilatación e incrementa la permeabilidad vascular (Tilley *et al.* 2001). A medida que avanza la inflamación, la síntesis de PGE₂ por parte de los macrófagos se incrementa debido a la expresión incrementada de COX-2 y de la PGE-sintasa. PGE₂ inhibe la activación de los leucocitos y estimula la broncodilatación. Se han desarrollado inhibidores de la TXA₂ sintasa y los antagonistas de receptores de prostanoides tromboxano (TP) a modo de fármacos antiasma (Shi *et al.* 1998).

e. En la glomerulonefritis, se produce la coactivación de la ruta de AA/COX hacia la síntesis de PGs y de TX, y de las rutas de la lipooxigenasa hacia la síntesis de leucotrienos. El TXA₂ es el eicosanoide más abundante sintetizado en los glomerulos nefríticos, y los inhibidores de la TXA₂ sintasa (por ejemplo el dazmegrel) ahora se encuentran disponibles para el tratamiento de la glomerulonefritis. En un modelo de rata de la nefritis, el Dazmegrel incrementó la síntesis de PGE₂, que resulta útil debido a que PGE₂ conserva la función renal en la glomerulonefritis (Lianos *et al.* 1999).

f. Los tromboxanos desempeñan un papel patogénico importante en la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD). Los TXs se producen en exceso no sólo en las mucosas inflamadas, sino también en la enfermedad de Crohn en el intestino no inflamado y en células intestinales aisladas y en células mononucleares sanguíneas periféricas. Su origen celular probablemente incluye plaquetas, neutrófilos, células endoteliales y epiteliales, así como células mononucleares (Rampton *et al.* 1993; McCartney *et al.* 1999; Carty *et al.* 2000; Carty *et al.* 2002). Los efectos proinflamatorios de los TXs son tanto directos (diapedesis y activación de los neutrófilos, ulceración mucosal, reducción de la actividad supresora de las células T) como indirectos (vasoconstricción, activación plaquetaria) (Rampton *et al.* 1993). Se cree que las PGs protegen la mucosa gastrointestinal (Carty *et al.* 2000). La sulfasalazina, un compuesto administrado frecuentemente en el tratamiento de la IBD crónica, así como uno de sus metabolitos principales, la sulfapiridina, se ha demostrado que inhibe la síntesis de TXB₂, incrementando simultáneamente la síntesis de PGF_{2 α} o PGE₂, respectivamente (Hawkey *et al.* 1985). En otras palabras, aparentemente presentan cierto nivel de inhibición de la TX sintasa.

Materiales y métodos - cultivos de tejido

Se aislaron monocitos de sangre periférica humana (procedente de tres individuos separados) a partir de capas leucoplaquetarias mediante separación en gradiente linfoprep. de las células mononucleares seguido de elutriación centrífuga contracorriente (Demasi *et al.* 2000). Los compuestos de ensayo se

disolvieron en DMSO y se añadieron a monocitos frescos. Tras 30 minutos, se añadió LPS para alcanzar una concentración final de 200 ng/ml. Tras la incubación durante 18 horas a 37°C en 5% de CO₂, se eliminaron los sobrenadantes y se midió la producción de PGE₂, TXB₂ (el producto de hidrólisis estable de TXA₂) y TNFα mediante radioinmunoensayo (RIA).

5

La línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón se cultivó en DMEM suplementado con FCS, glutamina 2 mM y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. Se desengancharon las células subconfluentes del matraz mediante raspado suave y se sembraron placas de 24 pocillos a una densidad de 5x10⁵ células en cada pocillo y se dejó que se adhiriesen durante 1 hora. A continuación se trataron las células con compuestos de ensayo (en DMSO al 0,025%) o vehículo solo, y se incubaron durante 1 hora. Seguidamente se añadió LPS 50 ng/ml (LPS - Sigma-Aldrich). Tras incubar durante 16 horas, se recolectó el medio de cultivo y se almacenó a -80°C para las mediciones de eicosanoides y citoquinas utilizando ensayos inmunométricos de enzimas (PGE₂ y TXB₂ - Cayman Chemical y TNFα - Becton Dickinson).

15 Resultados y conclusiones

Las figuras 1 a 8 muestran que ambos dímeros, el compuesto 1 y el compuesto 2, inhibieron TXB₂ e indujeron PGE₂ de un modo sensible a la dosis en macrófagos murinos (RAW 264.7) y en monocitos humanos estimulados con LPS. Además, el compuesto 1 y el compuesto 2 inhibieron la inducción de TNFα en monocitos humanos. Los compuestos diméricos de la invención resultan útiles en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y condiciones relacionadas.

20 3. Actividad cardiovascular

25 Materiales y métodos

Se eutanizaron ratas Sprague-Dawley macho (250±50 g) con 80% de CO₂ y 20% de O₂. Se extirpó la aorta torácica y se montó rápidamente en baños de órganos tal como se encuentra descrito (Chin-Dusting *et al.*, 2001). Se obtuvieron curvas de concentración-respuesta contráctil completas para la noradrenalina (0,1 nM a 10 mM) en ausencia y en presencia de compuesto 2 (1 µg/ml). Se repitieron experimentos en n=6 anillos diferentes procedentes de 6 animales diferentes.

30 Resultados y conclusiones

El compuesto 2 no presentó ningún efecto sobre la respuesta contráctil máxima a la noradrenalina (1,94±0,35 frente a 2,09±0,23, p>0,05), pero desplazó significativamente el log neg. de la concentración EC₅₀ de la noradrenalina de -8,21±0,17 a -7,84±0,097 (p<0,05), mostrando que el compuesto 2 era capaz de antagonizar (o bloquear) el efecto contráctil de la noradrenalina (ver la fig. 9).

El compuesto presenta actividad demostrada contra la contractilidad del anillo aórtico inducida por noradrenalina. Estos datos indican que el compuesto 2 muestra actividad vasodilatadora e inhibe la vasoconstricción.

45 4. Quimiosensibilización

Se evaluó la utilidad de los compuestos diméricos de la invención de actuar como quimiosensibilizador al utilizarlos en combinación con una serie de agentes quimioterapéuticos estándares. Se aplicó el compuesto dimérico 2 en diversas líneas celulares de cáncer colorrectal y pancreático para investigar su sinergia con agentes quimioterapéuticos estándares, incluyendo el cisplatino, la gemcitabina, el paclitaxel, la doxorubicina, la camptotecina y el topotecán.

50 Diseño experimental

El experimento descrito de manera general en SOP-BD011 (versiones A y B) se utilizó para cribar tres agentes antineoplásicos contra una línea celular dada en "un" experimento cualquiera (ver, por ejemplo, Kanzawa *et al.*, 1997). El diseño inherente del experimento consideraba tres secuencias del compuesto 2 y un agente antineoplásico.

- 1) Secuencia directa - las células se trataron tanto con compuesto 2 como con un único agente antineoplásico (combinados) durante 5 días.
- 2) Secuencia (directa) de compuesto 2 en primer lugar - las células se trataron durante 24 horas con el compuesto 2 antes de sustituirlo por un tratamiento de 24 horas de agente antineoplásico; seguidamente los fármacos se eluyeron y se procesaron el día 5.

3) Secuencia inversa - el orden contrario al experimento nº 2 anteriormente descrito, es decir, una secuencia de primero citotoxina.

Resultados y conclusiones

5

Se evaluaron todos los datos utilizando las fórmulas de aditividad teórica incorporada en un modelo tridimensional, tal como describen Kanzawa *et al.*, 1997. Lo anterior permitió una interpretación simple de los datos debido a que los valores superiores a 10% se definen como "sinérgicos" (mostrados en gris), mientras que aquellos inferiores a -10% se definen como "antagónicos" (mostrados en negro).

10

La combinación de compuesto 2 y gemcitabina resultó en citotoxicidad sinérgica contra las células HPAC al tratarlas simultáneamente (A) o durante secuencias de 24 horas (B, C) (ver la fig. 10). Este efecto resultó aparente en un intervalo de concentraciones mayor en ambas series de datos de secuencias de 24 horas. No se observó sinergia con concentraciones del compuesto 2 superiores a 5 μM .

15

La combinación de compuesto 2 y la gemcitabina resultó en citotoxicidad sinérgica contra las células HT-29 en secuencias tanto directa (A) como inversa (B) (ver la fig. 11).

20

Las células HT-29 tratadas con el compuesto 2 (a concentraciones de 1 μM y 2 μM) y nueve concentraciones de Paclitaxel diluidas en serie demuestran una sinergia fuerte al tratarlas en combinación (A) (ver la fig. 12). También se observaron regiones de sinergia menos significativas en las secuencias de 24 horas tanto directa (B) como inversa (C).

25

Las células HCT-15 tratadas con el compuesto 2 (a concentraciones de 1 μM y 2 μM) y nueve concentraciones de Paclitaxel diluidas en serie demuestran una sinergia fuerte al tratarlas secuencialmente en secuencias de 24 horas tanto directa (B) como inversa (C) (ver la fig. 13). A título comparativo, no se observó sinergia en el grupo tratado con combinación (A).

30

La combinación de compuesto 2 y doxorrubicina resultó en fuerte citotoxicidad sinérgica contra las células HT-29 al tratarlas tanto en secuencias tanto combinada (A) como directa (B) (ver la fig. 14). Al tratar las células con doxorrubicina en primer lugar, no se observó sinergia (C).

35

La combinación de compuesto 2 y doxorrubicina resultó en fuerte citotoxicidad sinérgica contra las células HCT-15 al tratarlas con combinación (A) (ver la fig. 15). No se observó sinergia ni en la secuencia directa (B) ni en la inversa (C).

40

Se observó sinergia rutinariamente entre el compuesto 2 y los fármacos quimioterapéuticos: gemcitabina, paclitaxel y doxorrubicina. Estos datos sugieren que el compuesto 2 puede presentar sinergia con dichos agentes ópticamente en el caso de que el compuesto 2 se administre en una secuencia de 24 horas, en dirección directa o inversa. Los resultados demuestran que los compuestos diméricos de la invención resultan particularmente eficaces en la quimiosensibilización de las células tumorales y en la quimioprotección de las células no tumorales.

45

5. Actividad antiinflamatoria en la inflamación del oído murino

50

Se examinó el compuesto 2 para su capacidad de inhibir la hinchazón del oído en ratones inducidos mediante la aplicación tópica de ácido araquidónico (AA). La respuesta inflamatoria debida al AA, el precursor inmediato de los eicosanoides, se debe a la formación de metabolitos del AA a través de las vías tanto de la ciclooxigenasa (COX) como de la lipooxigenasa (LOX) (Young *et al.* 1984). El AA induce un incremento temprano (a los 10-15 minutos) en la síntesis de tanto PGE_2 como LTC_4 , lo que precede al incremento del grosor del oído (Opas *et al.* 1985; Chang *et al.* 1986).

Métodos

55

En ratones BALB/c hembra (ARC, WA, Australia) que pesaban 15 a 21 gramos se inyectó compuesto 2 administrado en polietilenglicol (PEG) 400:solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1:1 intraperitonealmente (i/p) a una dosis de 25 mg/kg 30 minutos antes de la aplicación del AA en los oídos. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se midió el grosor de línea base de ambos oídos utilizando un micrómetro de resorte. Cada ratón recibió un total de 20 μl de AA en etanol (50 mg/ml) aplicados en las superficies interna y externa de cada pabellón auricular (es decir, 0,5 mg de AA ó 2 μg de PMA en cada oído). Los ratones fueron nuevamente anestesiados para medir otra vez los oídos 1 hora después de la aplicación del AA.

60

- Se estimó la diferencia en la hinchazón del oído antes y después de la aplicación del AA en cada oído y se calculó la media para los dos oídos de cada ratón. La diferencia de hinchazón media de cada grupo de ensayo en comparación con el grupo que recibió vehículo solo se calculó utilizando un ensayo t no apareado de dos colas (Prism 4, GraphPad Software).

Resultados

- El tratamiento con compuesto 2 resultó en una reducción significativa del grosor del oído en comparación con el tratamiento con vehículo solo.

Tabla 1. Cambio del grosor del oído en respuesta a la aplicación de AA

Compuesto	Cambio del grosor del oído (media $\pm$ SD, x 0,01 mm)	diferencia entre el grupo de ensayo y vehículo
Vehículo	14,5 $\pm$ 4,7	-
Compuesto 2	5,1 $\pm$ 1,7	p= 0,0018

6. Actividad antiinflamatoria en un modelo murino de edema de la piel inducido por irradiación UV

- La exposición aguda de la piel del mamífero a la irradiación de UV causa una reacción inflamatoria que se manifiesta en eritema y edema. Esta reacción se encuentra mediada en parte por prostaglandinas proinflamatorias (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} y posiblemente PGI₂) y leucotrienos, así como la generación de radicales libres reactivos y especies de oxígeno reactivo (Søndergaard *et al.* 1985; González y Pathak, 1996; Widyarini *et al.* 2001).

Métodos

- Se irradiaron grupos de 4 a 5 ratones Skh:hr-1 albinos hembra con 1x3 MedD (dosis edematosa mínima) de radiación UV solar simulada (SSUV). La radiación ultravioleta solar simulada (SSUV) se proporcionó con un banco plano de 6 tubos UVA (Hitachi 40W F40T 10/BL, luz negra) y un tubo UVB (Philips TL 40W/12RS) con radiación filtrada a través de una lámina de 0,125 mm de acetato de celulosa (Eastman Chemical Products, Kingport, Tenn., USA), proporcionando 2,96x10⁻⁴ W/cm² de UVA y 1,59x10⁻⁵ W/cm² de UVB. La distancia entre la lámpara de UV y la superficie de la mesa de irradiación era de aproximadamente 20 cm y se controló la temperatura con un ventilador eléctrico. Durante la irradiación, se rotaron las jaulas debajo de las luces para reducir la variación de la intensidad de radiación en posiciones diferentes.
- Se aplicó compuesto de ensayo (0,2 ml de una solución 20 μ M) o vehículo (propilenglicol/etanol/agua 1:2:1) a la piel dorsal irradiada 30 minutos, 2 horas y 4 horas después de la irradiación. Las mediciones del pliegue de la piel dorsal se realizaron con un micrómetro de resorte antes de la exposición a UV y 24 y 48 horas después de la misma. Se calculó para cada ratón la diferencia en el grosor de la piel antes y después de la exposición a UVR y las diferencias examinadas entre el compuesto de ensayo y el vehículo de control se analizaron utilizando un ensayo t no apareado de dos colas.

Resultados

- El grosor del pliegue de piel resultaba evidente 24 horas después de la irradiación de UV y alcanzó un pico a las 48 horas, el último punto temporal medido. Aunque los compuestos de ensayo se aplicaron sólo tres veces después de la irradiación de UV y la dosificación se completó 20 horas antes de la primera medición de pliegue de piel, los compuestos examinados eran activos en la reducción de la inflamación inducida por UV, tal como subrayan las tablas y gráficos posteriormente.
- El compuesto 2 inhibió significativamente el edema de la piel en ambos puntos temporales, y el compuesto 1 inhibió significativamente a las 24 horas.

Tabla 2. Cambio del grosor del pliegue de piel dorsal 24 horas después de la irradiación

Compuesto	Cambio según compuesto del grosor de la piel (media $\pm$ SD, x 0,01 mm)	diferencia entre el grupo de ensayo y vehículo
Vehículo	78 $\pm$ 23	-
Compuesto 1	51 $\pm$ 14	p= 0,0284
Compuesto 2	36 $\pm$ 22	p= 0,003

Tabla 3. Cambio del grosor del pliegue de piel dorsal 48 horas después de la irradiación

Compuesto	Cambio según compuesto del grosor de la piel (media $\pm$ SD, x 0,01 mm)	diferencia entre el grupo de ensayo y vehículo
Vehículo	147 $\pm$ 37	-
Compuesto 1	117 $\pm$ 20	p= 0,1040
Compuesto 2	105 $\pm$ 16	p= 0,025

Estos resultados demuestran claramente la actividad antiinflamatoria de tanto el compuesto 1 como el compuesto 2. Aunque se administraron tópicamente y dentro de un intervalo corto después de la inducción de la inflamación, sus efectos todavía eran evidentes hasta 48 horas después.

7. Efecto inmunosupresor en esplenocitos murinos

Métodos

Se mataron ratones Skh-1 (lampiños) macho de seis semanas de edad mediante dislocación cervical. Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de sus bazo y se lisaron los eritrocitos en tampón (NH₄Cl 0,14 M, Tris 17 mM, pH 7,2). Los esplenocitos restantes se cultivaron en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con FBS al 10% (v/v), L-glutamina 200 mM, penicilina/estreptomicina y 2-mercaptoetanol 50 mM. Se añadieron esplenocitos a pocillos por triplicado que contenían concanavalina A (ConA, Sigma-Aldrich, 0,4 μ g/pocillo), lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, 1 μ g/pocillo) o nada de mitógeno, así como 10 μ M de compuesto 1 ó 2 en DMSO, o DMSO solo. Se analizaron las muestras tras una incubación de 3 días a 37°C en 5% de CO₂ en aire. Para evaluar el número de células, se añadió metiltiazoltetrazolio (MTT) a cada pocillo, se incubó durante 4 horas adicionales y después se desarrolló color con HCl 0,04 N en isopropanol (Mosmann, 1983). Se leyeron las placas a 570 nm y 630 nm. Los compuestos se examinaron varias veces utilizando diferentes ratones. Para cada ensayo, se comparó el efecto del compuesto de ensayo con el del vehículo de control, y se compararon los resultados utilizando un ensayo t de Student (Prism). Se determinó que la diferencia estadísticamente significativa se producía con p<0,05.

Otro ensayo examinó el efecto de preincubar esplenocitos no estimulados con compuestos de ensayo a una concentración de 10 μ M durante 24 horas, eliminando los compuestos y después evaluando su capacidad de responder a la estimulación mitogénica tal como se ha descrito para el ensayo anterior. Se evaluó el número de células tras la preincubación de 24 horas utilizando MTT, y se sembraron números iguales de células/pocillo en placas de 96 pocillos del modo habitual.

Resultados

Se examinó el efecto de la incubación con 10 μ M de compuesto 1 en seis ensayos diferentes. El compuesto 1 inhibió significativamente la proliferación de las células T en 14% a 19% en 4/6 ensayos, pero no presentó ningún efecto sobre la proliferación de las células B. El compuesto 1 incrementó significativamente la proliferación de los esplenocitos no estimulados en 25% a 33% en 5/6 ensayos. Los resultados de un ensayo representativo se presentan en la fig. 16.

Se examinó el compuesto 2 a una concentración de 10 μ M en cuatro ensayos diferentes. Los resultados variaban entre ensayos, de manera que no se identificó ninguna tendencia consistente (datos no mostrados).

A concentraciones más altas, tanto el compuesto 1 como el 2 redujeron la proliferación en comparación con el vehículo de control y con independencia de la presencia o ausencia de estimulación mitogénica

(datos no mostrados).

Tras la preincubación con 10 μ M de ambos compuestos, 1 y 2, durante 24 horas, se produjo una reducción marcada y significativa del número de células en comparación con la incubación con vehículo solo (compuesto 1 - 73%; compuesto 2 - 55%). La preincubación con compuesto 1 no presentó ningún efecto sobre la respuesta a ConA, mientras que la respuesta proliferativa a ConA de las células preincubadas con compuesto 2 fue significativamente inferior a la de aquellas preincubadas con vehículo solo. La preincubación con cualquiera de los compuestos no afectó a la respuesta a LPS. La viabilidad de los esplenocitos tras tres días de cultivo en ausencia de mitógeno no resultó afectada por el compuesto 1, pero resultó significativamente reducida por el compuesto 2 en comparación con aquellas células que habían sido preincubadas con vehículo solo. Se presentan los resultados en la fig. 17.

Estos resultados sugieren que ambos compuestos podrían ser citotóxicos para los linfocitos en reposo. El compuesto 1 aparentemente no bloquea los linfocitos en reposo en la etapa G_0 o G_1 del ciclo celular, mientras que el compuesto 2 podría afectar al ciclo celular de las células T en reposo de manera que sean incapaces de responder a la estimulación mitogénica, incluso en ausencia de compuesto 2.

La implicación terapéutica es que dichos compuestos presentan actividad inmunomoduladora, que contribuye a la actividad antiinflamatoria y cardiovascular en una diversidad de dianas.

8. Estudios de toxicidad

En un pequeño estudio, se administró en ratones BALB/cnu/nu el compuesto 2 (n=2) en forma de una solución en Tween-20 al 6%:PBS a una concentración de 50 mg/kg, o un volumen equivalente de vehículo (n=2) mediante inyección i/p. Se pesaron los ratones y se observaron para indicios de toxicidad diariamente utilizando formularios de seguimiento clínico. El día 9, se mataron los ratones mediante dislocación cervical, y se recogieron el riñón, bazo e hígado de cada ratón para la evaluación histológica de la toxicidad. Ver la fig. 18.

No se observó diferencia de ganancia de peso corporal, ningún indicio clínico anormal, en particular efectos secundarios gastrointestinales y ninguna evidencia histológica de toxicidad en ninguno de los órganos examinados entre ratones en los que se había administrado compuesto 2 y aquellos que recibieron vehículo solo.

Aunque sin deseo de limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que los compuestos de la presente invención regulan una amplia diversidad de procesos de transducción de señales dentro de las células animales y que estos procesos de transducción de señales se encuentran implicados en un amplio abanico de funciones que resultan vitales para la supervivencia y funcionamiento de todas las células animales. Por lo tanto, dichos compuestos presentan beneficios para la salud de amplio espectro e importantes en los animales, incluyendo el ser humano, y en particular presentan el potencial de prevenir y tratar enfermedades, trastornos y funciones humanas importantes y comunes, lo que representa un beneficio inesperado sustancial.

Los beneficios particulares de la presente invención radican en: (a) el amplio abanico de procesos de transducción de señales que son diana de los compuestos, (b) el hecho de que la regulación de dichos diversos procesos incluya la regulación positiva de algunos procesos y la regulación negativa de otros, y (c) que dicho amplio y diverso efecto sobre los procesos de transducción de señales también se ve acompañado por un efecto independiente sobre un abanico de importantes enzimas que resultan fundamentales para el metabolismo y la esteroidogénesis.

Referencias científicas:

Carty, E., M. Macey, S. A. McCartney and D. S. Rampton (2000). "Ridogrel, a dual thromboxane synthase inhibitor and receptor antagonist: anti-inflammatory profile in inflammatory bowel disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 14(6): 807-17.

Carty, E., C. Nickols, R. M. Feakins and D. S. Rampton (2002). "Thromboxane synthase immunohistochemistry in inflammatory bowel disease." *Journal of Clinical Pathology* 55(5): 367-370.

Caughey, G. E., M. Pouliot, L. G. Cleland and M. J. James (1997). "Regulation of tumor necrosis factor- α and IL-1 β synthesis by thromboxane A₂ in nonadherent human monocytes." *Journal of*

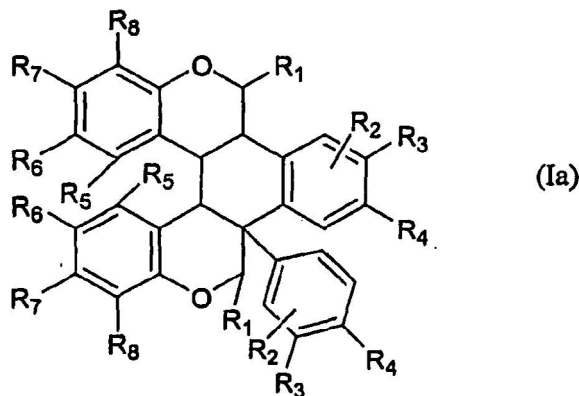
- Immunology 158(1): 351-8.
- Chang, J., *et al.* (1986). "Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis." *Inflammation* 10(3): 205-14.
- 5 Chin-Dusting, J. P., L. J. Fisher, *et al.* (2001). "The vascular activity of some isoflavone metabolites: implications for a cardioprotective role." *British Journal of Pharmacology*. 133(4): 595-605.
- 10 Demasi, M., G. E. Caughey, *et al.* (2000). "Assay of cyclooxygenase-1 and 2 in human monocytes." *Inflammation Research* 49(12): 737-43.
- Gonzalez, S. and M. A. Pathak (1996). "Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polypodium leucotomos." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 12(2): 45-56.
- 15 Hawkey, C. J., N. K. Boughton-Smith and B. J. Whittle (1985). "Modulation of human colonic arachidonic acid metabolism by sulfasalazine." *Digestive Diseases & Sciences* 30(12): 1161-5.
- 20 Kanzawa, F., Nishio, N., Fukuoka, K., Fukuda, M., Kunimoto, T., and Saijo, N. (1997) "Evaluation of synergism by a novel three-dimensional model for the combined action of Cisplatin and Etoposide on the growth of a human smallcell lung-cancer cell line, SBC-3" *International Journal of Cancer* 71:311-9, 1997.
- Lianos, E. A. and B. A. Bresnahan (1999). "Effect of thromboxane A2 inhibition and antagonism on prostaglandin and leukotriene synthesis in glomerular immune injury." *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 134(5): 478-82.
- 25 McCartney, S. A., J. A. Mitchell, P. D. Fairclough, M. J. Farthing and T. D. Warner (1999). "Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13(8): 1115-7.
- 30 Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2): 55-63.
- Opas, E. E., *et al.* (1985). "Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid." *Journal of Investigative Dermatology* 84(4): 253-6.
- 35 Penglis, P. S., L. G. Cleland, M. Demasi, G. E. Caughey and M. J. James (2000). "Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors." *Journal of Immunology* 165(3): 1605-11.
- 40 Rampton, D. S. and C. E. Collins (1993). "Review article: thromboxanes in inflammatory bowel disease--pathogenic and therapeutic implications." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 7(4): 357-67.
- Raud, J., S.-E. Dahlen, A. Sydbom, L. Lindbom and P. Hedqvist (1988). "Enhancement of acute allergicinflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E2: apparent correlation with *in vivo* modulation of mediator release." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 2315-2319.
- 45 Shi, H., A. Yokoyama, N. Kohno, Y. Hirasawa, K. Kondo, K. Sakai and K. Hiwada (1998). "Effect of thromboxane A2 inhibitors on allergic pulmonary inflammation in mice." *European Respiratory Journal* 11(3): 624-9.
- 50 Sondergaard, J., *et al.* (1985). "Eicosanoids in skin UV inflammation." *Photo-Dermatology* 2(6): 359-66.
- Tilley, S. L., T. M. Coffman and B. H. Koller (2001). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." *Journal of Clinical Investigation* 108(1): 15-23.
- 55 Widyarini, S., *et al.* (2001). "Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from

inflammation and immune suppression induced by UV radiation." *Photochemistry & Photobiology* 74(3): 465-70.

- 5 Young, J. M., *et al.* (1984). "The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid." *Journal of Investigative Dermatology*. 82(4): 367-71.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (Ia):

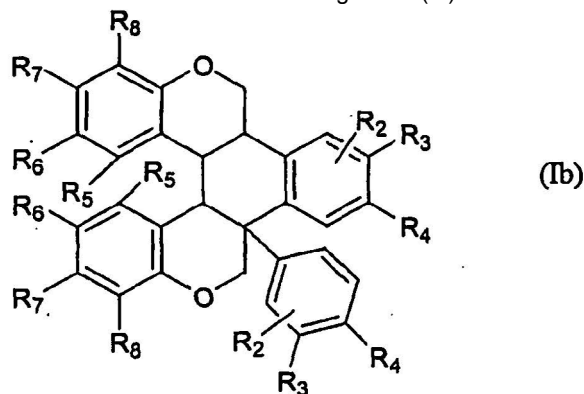


en la que:

R₁ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆,
 R₂, R₃ y R₄ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆ o halo, R₅, R₆, R₇ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, alquilo C₁₋₆, arilo, aril-alquilo C₁₋₆ o halo, R₉ es alquilo C₁₋₆, fluoro-alquilo C₁₋₆ o aril-alquilo C₁₋₆, y R₁₀ es, independientemente, alquilo C₁₋₆

en el que arilo es fenilo o naftilo,
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula general (Ib):



en la que:

R₂, R₃, R₅ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉, OSi(R₁₀)₃, metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, t-butilo, fenilo o bencilo,
 R₄ y R₇ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉ o OSi(R₁₀)₃,
 R₆ es hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉ o OSi(R₁₀)₃,
 R₉ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, t-butilo o bencilo, y
 R₁₀ es, independientemente, metilo, etilo o t-butilo,

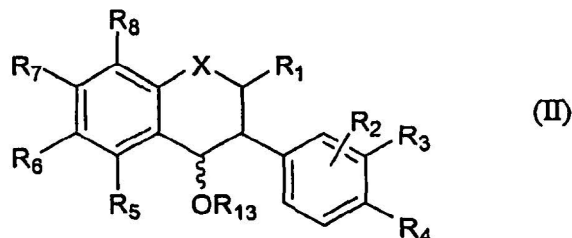
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que:

R₂, R₃, R₅ y R₈ son, independientemente, hidrógeno, hidroxilo, OR₉, OC(O)R₉ o metilo,
 R₄ y R₇ son, independientemente, hidroxilo, OR₉ o OC(O)R₉,

- R₆ es hidrógeno,
y
R₉ es metilo o bencilo,
- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que
- 10 R₄ es metoxi.
5. Compuesto según la reivindicación 3, en el que
- R₃ y R₄ son metoxi.
- 15 6. Compuesto según la reivindicación 3, en el que
- R₈ es metilo.
- 20 7. Compuesto según la reivindicación 3 seleccionado de entre los compuestos (1) a (7) y (1-Ac) a (7-Ac):
- 4,9-Dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidro-nafto[1,2-g]criseno (1),
- 25 4,9-Diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidro-nafto[1,2-g]criseno (1-Ac),
- 4,9-Dihidroxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2),
- 30 4,9-Diacetoxi-14,15-dimetoxi-12a-(3',4'-dimetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (2-Ac),
- 4,9-Dihidroxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (3),
- 35 4,9-Diacetoxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (3-Ac),
- 40 4,9-Dihidroxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (4),
- 4,9-Diacetoxi-14-metoxi-12a-(4'-metoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (4-Ac),
- 45 4,9,14-Trihidroxi-12a-(4'-hidroxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (5),
- 50 4,9,14-Triacetoxi-12a-(4'-acetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (5-Ac),
- 4,9-Dihidroxi-15-metoxi-12a-(3'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (6),
- 55 4,9-Diacetoxi-15-metoxi-12a-(3'-metoxifenil)-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (6-Ac),
- 4,9,15-Trihidroxi-12a-(3'-hidroxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (7),
- 60 4,9,15-Triacetoxi-12a-(3'-acetoxifenil)-3,10-dimetil-2,11-dioxa-(1H,12H)-6b,6c,12a,16b-tetrahidronafto[1,2-g]criseno (7-Ac).

8. Método para la preparación de un compuesto de fórmula (Ia) según la reivindicación 1, incluyendo el método la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



5

en la que:

- 10 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ y R_{10} son tal como se define en la reivindicación 1, R_{13} es hidrógeno, R_9 , $C(O)R_9$, $Si(R_{10})_3$, alquilsulfonilo C_{1-6} o bencenosulfonilo, y X es O,

con un agente de acoplamiento.

- 15 **9.** Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de entre cáncer, proliferación o regulación positiva no deseadas del crecimiento celular, inflamación o trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunitarios, trastornos cardiovasculares y trastornos asociados a la activación de los receptores de estrógeno.
- 20 **10.** Compuesto según la reivindicación 9, en el que el tratamiento es el tratamiento del dolor asociado a la inflamación.
- 11.** Compuesto según la reivindicación 9 ó 10, en el que el trastorno inflamatorio es la enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, proctitis ulcerosa, colitis distal o enfermedad de Cröhn.
- 25 **12.** Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el tratamiento del trastorno inflamatorio no presenta efectos secundarios cardiovasculares y/o es protector intestinal.
- 13.** Compuesto según la reivindicación 12, en el que el tratamiento es cardioprotector.
- 30 **14.** Compuesto según la reivindicación 9, en el que el cáncer se selecciona de entre leucemia, glioma, melanoma y cáncer prostático, ovárico, mamario, colorrectal, pulmonar y pancreático.
- 35 **15.** Compuesto según la reivindicación 9 para el tratamiento del cáncer, en el que dicho compuesto se utiliza en una terapia de combinación que comprende administrar en un paciente de cáncer sometido a radioterapia un compuesto de fórmula (Ia), o pretratar dicho paciente de cáncer con dicho compuesto de fórmula (Ia) antes de dicha radioterapia.
- 40 **16.** Compuesto según la reivindicación 9 para el tratamiento del cáncer, en el que dicho compuesto se utiliza en una terapia de combinación que comprende administrar en un paciente de cáncer un compuesto de fórmula (Ia) y un segundo agente quimioterapéutico, o pretratar dicho paciente de cáncer con dicho compuesto de fórmula (Ia) antes del tratamiento con dicho segundo agente quimioterapéutico.
- 45 **17.** Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en asociación con uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticos.
- 18.** Bebida o alimento que contiene uno o más compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 50 **19.** Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización en un método para incrementar o restituir la sensibilidad de las células cancerosas o de un tumor a un agente quimioterapéutico mediante la puesta en contacto de dichas células o tumor con el compuesto de

fórmula (Ia).

5

- 20. Compuesto según la reivindicación 19, en el que el agente quimioterapéutico es un inhibidor de receptor del crecimiento o un estimulador de receptor de muerte.
- 21. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización en un método para proteger una célula no tumoral frente a la quimioterapia o radioterapia mediante la puesta en contacto de la célula no tumoral o una masa celular con el compuesto de fórmula (Ia).

Fig. 1

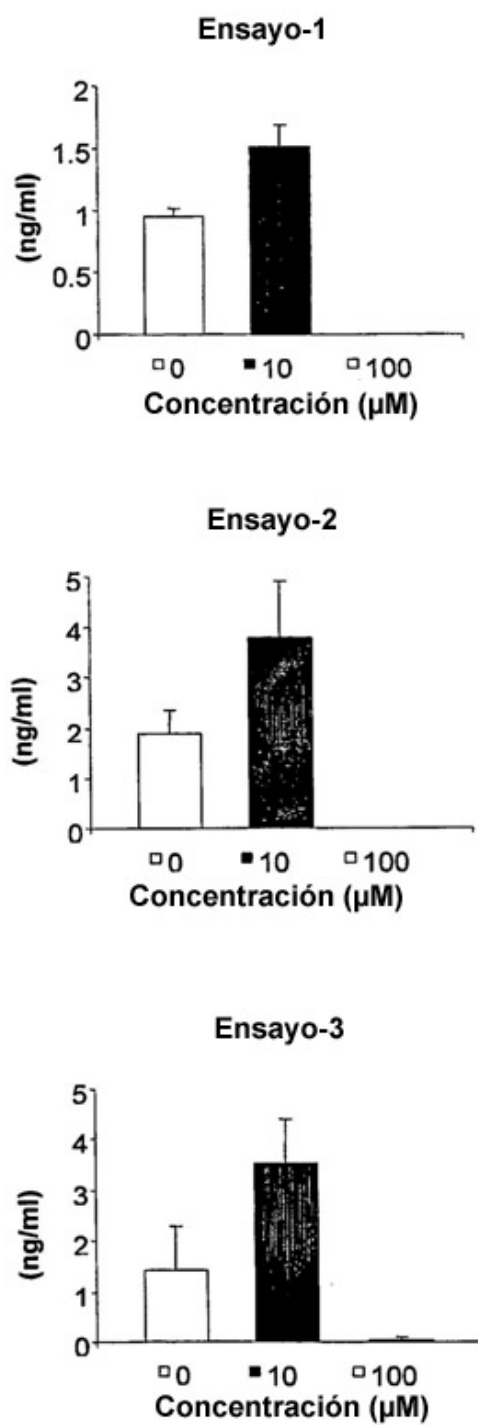


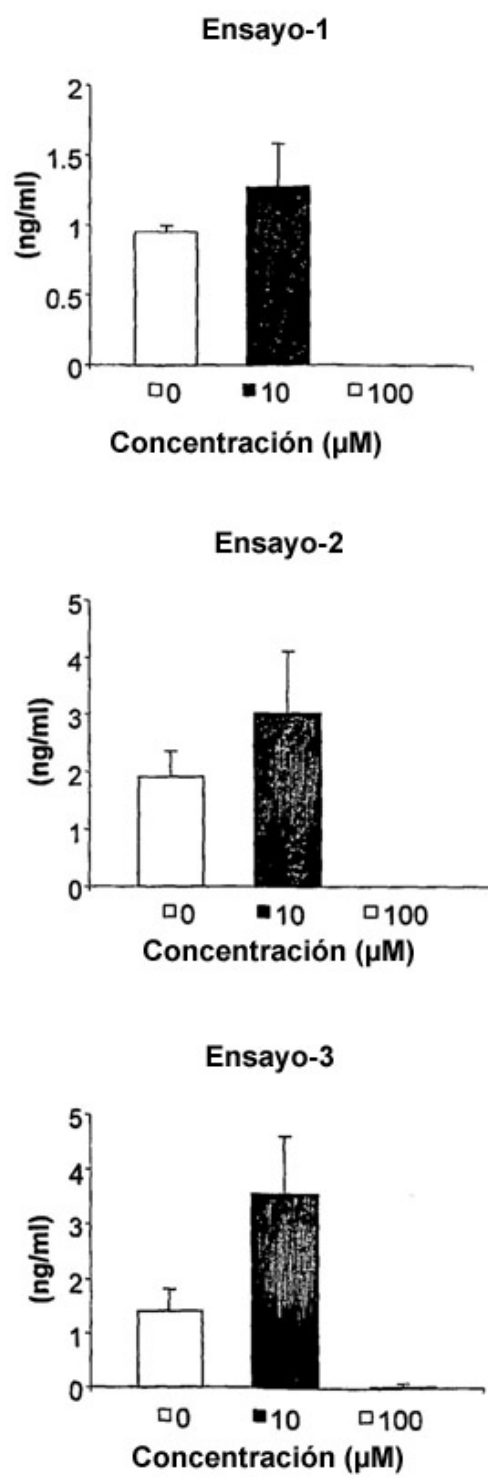
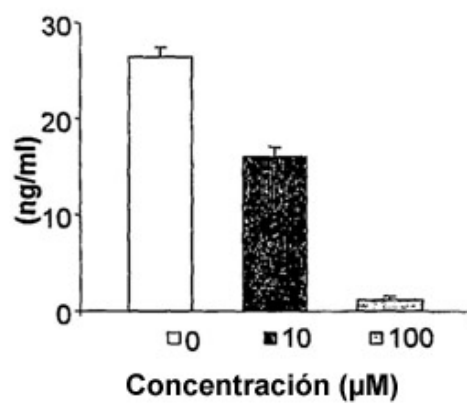
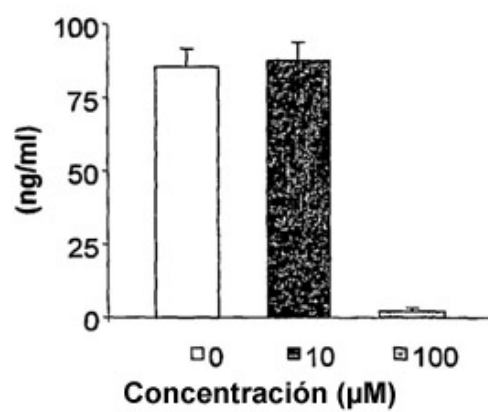
Fig. 2

Fig.3

Ensayo-1



Ensayo-2



Ensayo-3

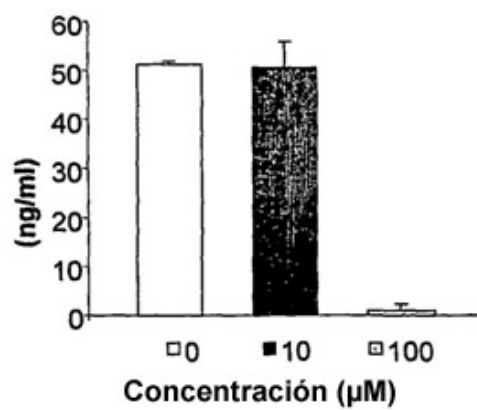
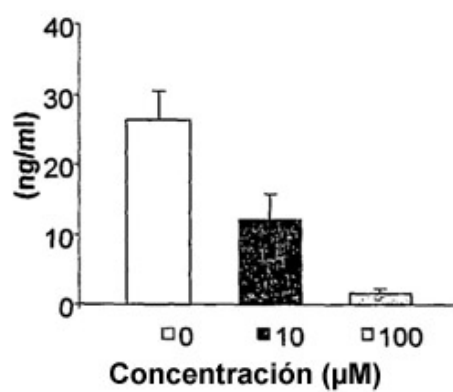
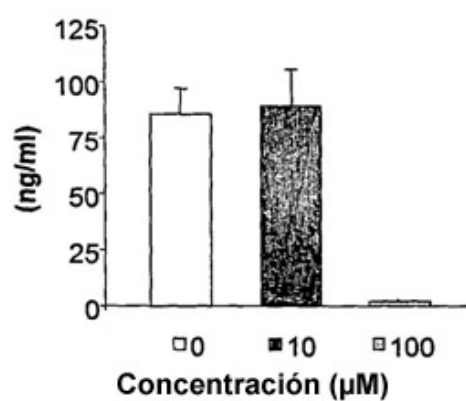


Fig. 4

Ensayo-1



Ensayo-2



Ensayo-3

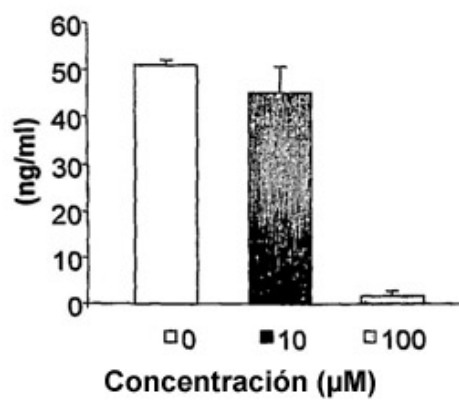


Fig. 5

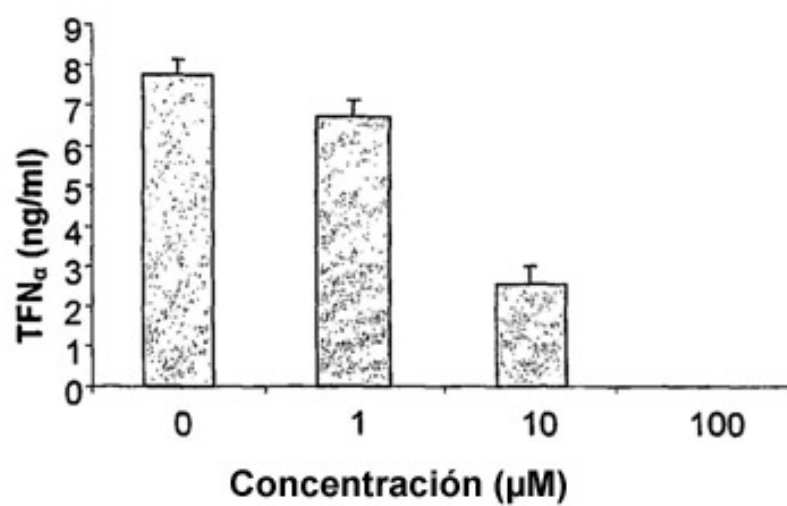


Fig. 6

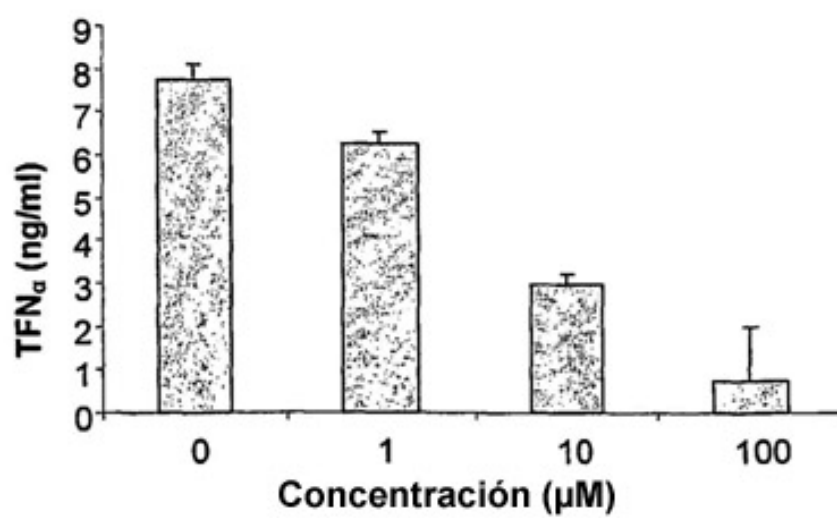


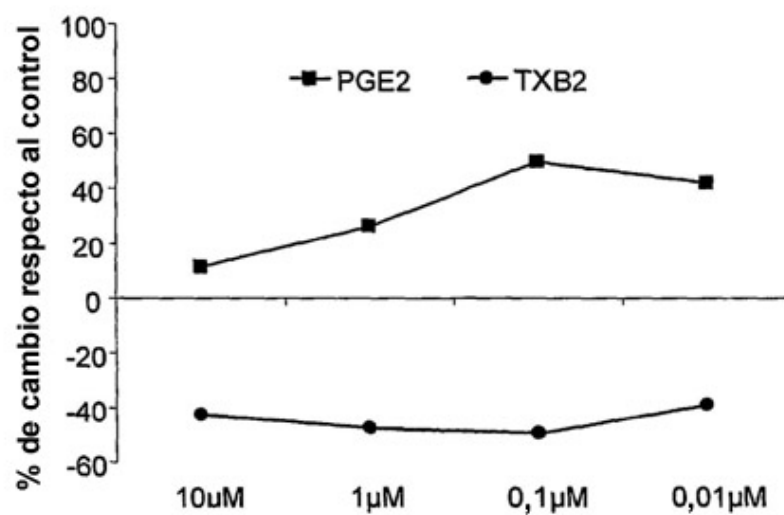
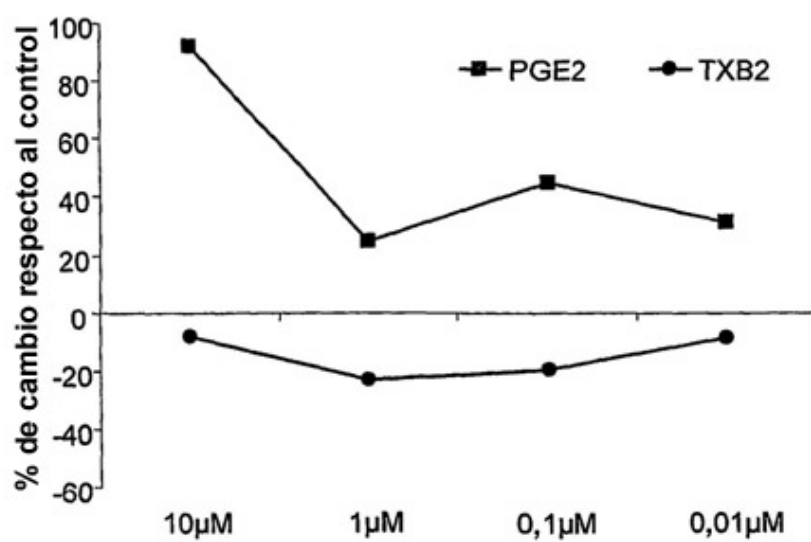
Fig. 7**Fig. 8**

Fig. 9

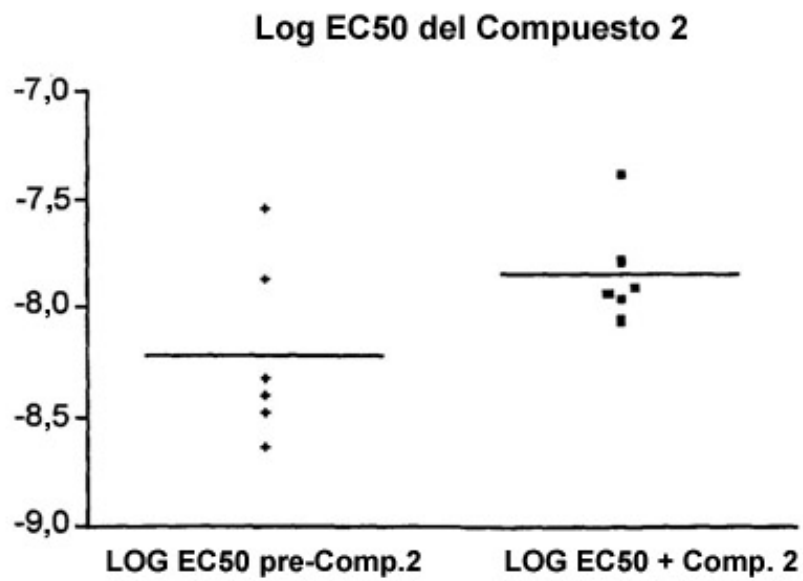
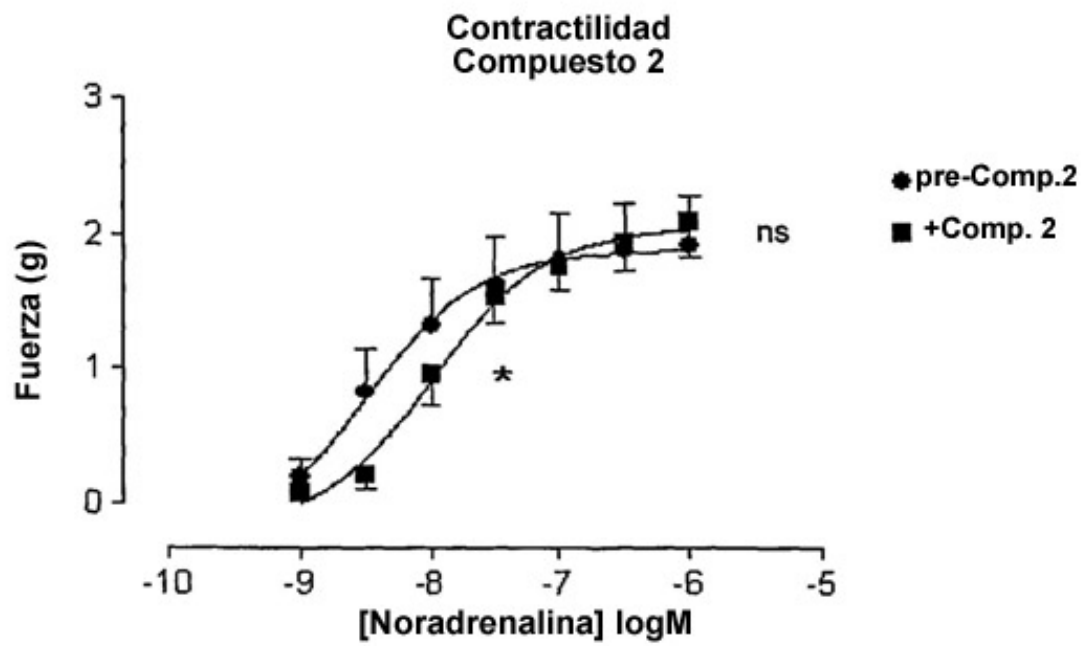


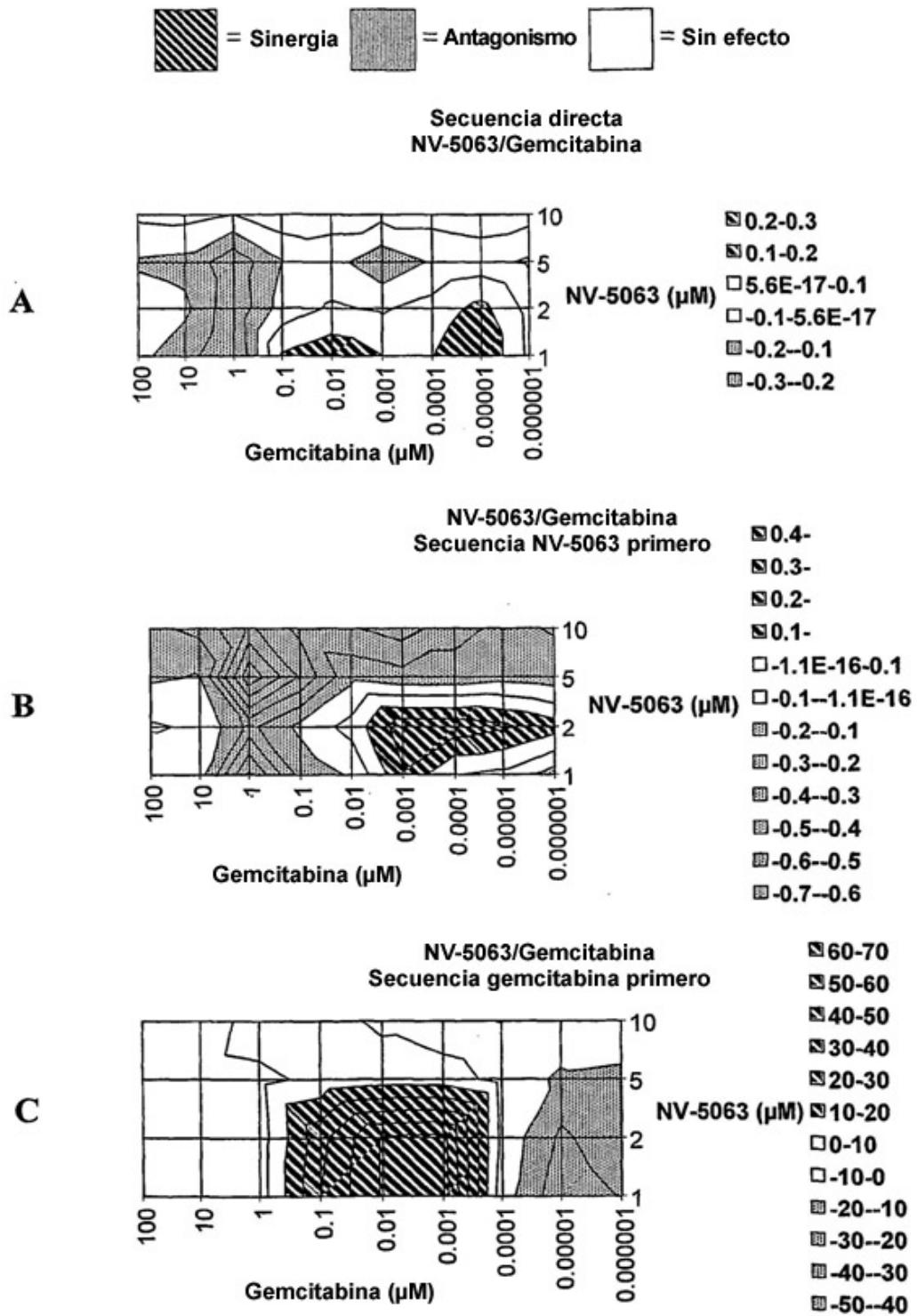
Fig. 10

Fig. 11

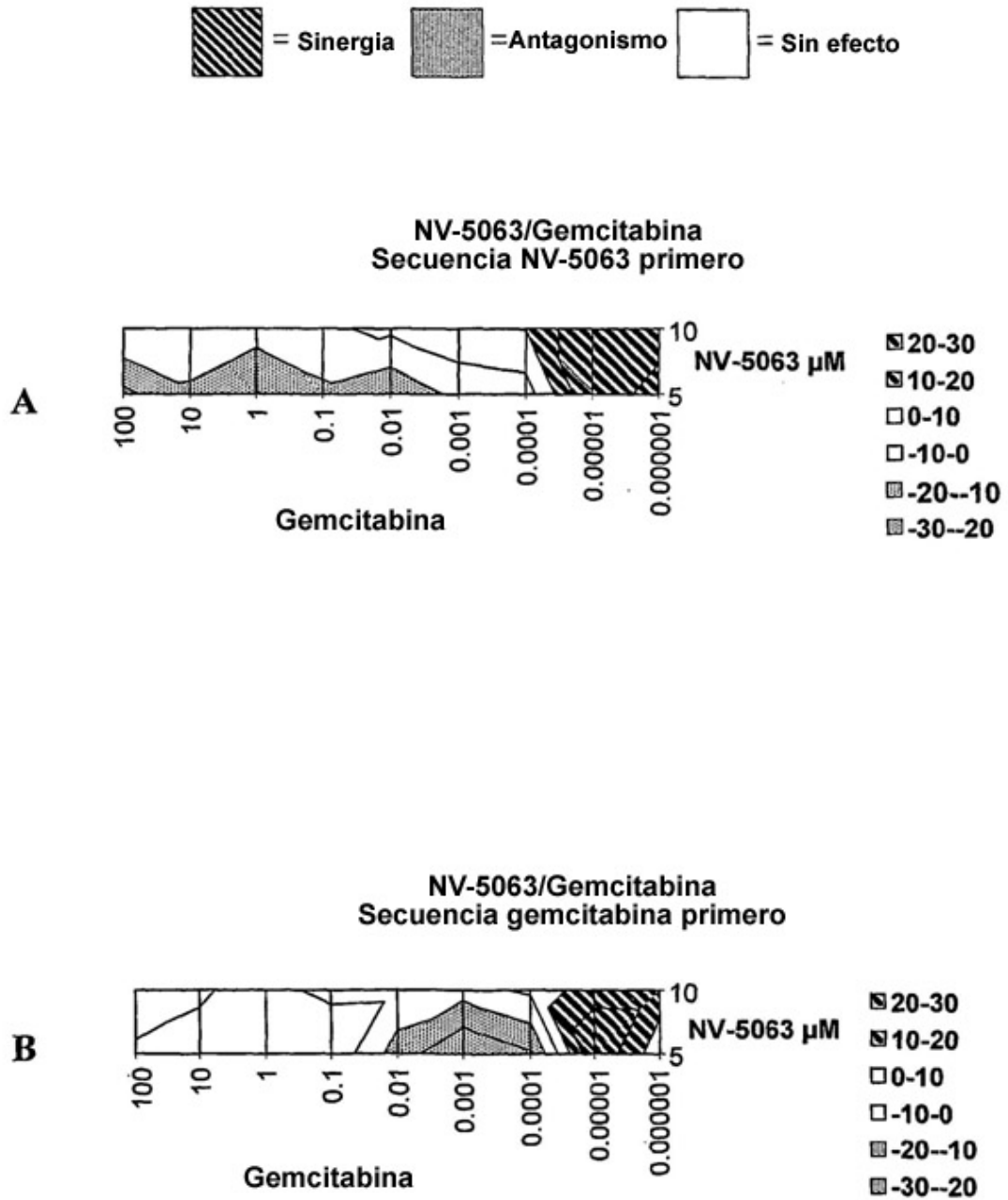


Fig. 12

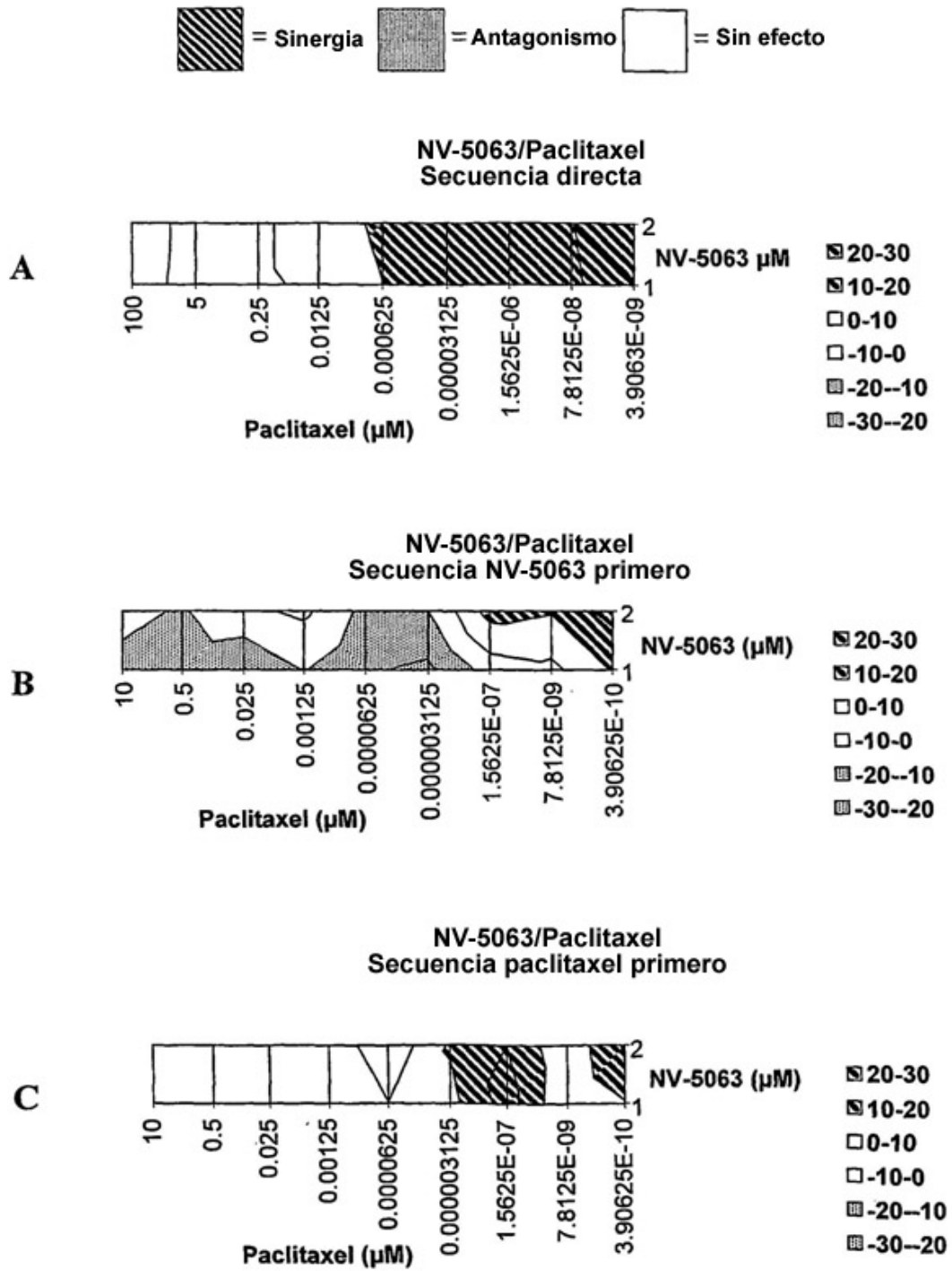
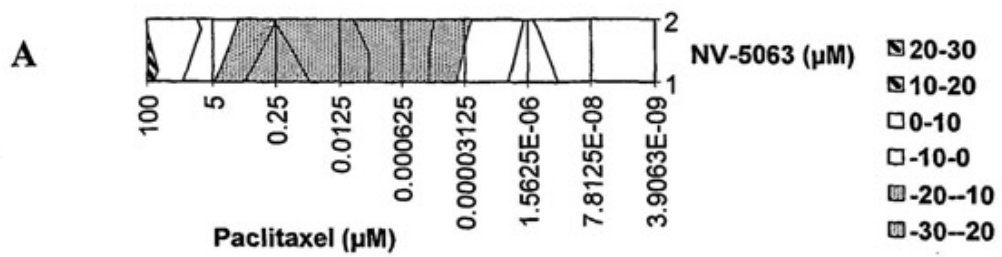


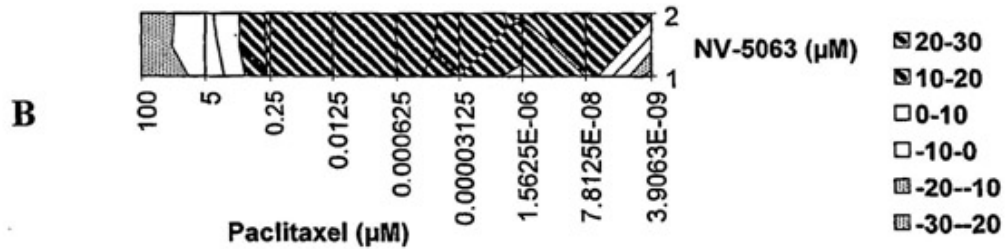
Fig. 13

 = Sinergia
  = Antagonismo
  = Sin efecto

NV-5063/Paclitaxel
Secuencia directa



NV-5063/Paclitaxel
Secuencia NV-5063 primero



NV-5063/Paclitaxel
Secuencia paclitaxel primero

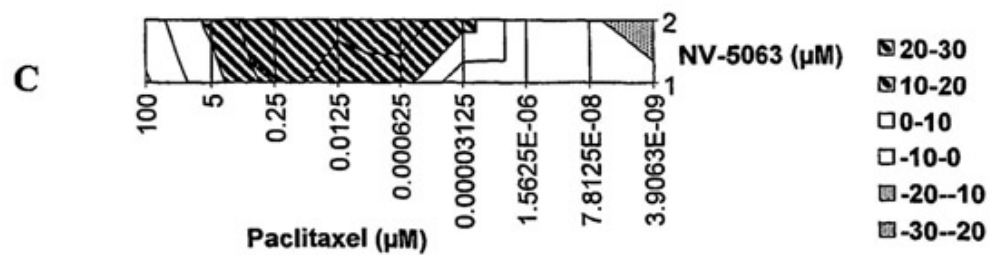
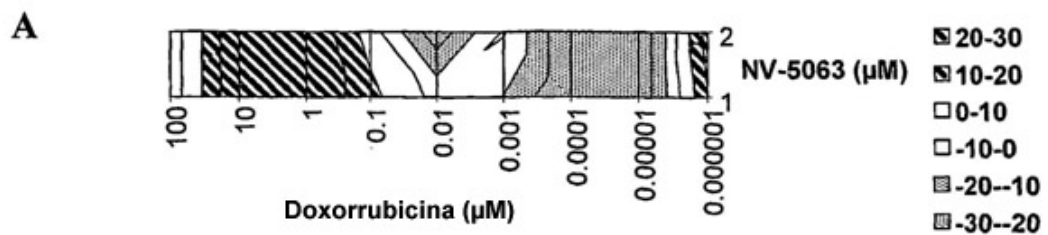


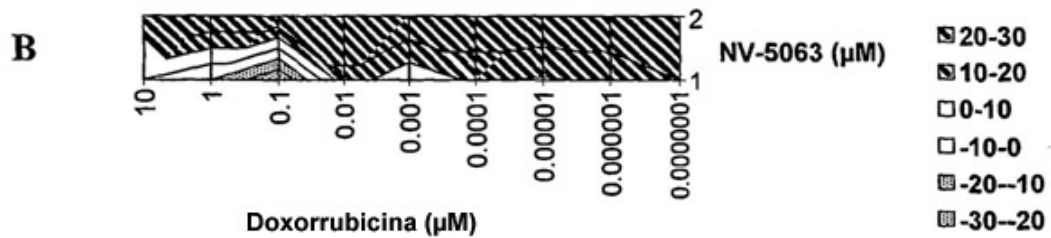
Fig. 14

 = Sinergia
  = Antagonismo
  = Sin efecto

NV-5063/Doxorrubicina
Secuencia directa



NV-5063/Doxorrubicina
Secuencia NV-5063 primero



NV-5063/Doxorrubicina
Secuencia doxorrubicina primero

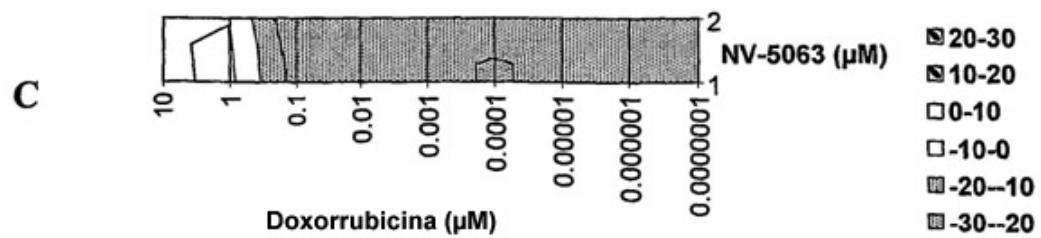


Fig. 15

 = Sinergia
  = Antagonismo
  = Sin efecto

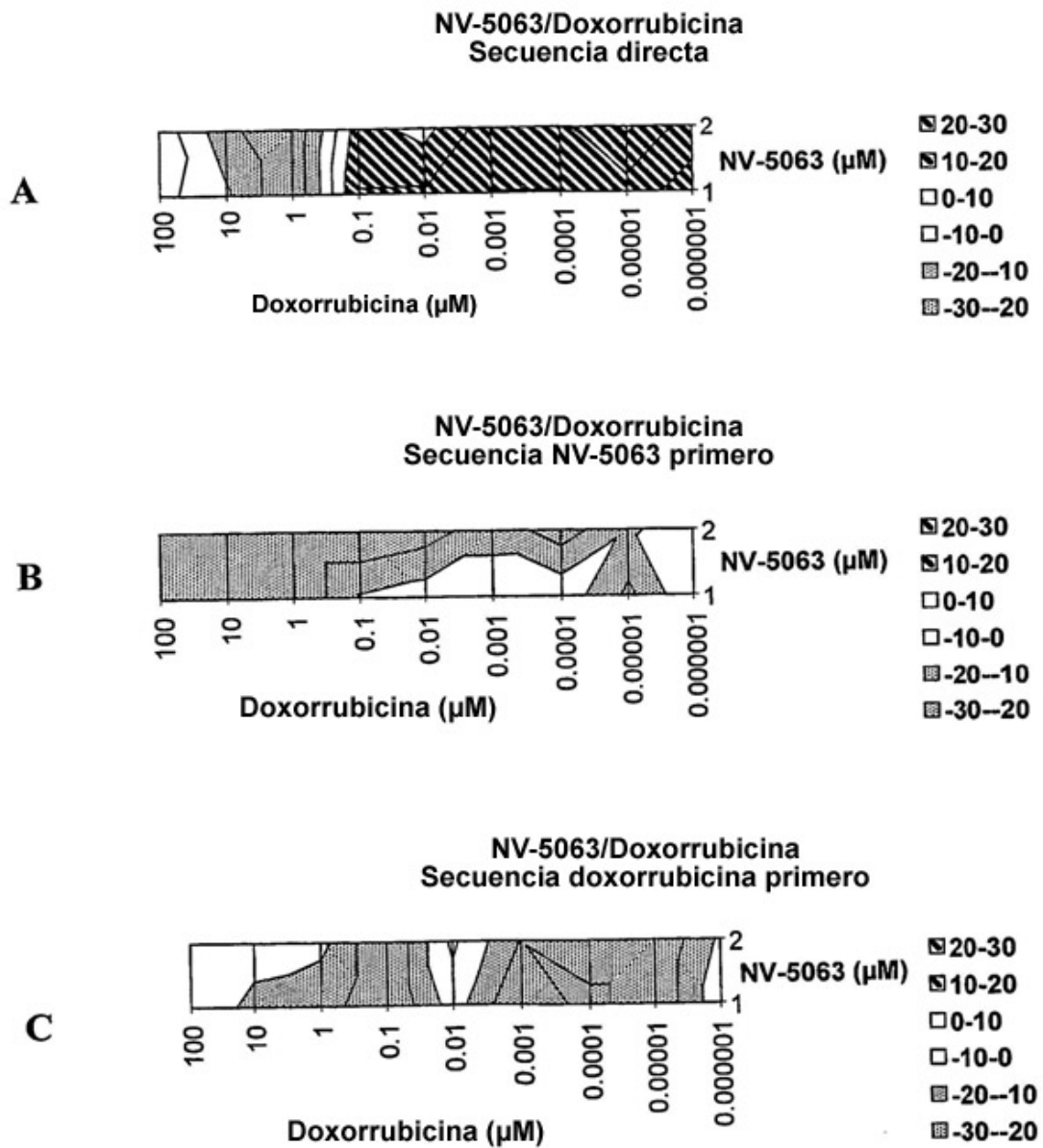


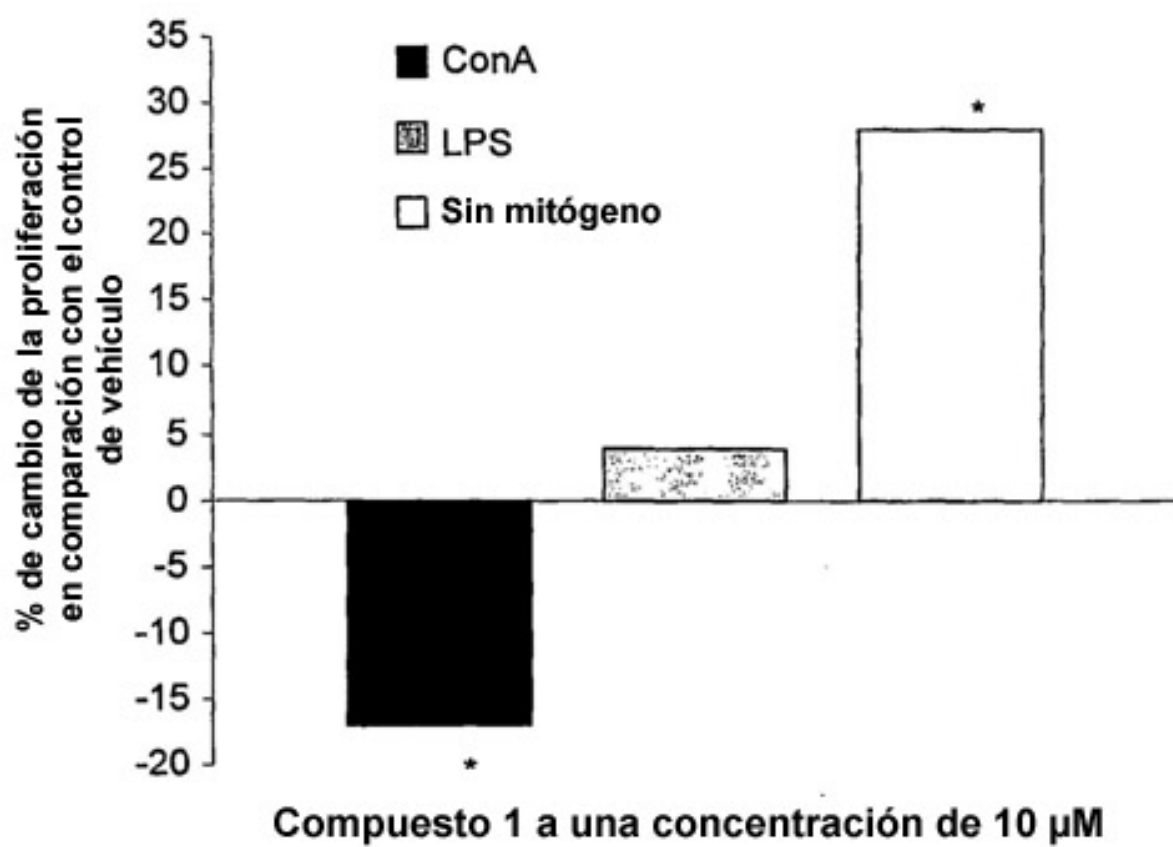
Fig. 16

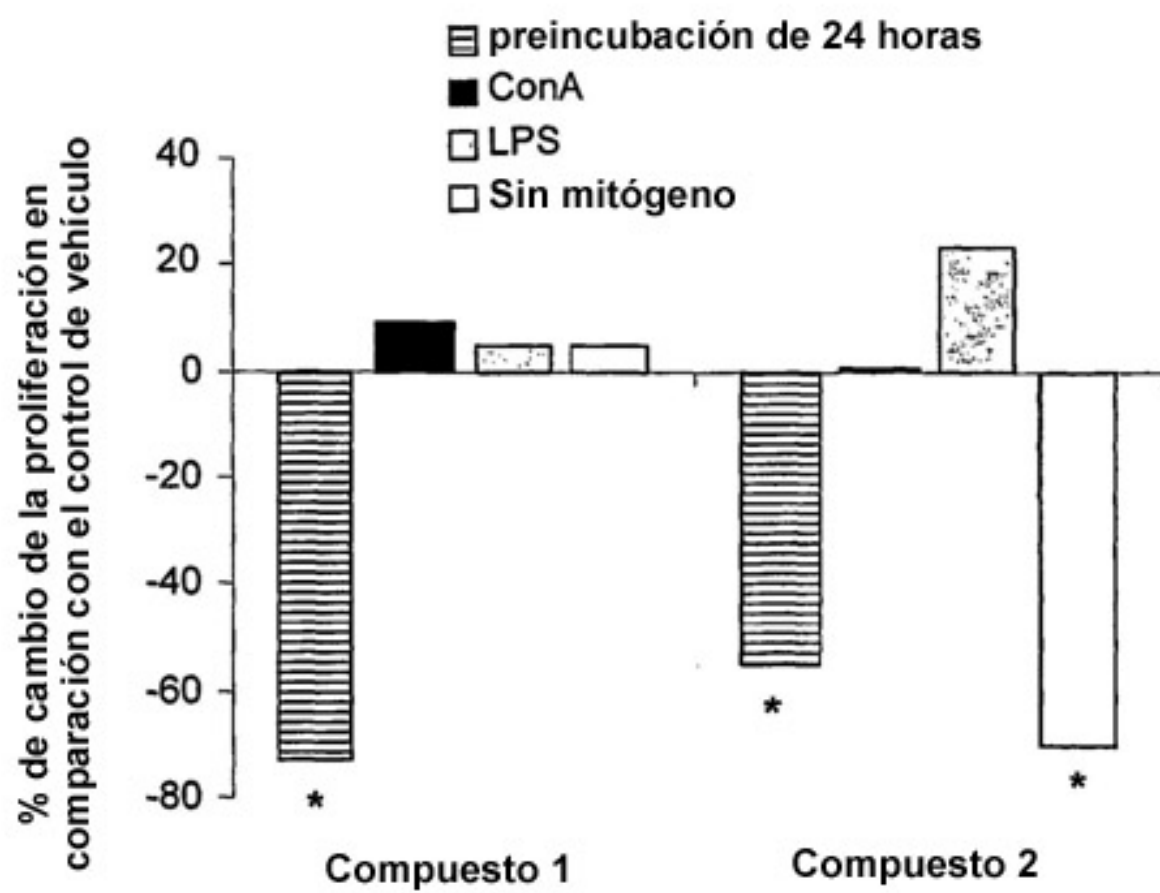
Fig. 17

Fig. 18