(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 431 045**

(51) Int. CI.:

C07D 311/58 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A23L 2/58 (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
C07D 311/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2005 E 05787045 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1809618**

(54) Título: **Derivados de cromano, medicamentos y uso terapéutico**

(30) Prioridad:

21.09.2004 US 611299 P
29.10.2004 JP 2004315009
05.11.2004 AU 2004906363 P
19.11.2004 WO PCT/AU2004/001619
03.05.2005 AU 2005201855
03.05.2005 US 676934 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2013

(73) Titular/es:

MARSHALL EDWARDS, INC. (100.0%)
11975 El Camino Real, Suite 101
San Diego, CA 92130, US

(72) Inventor/es:

HEATON, ANDREW y
HUSBAND, ALAN JAMES

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Derivados de cromano, medicamentos y uso terapéutico

Campo de la invención

La presente invención se refiere a ciertos nuevos derivados de cromano, a composiciones que los contienen, a métodos para su preparación y a usos de los mismos como agentes terapéuticos particularmente como agentes anti-cáncer y como agentes quimioterapéuticos selectivos.

Antecedentes de la invención

Se conocen más de 700 isoflavonas diferentes presentes en la naturaleza, algunas de las cuales tienen propiedades biológicas con potencial beneficio terapéutico.

La patente de Estados Unidos Nº 5.726.202 describe genéricamente ciertos compuestos de isoflavano, particularmente 3,4-diarilcromano y centcromano para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna.

El documento WO 01/17986 describe también ciertos compuestos de isoflavano.

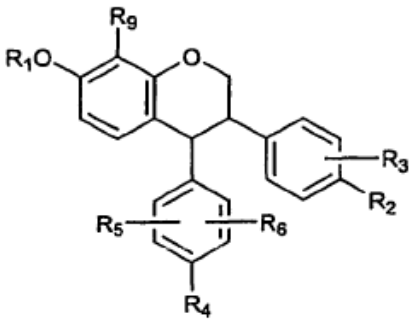
El documento WO 03/063859 describe el uso farmacéutico de derivados de cromano para el tratamiento o prevención de la osteoartritis o artritis reumatoide.

El documento WO 99/65893 describe derivados de benzopirano o tiobenzopirano que tienen una actividad anti-estrogénica y el uso farmacéutico de los mismos.

Compendio de la invención

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado un nuevo grupo de compuestos de la fórmula general (I) que presentan importantes actividades terapéuticas incluyendo una fuerte actividad anti-cáncer, selectividad quimioterapéutica y radiosensibilización de los cánceres.

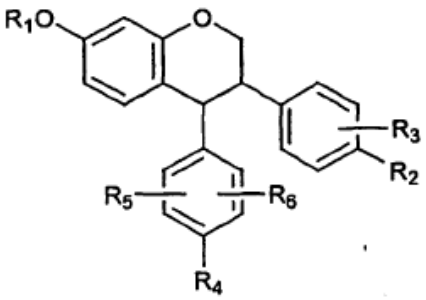
Por lo tanto según un aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de la fórmula general (I):



(I)

en la que
R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi, o alcoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno,
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, alcoxi, alquilo,
R_9 es hidrógeno o alquilo,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

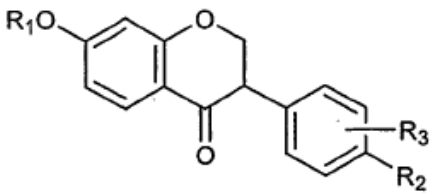
Por consiguiente, en otro aspecto de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (I-a):



(I-a)

en la que
R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno,
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I) que comprende la etapa de hacer reaccionar el grupo ceto de un compuesto de la fórmula (II):



(II)

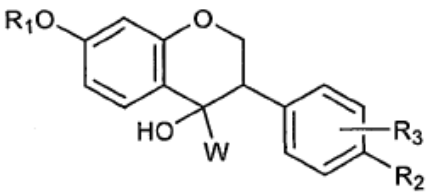
o el análogo del mismo que incluye un sustituyente que corresponde a R_9 en los compuestos de la fórmula (I)

en donde
R_1, es alquilo o un grupo protector tal como $Si(R_{10})_3$,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, alcoxi o $OSi(R_{10})_3$, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_{10} es independientemente alquilo o arilo,

con un agente arilante W−M+,

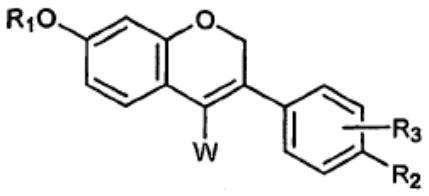
en donde
W^- es un radical arilo opcionalmente sustituido, y
M^+ es uno o más contraiones, preferiblemente $[MgBr]^+$,

para formar el alcohol terciario intermedio de la fórmula (III):



(III)

o un derivado protegido del mismo o una de sus sales (o uno de sus análogos incluyendo un sustituyente que corresponde a R_9 en los compuestos de la fórmula (I)) y que se deshidrata para formar un compuesto de la fórmula (IV):



(IV)

(o uno de sus análogos incluyendo un sustituyente que corresponde a R_9 en los compuestos de la fórmula (I)) cuyo doble enlace se reduce posteriormente, por ejemplo, por hidrogenación y opcionalmente se desprotege para formar un compuesto de la fórmula (I).

Según otro aspecto de la presente descripción se proporciona un compuesto de la fórmula general (III), composiciones que lo contienen y los usos de los mismos.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de la fórmula general (IV), composiciones que lo contienen y los usos de los mismos.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (I) en terapia, particularmente en quimioterapia y/o como un agente radiosensibilizante o quimiosensibilizante.

Según otro aspecto de la presente descripción se proporciona un método para el tratamiento, prevención o mejoría de una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un sujeto uno o más compuestos de la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en asociación con un vehículo y/o excipiente.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de uno o más compuestos de la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de a medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un agente para uso en el tratamiento, profilaxis o mejoría de una enfermedad o trastorno, cuyo agente comprende uno o más compuestos de la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en asociación con uno o más vehículos, excipientes, sustancias auxiliares y/o diluyentes farmacéuticos.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una bebida o un producto alimenticio, que contiene uno o más compuestos de la fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la descripción y reivindicaciones que siguen, junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa una comparación de la toxicidad de deshidroequol (DHE, gráfico A), 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol (HMC, compuesto 1 según la invención, gráfico B) y cisplatino (gráfico C), en los fibroblastos de prepucio neonatal.

La Fig. 2 representa la eficacia de HMC en las células de melanoma en comparación con el cisplatino.

La Fig. 3 representa un perfil farmacocinético de las formas libre y total de HMC (A) y DHE (B) después de administración p.o. (peri oral) a ratones BALB/c (50 mg/kg).

La Fig. 4 representa una comparación del perfil farmacocinético de la concentración de HMC en suero después de administración i.v. (intravenosamente) y de administración i.p. (intraperitonealmente) de HMC formulado en hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPBCD) al 20 %, en una dosis de 50 mg/kg.

La Fig. 5 representa datos comparativos del volumen medio del tumor tomados de ratones desnudos que tienen tumores cancerosos pancreáticos HPAC tratados o con HPBCD al 20 % administrado i.p .(control vehículo, qd×15) o con HMC (100 mg/kg, qd×15). Los datos se representan como la media ± SEM*, prueba T de student, $p<0,01$.

La Fig. 6 representa datos comparativos de la masa media terminal del tumor tomados de ratones desnudos que tienen tumores cancerosos pancreáticos HPAC tratados o con HPBCD al 20 % administrado i.p (control vehículo,

qd×15) o con HMC (100 mg/kg, qd×15). Los datos se representan como la media ± SEM*, prueba T de student, p<0,01.

La Fig. 7 representa datos comparativos de la masa media terminal del tumor tomados de ratones desnudos que tienen tumores cancerosos pancreáticos HPAC tratados o con HPBCD al 20 % administrado i.p (control vehículo, qd×15) o con HMC (100 mg/kg, qd×15). Los datos se representan como la media ± SEM*, prueba T de student, p<0,01.

La Fig. 8 representa un resumen de la incidencia de apoptosis en células de melanoma tratado con DHE y HMC durante un período de 24 y 48 horas.

La Fig. 9 representa la iniciación selectiva de la muerte celular programada en células de melanoma maligno (Mel-RM y Me4405) tratado con HMC y DHE. La misma concentración de DHE y HMC y los mismos tiempos de exposición no inducen la apoptosis en los fibroblastos normales (MRC-5).

La Fig. 10 representa un análisis 3D de los datos de citotoxicidad por sinergia de HMC-cisplatino en la línea celular MM200 de melanoma. Las combinaciones de HMC-cisplatino se evaluaron utilizando un protocolo de combinación de 5 días (Fig. 10A), o una secuencia de 24 h de HMC→anti-cáncer (Fig. 10B). Para cada experimento de combinación se evaluó el HMC a 10, 5, 2 y 1 µM. Véase la Tabla 8 para los datos originales.

La Fig. 11 representa el porcentaje de inhibición de TNFα en macrófagos murinos por los compuestos 6, esto es 3-(4-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-7-metoxicromano y 7 de la invención.

La Fig. 12 representa el espectro de ^{1}H NMR de 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)croman-7-ol.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que una clase de derivados de isoflavano de la fórmula general (I) presentan propiedades biológicas y farmacéuticas sorprendentes e inesperadas.

Se cree que los compuestos de la fórmula (I) de la invención tienen perfiles de toxicidad favorables con las células normales y una buena biodisponibilidad. Sorprendentemente los compuestos de la invención presentan una actividad anti-cáncer, significativamente mejor o al menos comparable a los tratamientos de cáncer conocidos.

Los compuestos de la fórmula (I) son citostáticos y citotóxicos frente a una amplia variedad de células cancerosas de origen humano y animal. Por células cancerosas, se entiende células que presentan características malignas y que se distinguen de las células no cancerosas por un crecimiento desregulado y un comportamiento que usualmente a la larga es potencialmente mortal a menos que se traten de forma satisfactoria.

Las células cancerosas que se ha encontrado que son sensibles a los compuestos de la fórmula (I) son de origen epitelial (por ejemplo, células de cáncer de próstata, de ovario, de cuello uterino, de mama, de vesícula biliar, pancreático, colorrectal, renal, y células de cáncer de pulmón no pequeñas), de origen mesenquimal (por ejemplo, células cancerosas de melanoma, de mesotelioma y de sarcoma), y de origen neural (por ejemplo células cancerosas de glioma). Es muy inusual y sorprendente encontrar un grupo relacionado de compuestos que presenten una citotoxicidad tan potente frente a las células cancerosas, pero con baja toxicidad frente a las células no cancerosas tales como los queratinocitos derivados del prepucio humano. Esta selectividad para las células cancerosas es muy inusual e inesperada.

De forma ventajosa los compuestos de la fórmula (I) presentan citotoxicidad frente a células cancerosas que son bien reconocidas por ser muy poco sensibles a los fármacos anti-cáncer convencionales. Es muy inusual e inesperado encontrar una actividad tan potente frente a cánceres, por ejemplo, colangiocarcinoma, adenocarcinoma pancreático y melanoma.

De forma ventajosa los compuestos de la fórmula (I) también presentan de forma inesperada una capacidad para hacer sensibles a la radiación a las células cancerosas, por lo que se considera que estos compuestos o reducen la cantidad de irradiación gamma que se requiere para destruir las células, o convierten las células cancerosas de un estado de radio-resistencia a un estado de radio-sensibilidad.

Adicionalmente los compuestos de la fórmula (I) se cree que poseen actividad quimio-sensibilizante, esto es aumentan la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos, especialmente para las células cancerosas, y/o convierten las células cancerosas de un estado de quimio-resistencia a un estado de quimio-sensibilidad.

Los compuestos de la invención pueden proporcionar también propiedades quimio y/o radio-protectoras para las células no cancerosas. Esto tiene implicaciones terapéuticas importantes porque los efectos secundarios traumáticos de la quimioterapia y radioterapia son causados por la toxicidad de los tratamientos tradicionales para las células no cancerosas.

Las propiedades descritas antes ofrecen ventajas clínicas significativas.

Las propiedades radio-protectoras y/o quimio-protectoras de los compuestos de la invención se pueden emplear para proteger a los individuos sanos de los efectos de la radiación y/o de las toxinas químicas, o para reducir los efectos de las mismas.

Por lo tanto, la invención proporciona también el uso de compuestos de la fórmula (I) para tratar a los pacientes con cáncer ya sea reduciendo la velocidad de crecimiento de tales tumores o reduciendo el tamaño de tales tumores mediante terapia con dichos compuestos solos, y/o en combinación uno con otro, y/o en combinación con otros agentes anti-cáncer, y/o en combinación con radioterapia.

El uso de los compuestos de la presente invención solos o en terapia de combinación como se ha descrito antes, puede reducir los efectos secundarios adversos experimentados a menudo por los pacientes cuando son tratados con tratamientos anti-cáncer convencionales. El uso de los compuestos de la invención puede significar que se puedan emplear en dicho tratamiento dosis más bajas lo que representa un importante avance para quienes padecen cáncer.

Preferiblemente R_3 en los compuestos de la fórmula (I) está en la posición 3.

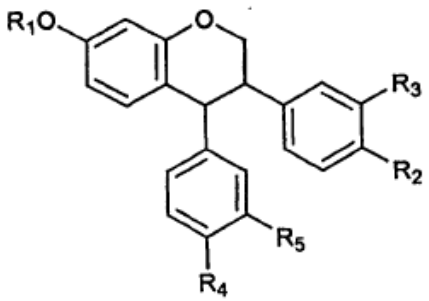
En otro aspecto de la invención R_9 es alquilo C_{1-4}, tal como metilo.

Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-a):
R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi C_{1-4}, con la condición de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, alcoxi,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Más preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-a):
R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno,
R_4 es hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi o isopropoxi, y
R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi o isopropoxi,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos particulares preferidos de la fórmula (I-a) tienen los siguientes sustituyentes donde:
R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o metoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno,
R_4 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi o metoxi, y
R_5 es hidrógeno,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención se extiende también a los compuestos de la fórmula (I-b):

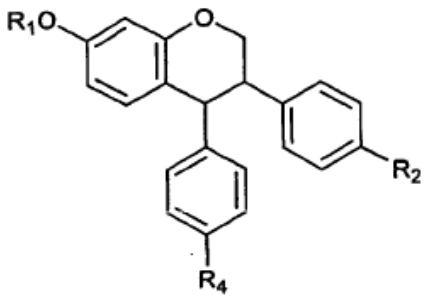


(I-b)

en la que:
R_1 representa hidrógeno,
R_2 representa hidrógeno, hidroxi o alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, etoxi, propoxi, más preferiblemente hidroxi o metoxi, especialmente hidroxi.
R_3 representa hidrógeno, hidroxi, alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, etoxi, propoxi, más preferiblemente hidrógeno o metoxi, especialmente hidrógeno, con la condición de que R_2 y R_3 no representan ambos hidrógeno,

R_4 representa hidrógeno, hidroxi, alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, etoxi, propoxi, alquilo C_{1-6} tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, especialmente hidrógeno, hidroxi, metoxi o metilo particularmente metoxi o hidroxi,
R_5 representa hidrógeno, alcoxi C_{1-6}, alquilo C_{1-6}, especialmente hidrógeno, metoxi, hidroxi, particularmente hidrógeno,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos preferidos de la invención incluyen los de la fórmula general (I-c):



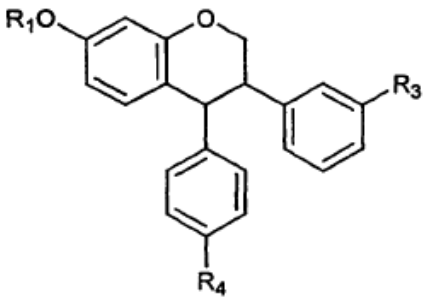
(I-c)

en la que:
R_1 es hidrógeno,
R_2 es hidroxi o alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, secbutoxi, butoxi terciario, y
R_4 es hidroxi o alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, secbutoxi, butoxi terciario
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Más preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-c) R_2 es hidroxi o metoxi, especialmente hidroxi.

Más preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-c) R_4 es hidroxi o metoxi, especialmente metoxi.

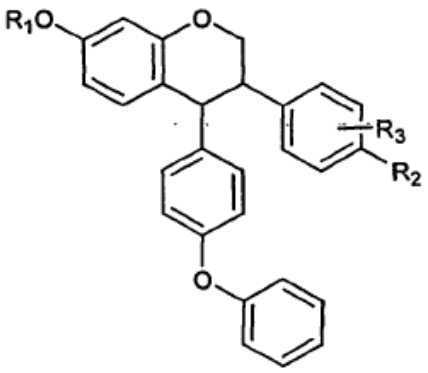
En un aspecto alternativo la invención proporciona compuestos de la fórmula (I-d):



(I-d)

en la que:
R_1 es hidrógeno,
R_3 es hidroxi o alcoxi, y
R_4 es hidrógeno, hidroxi, alcoxi o alquilo.

En otro aspecto alternativo la descripción proporciona compuestos de la fórmula (I-e):



(I-e)

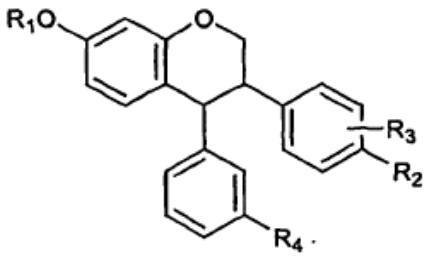
en la que
R_1 es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o $C(O)R_7$, y
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi, alcoxi, alquilo, cicloalquilo, halo o $OC(O)R_7$, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno,

Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-e) R_1 representa hidrógeno o metilo, especialmente hidrógeno.

Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-e) R_2 representa hidroxi o alcoxi C_1-C_6 tal como metoxi.

En los compuestos de la fórmula (I-e) preferiblemente R_3 representa hidrógeno, hidroxi o metoxi, especialmente hidrógeno.

En otro aspecto alternativo la invención proporciona compuestos de la fórmula (I-f):



(I-f)

en la que
R_1 es hidrógeno,
R_3 es hidroxi o alcoxi, y
R_4 es hidrógeno, hidroxi, alcoxi o alquilo.

Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-f) R_2 representa hidroxi o alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, especialmente hidroxi.

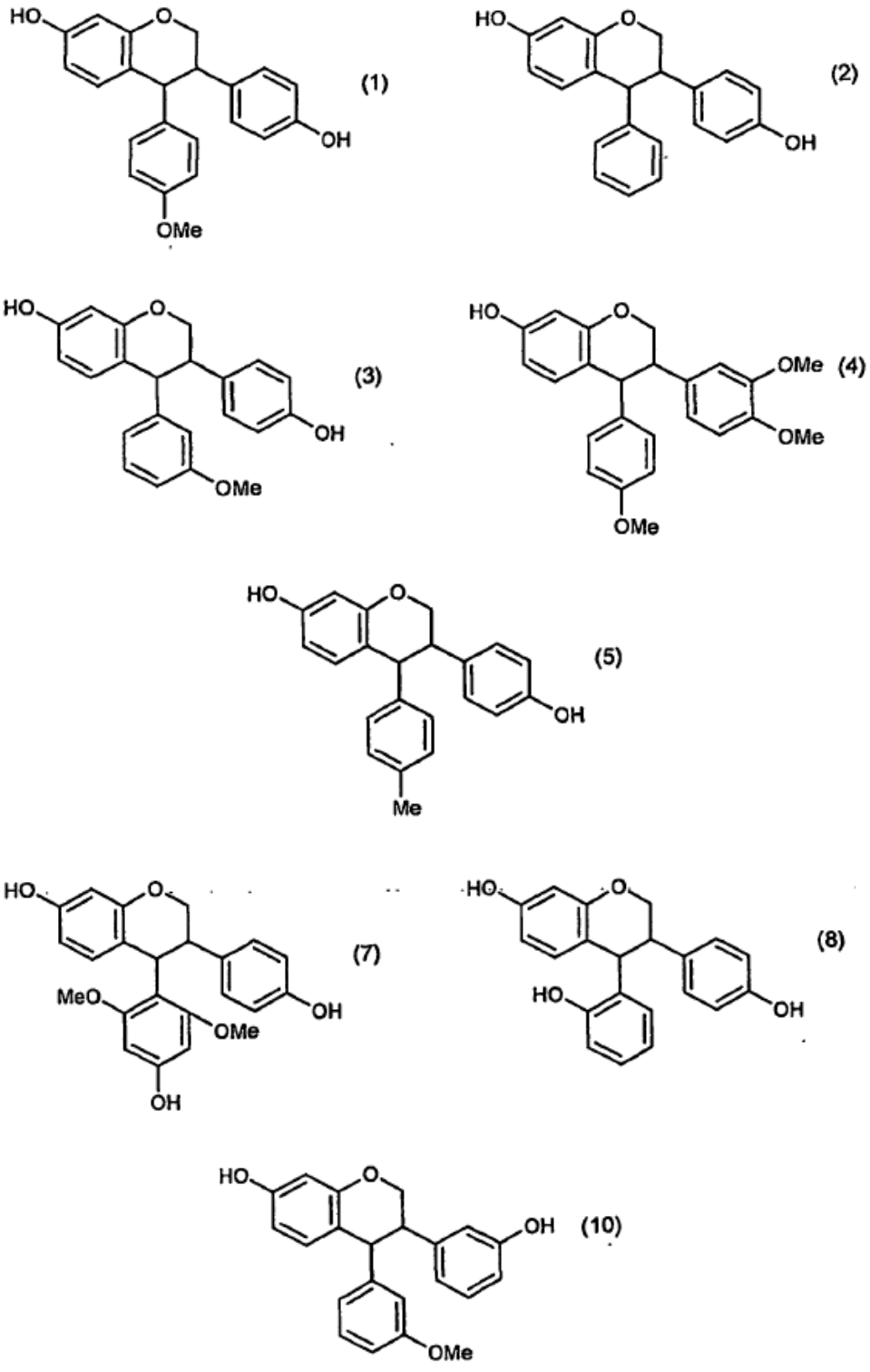
Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-f) R_3 representa hidrógeno o alcoxi C_{1-6} tal como metoxi, especialmente hidrógeno.

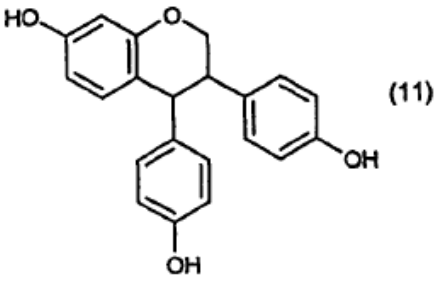
Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I-f) R_3 está en la posición 3.

Los compuestos especialmente preferidos de la fórmula (I) incluyen:

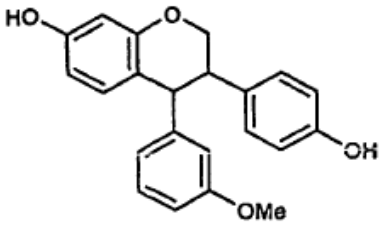
3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol (HMC; Comp. 1);
3-(4-hidroxifenil)-4-fenilcroman-7-ol (Comp. 2);
3-(4-hidroxifenil)4-(3-metoxifenil)croman-7-ol (Comp. 3);
3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol (Comp. 4);
3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metilfenil)croman-7-ol (Comp. 5);
3-(4-hidroxifenil)4-(2,6-dimetoxi-4-hidroxifenil)croman-7-ol (Comp. 7);
3-(4-hidroxifenil)-4-(2-hidroxifenil)croman-7-ol (Comp. 8);
3-(3-hidroxifenil)-4-(3-metoxifenil)croman-7-ol (Comp. 10);
3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)croman-7-ol (HHC; Comp. 11);
3-(4-hidroxifenil)-4-(3-metoxifenil)croman-7-ol (Comp. 13);

3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metilcroman-7-ol (Comp.16).

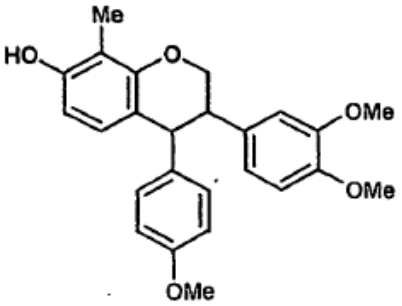




(11)



(13)



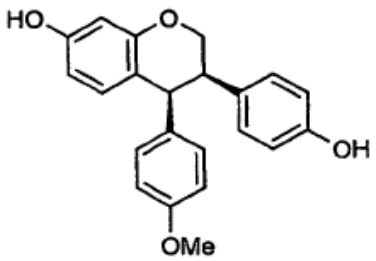
(16)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la fórmula (I) según la invención incluyen dos centros quirales. La presente invención incluye todos los enantiómeros y diastereoisómeros así como sus mezclas en todas las proporciones. La invención se extiende también a los enantiómeros aislados o pares de enantiómeros. Los métodos de separación de enantiómeros y diastereoisómeros son bien conocidos por las personas expertas en la técnica.

Será evidente para las personas expertas en la técnica que en los compuestos de la fórmula (I) los sustituyentes arilo sobre el anillo heterocíclico puede ser *cis* o *trans* uno con respecto a otro. Preferiblemente en los compuestos de la fórmula (I) estos sustituyentes serán *cis*.

Un compuesto particularmente preferido de la presente invención es el isómero *cis* del compuesto Nº (1), HMC:

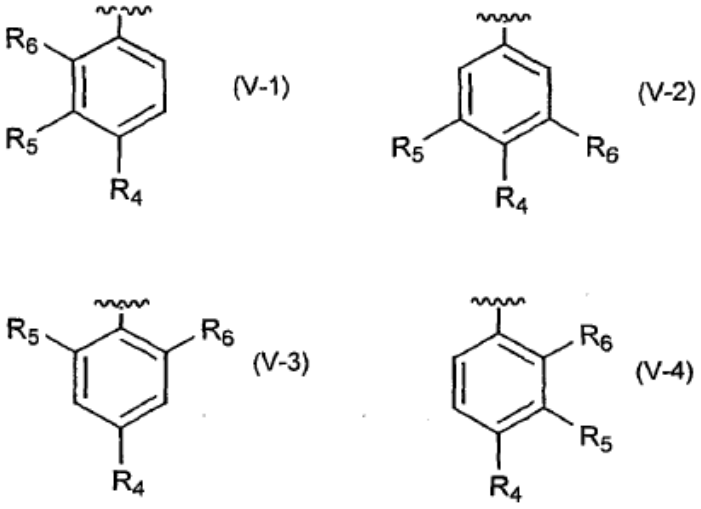


o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, son compuestos particularmente preferidos los compuestos números (2) a (16) en la conformación *cis*.

Los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) son intermedios como se expone en esta memoria. Cada intermedio correspondiente de isoflavan-4-ol e isoflavan-3-eno de los compuestos números (1) a (16) son también compuestos preferidos de la presente invención.

W en los compuestos de la fórmula (III) y (IV) puede representar, por ejemplo, los siguientes radicales:



o uno de sus derivados protegidos, en donde R_4, R_5 y R_6 son como se han definido antes para los compuestos de la fórmula (I).

El término “isoflavona” como se usa aquí se debe considerar ampliamente para incluir isoflavonas, isoflavenos, isoflavanos, isoflavanonas, isoflavanoles y similares.

El término “alquilo” se considera que incluye los grupos alquilo saturados de cadena lineal y de cadena ramificada de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo, butilo terciario, pentilo y similares. El grupo alquilo más preferido contiene preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, especialmente metilo, etilo, propilo o isopropilo.

Cicloalquilo incluye cicloalquilo C_{3-6} tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Preferiblemente el grupo alquilo no tiene ningún sustituyente.

El término “arilo” se considera que incluye fenilo, bencilo, bifenilo y naftilo y puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo C_1-C_4, hidroxi, alcoxi C_1-C_4, carbonilo, alcoxi C_1-C_4-carbonilo, alquil C_1-C_4-carboniloxi, nitro o halo.

El término “halo” se considera que incluye fluoro, cloro, bromo y yodo, preferiblemente fluoro y cloro, más preferiblemente fluoro. La referencia, por ejemplo, a “haloalquilo” incluirá grupos alquilo monohalogenados, dihalogenados y hasta perhalogenados. Los grupos haloalquilo preferidos son trifluorometilo y pentafluoroetilo.

Los compuestos de la invención incluyen todas las sales, tales como sales de adición de ácido, sales aniónicas y sales zwitteriónicas, y en particular incluyen las sales farmacéuticamente aceptables conocidas por los expertos en la técnica El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a un resto orgánico o inorgánico que lleva una carga y que puede ser administrado en asociación con un agente farmacéutico, por ejemplo, como un contra-catión o contra-anión en una sal. Los cationes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen pero no se limitan a sodio, potasio, calcio, cinc y amina cuaternaria. Los aniones farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen pero no se limitan a cloruro, acetato, tosilato, citrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas a partir de: ácido acético, ascórbico, aspártico, benzoico, bencenosulfónico, cítrico, cinámico, etanosulfónico, fumárico, glutámico, glutárico, glucónico, clorhídrico, bromhídrico, láctico, maleico, málico, metanosulfónico, naftoico, hidroxinaftoico, naftalensulfónico, naftalendisulfónico, naftalenacrílico, oleico, oxálico, oxaloacético, fosfórico, pirúvico, p-toluensulfónico, tartárico, trifluoroacético, trifenilacético, tricarbalílico, salicílico, sulfúrico, sulfámico, sulfanílico y succínico.

El término “derivado farmacéuticamente aceptable” o “profármaco” se refiere a un derivado del compuesto activo que después de administración al receptor es capaz de proporcionar directa o indirectamente, el compuesto parental o

metabolito, o que presenta actividad por sí mismo e incluye por ejemplo derivados fosfatos y derivados sulfonatos. Por lo tanto, los derivados incluyen solvatos, ésteres farmacéuticamente activos, profármacos o similares. Esto incluye también derivados con grupos salientes fisiológicamente escindibles que se pueden escindir *in vivo* para dar los compuestos de la invención o su resto activo. Los grupos salientes pueden incluir acilo, fosfato, sulfato, sulfonato, y preferiblemente son compuestos mono, di- y per-aciloxi-sustituidos, donde uno o más de los grupos hidroxi pendientes están protegidos por un grupo acilo, preferiblemente un grupo acetilo. Típicamente los compuestos de la invención sustituidos con aciloxi son fácilmente escindibles hasta los correspondientes compuestos sustituidos con hidroxi.

Cuando sea apropiado, se puede usar la protección de grupos químicos funcionales, la desprotección, sintones y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica para ayudar en la síntesis de los compuestos de la presente invención, y sus materiales de partida.

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

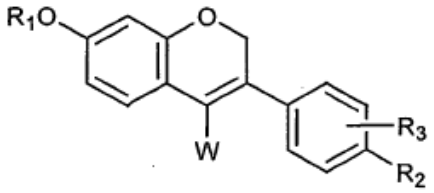
Los grupos protectores de hidroxilo incluyen pero no se limitan a ésteres de ácido carboxílico, p.ej. ésteres acetato, ésteres de arilo tales como benzoato, acetales/cetales tales como acetónido y bencilideno, éteres tales como éter o-bencílico y p-metoxibencílico, éter de tetrahidropiranilo y éteres de sililo tales como t-butildimetil-silil-éter.

Los grupos protectores se pueden separar, por ejemplo, por hidrólisis o reducción catalizada por ácido o base, por ejemplo, hidrogenación. Los éteres de sililo pueden requerir fluoruro de hidrógeno o fluoruro de tetrabutilamonio para ser escindidos.

Estará claro para los expertos en la técnica de la química médica que los compuestos de la fórmula (I) se pueden convertir en otros compuestos de la fórmula (I), por ejemplo, cuando un compuesto de la fórmula (I) lleva uno o más sustituyentes hidroxilo entonces uno o más de estos sustituyentes se puede convertir en un sustituyente halo tal como bromo, cloro o yodo tratando el alcohol con un agente halogenante. Los agentes halogenantes incluyen compuestos como NBS, ácido bromhídrico, cloro gas etc. Puede ser necesario durante procesos tales como halogenación utilizar grupos protectores para proteger otras funcionalidades en la molécula.

Los hidroxilos tipo fenólico pueden no ser fácilmente convertibles en el correspondiente compuesto halógeno por tratamiento con un agente halogenante. Sin embargo, el compuesto halógeno deseado se puede preparar, por ejemplo, tratando un material de partida de arilamina apropiado con $NaNO_2$ en presencia de HCl en condiciones de temperatura reducida tal como 0 °C, para formar la correspondiente sal azida. Se puede usar el tratamiento posterior con CuCl, CuBr, KI o HBF_4 para convertir la azida en el halo-compuesto requerido.

Un procedimiento general para preparar los compuestos de la fórmula (I) comprende la etapa de tratar un compuesto de la fórmula (IV):



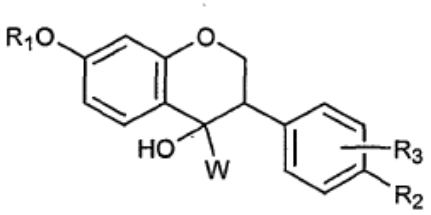
(IV)

en la que R_1, R_2, R_3 y W son como se han definido antes en relación a los compuestos de la fórmula (II), con un agente reductor para proporcionar un compuesto de la fórmula (I) o un derivado protegido del mismo.

Los agentes reductores son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir fuentes de hidruros tales como borohidruros y borohidruros de metales alcalinos, pero deben incluir hidrógeno en la hidrogenación catalítica donde se puede usar un catalizador adecuado tal como paladio sobre carbono. Otras fuentes de hidruros adecuadas incluyen triacetoxiborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de tetrabutil-amonio y cianoborohidruro de sodio.

Preferiblemente el doble enlace de los compuestos de la fórmula (IV) se reduce por hidrogenación.

Los compuestos de la fórmula (IV) se preparan deshidratando un compuesto de la fórmula (III):



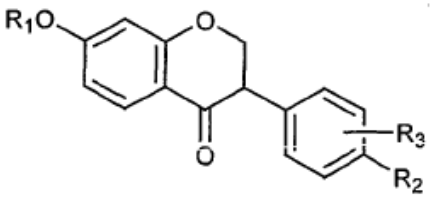
(III)

en la que R_1, R_2, R_3 y W son como se han definido antes, en relación a los compuestos de la fórmula (II) o un derivado protegido de los mismos.

La deshidratación se puede catalizar, por ejemplo, por un ácido, por una base o se puede facilitar por conversión del alcohol terciario en un grupo saliente mejor, como es conocido por los expertos en la técnica.

Preferiblemente los compuestos de la fórmula (III) se deshidratan, por ejemplo, por tratamiento con ácido para-toluensulfónico.

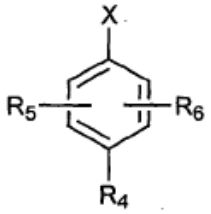
Los compuestos de la fórmula (III) se pueden preparar tratando los compuestos de la fórmula (II):



(II)

en la que R_1, R_2, R_3 son como se han definido antes para los compuestos de la fórmula (II) o un derivado protegido de los mismos con un agente arilante, por ejemplo, un compuesto de la fórmula W^-M^+ en la que W^- es un radical arilo opcionalmente sustituido y M^+ es uno o más contraiones, preferiblemente $[MgBr]^+$.

El agente arilante W^-M^+ se puede preparar por química de Grignard donde el compuesto haloarilo (V):



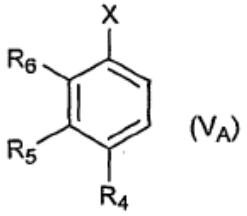
(V)

o un derivado protegido del mismo, en donde

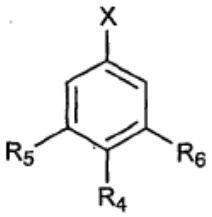
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, alcoxi, alquilo, acilo, $OC(O)R_7$, un hidroxi protegido tal como $OSi(R_{10})_3$ o un amino protegido tal como haluro de trimetilsililamino-fenilo, y
R_{10} es independientemente alquilo o arilo, y
X es halo, preferiblemente bromo,

se hace reaccionar con un metal tal como magnesio para formar el agente arilante.

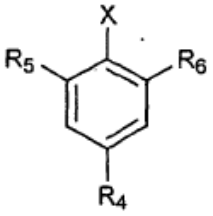
Preferiblemente el compuesto haloarilo (V) se selecciona de:



(V_A)



(V_B)



(V_C)

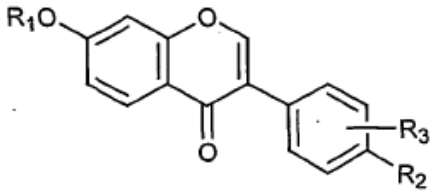
en donde R_4, R_5, R_6 y X son como se han definido antes para los compuestos de la fórmula (V).

La reacción del agente arilante con la cetona de la fórmula (II) proporciona acceso a los correspondientes isoflavan-4-oles (III), isoflav-3-enos (IV) e isoflavanos (I) de la presente invención.

Alternativamente, los compuestos de la fórmula (III) se pueden preparar haciendo reaccionar los compuestos de la fórmula (II) con un compuesto análogo a los compuestos de la fórmula (V) en donde X representa cualquier grupo saliente L apropiado que se pierde en la formación del producto por adición nucleófila del resto arilo a una cetona mediante reacciones bien conocidas por los expertos en la técnica.

Preferiblemente cualquiera de los alcoholes libres, ésteres u otros grupos reactivos de este tipo en los compuestos ceto de la fórmula (II) serán protegidos, por ejemplo, como éteres t-butildimetilsilílicos durante la reacción de adición nucleófila.

Los compuestos de la fórmula (II) se pueden preparar reduciendo cualquier doble enlace de los compuestos de la fórmula (VI):

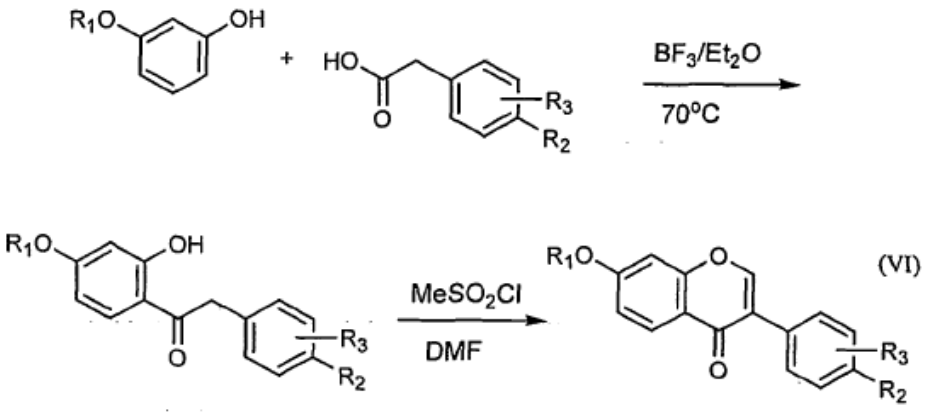


(VI)

o un derivado protegido de los mismos, en donde R_1, R_2 y R_3 son como se han definido antes, para los compuestos de la fórmula (II).

Los agentes reductores apropiados se han descrito antes. Preferiblemente la reducción del doble enlace carbono-carbono se puede efectuar, por ejemplo, por hidrogenación.

El acceso a los compuestos de la fórmula general (VI) se puede obtener por métodos generales sintéticos como se indica en el Esquema 1 que sigue y como se describe en la Solicitud internacional publicada Nº WO01/17986, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. En el Esquema 1 se representa una síntesis típica.



Esquema 1

El acceso a los diferentes cromanos sustituidos con 3-fenilo se puede obtener variando el modelo de sustitución sobre el grupo derivado de ácido fenilacético.

El acceso a los diferentes cromanos sustituidos con 4-fenilo se puede obtener variando el modelo de sustitución del agente arilante (V).

Se pueden utilizar análogos de los compuestos empleados en los procedimientos que incluyen un sustituyente que corresponde a R_9 como se ha definido para los compuestos de la fórmula (I).

Como se usan aquí, los términos “tratamiento”, “profilaxis” o “prevención”, “mejoría” y similares se deben considerar en su contexto más amplio. En particular, el término “tratamiento” no implica necesariamente que un animal sea

tratado hasta recuperación total. Por consiguiente, “tratamiento” incluye la mejoría de los síntomas o la gravedad de una condición patológica particular o la prevención o reducción de otra manera del riesgo de desarrollar una condición patológica particular.

La cantidad de uno o más compuestos de la fórmula (I) que se necesita en un tratamiento terapéutico según la invención dependerá de una serie de factores, que incluyen la aplicación específica, la naturaleza del compuesto particular usado, la enfermedad a tratar, el modo de administración y la condición del paciente.

Los compuestos de la fórmula (I) se pueden administrar de una manera y en una cantidad como se practica convencionalmente. Véase, por ejemplo, Goodman and Gilman, “The pharmacological basis of therapeutics”, 7th Edition, (1985). La dosis específica utilizada dependerá de la enfermedad a tratar, del estado del sujeto, de la vía de administración y de otros factores bien conocidos como se han indicado antes. En general, una dosis diaria por paciente puede estar en el intervalo de 0,1 mg a 5 g; típicamente de 0,5 mg a 1 g; preferiblemente de 50 mg a 200 mg. La dosificación puede variar desde una dosis única dada una vez al día o cada dos días, a dosis dadas dos o tres veces al día a lo largo de una semana a muchos meses hasta muchos años según necesidades, dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar o aliviar.

Se deberá entender además que para un sujeto particular, se deben ajustar los regímenes posológicos específicos a lo largo del tiempo según necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Se pueden usar tratamientos relativamente a corto plazo con los compuestos activos para producir la estabilización o reducción o remisión de los cánceres. Se pueden emplear tratamientos a largo plazo para prevenir el desarrollo de cánceres en pacientes de alto riesgo.

La producción de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las indicaciones terapéuticas descritas en esta memoria se prepara típicamente por mezcla de los compuestos de la invención (por conveniencia de aquí en adelante denominados los “compuestos activos”) con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables bien conocidos en la técnica.

Naturalmente, el vehículo debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. El vehículo o excipiente puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el compuesto como una dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener hasta 100 % en peso del compuesto activo, preferiblemente de 0,5 % a 59 % en peso del compuesto activo.

Se pueden incorporar uno o más compuestos activos en las formulaciones de la invención, que se pueden preparar por cualquiera de las técnicas bien conocidas de farmacia que consisten esencialmente en mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más ingredientes auxiliares. La concentración preferida de compuesto activo en la composición del fármaco dependerá de las velocidades de absorción, distribución, inactivación, y excreción del fármaco así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

La formulaciones de la invención incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, ocular, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, o intravenosa), administración transdérmica incluyendo administración mucosal por vía nasal, bucal, vaginal o rectal, y como inhalantes, aunque la vía más adecuada dado el caso dependerá de la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar y de la naturaleza del particular compuesto activo que se utilice.

La formulación adecuada para administración oral se puede presentar en unidades discretas, tales como cápsulas, sobres, comprimidos para chupar, o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión aceite-en-agua o agua-en-aceite. Dichas formulaciones se pueden preparar por cualquier método apropiado de farmacia que incluye la etapa de poner en asociación el compuesto activo y un vehículo adecuado (que puede contener uno o más ingredientes auxiliares como se ha indicado antes).

En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando uniformemente e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si fuera necesario, dándole forma a la mezcla resultante de tal modo que se obtenga una dosis unitaria. Por ejemplo, un comprimido se puede preparar comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen el compuesto activo, opcionalmente con uno o más de otros ingredientes.

Los comprimidos por compresión se pueden preparar comprimiendo, en una máquina adecuada, el compuesto en forma fluida, tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, y/o agente o agentes tensioactivos/dispersantes. Los comprimidos moldeados se pueden preparar por moldeo, en una máquina adecuada, del compuesto humedecido con un aglutinante líquido inerte.

Las formulaciones adecuadas para administración bucal (sublingual) incluyen comprimidos para chupar que comprenden el compuesto activo en una base aromatizada, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; y pastillas que comprenden el compuesto en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga.

Las formulaciones adecuadas para administración ocular incluyen líquidos, geles y cremas que comprenden el compuesto activo en un vehículo o diluyente ocularmente aceptable.

Las composiciones de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente preparaciones acuosas estériles de los compuestos activos, cuyas preparaciones son preferiblemente isotónicas con la sangre del futuro receptor. Estas preparaciones se administran preferiblemente intravenosamente, aunque también se puede efectuar la administración por medios de inyección subcutánea, intramuscular, o intradérmica. Tales preparaciones se pueden preparar convenientemente mezclando el compuesto con agua o con un tampón de glicina y haciendo la solución resultante estéril e isótonica con la sangre. Las formulaciones inyectables según la invención generalmente contienen de 0,1 % a 60 % p/v de compuesto activo y se pueden administrar a una velocidad de 0,1 ml/minuto/kg.

Las formulaciones para perfusión, por ejemplo, se pueden preparar empleando solución salina como vehículo y un agente solubilizante tal como una ciclodextrina o derivado de la misma. Las ciclodextrinas incluyen α-ciclodextrina, β-ciclodextrina, γ-ciclodextrina, dimetil-β-ciclodextrina, 2-hidroxietil-β-ciclodextrina, 2-hidroxipropil-ciclodextrina, 3-hidroxipropil-β-ciclodextrina y tri-metil-β-ciclodextrina. Más preferiblemente la ciclodextrina es hidroxipropil-β-ciclodextrina. Los derivados adecuados de ciclodextrinas incluyen Captisol® un derivado sulfobutil-éter de ciclodextrina y sus análogos como se describen en el documento US 5.134.127.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios en dosis unitarias. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se presentan preferiblemente como pesarios en dosis unitarias. Estos se pueden preparar mezclando el compuesto activo con uno o más vehículos sólidos convencionales, por ejemplo, manteca de cacao, y dando forma después a la mezcla resultante.

Las formulaciones o composiciones adecuadas para administración tópica a la piel preferiblemente toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol, o aceite. Los vehículos que se pueden usar incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, y combinación de dos o más de ellos. El compuesto activo generalmente está presente a una concentración de 0,1 % a 5 % p/p, más particularmente de 0,5 % a 2 % p/p. Los ejemplos de tales composiciones incluyen cremas cosméticas para la piel.

Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Dichos parches contienen adecuadamente el compuesto activo como una solución acuosa opcionalmente tamponada, , por ejemplo, de concentración 0,1 M a 0,2 M con respecto a dicho compuesto activo. Véase por ejemplo Brown, L., et al. (1998).

Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica se pueden administrar también por iontoforesis (véase, por ejemplo, Panchagnula R, et al., 2000) y típicamente toman la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada del compuesto activo. Las formulaciones adecuadas comprenden tampón de citrato o tampón Bis/Tris (pH 6) o etanol/agua y contienen una concentración 0,1 M a 0,2 M de ingrediente activo.

Las formulaciones adecuadas para inhalación se pueden administrar como una composición de pulverización en la forma de una solución, suspensión o emulsión. La composición de pulverización para inhalación puede comprender además un propelente farmacéuticamente aceptable tal como dióxido de carbono u óxido nitroso o un fluorocarbono que contiene hidrógeno tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano, 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano o sus mezclas.

Los compuestos activos se pueden proporcionar en la forma de productos alimenticios, de modo que sean añadidos, mezclados, recubiertos, combinados o añadidos de otra manera a un producto alimenticio. El término producto alimenticio se utiliza en su sentido más amplio posible e incluye formulaciones líquidas tales como bebidas incluyendo productos lácteos y otros alimentos, tales como barras energéticas, postres, etc. Las formulaciones de alimentos que contienen los compuestos de la invención se pueden preparar fácilmente según prácticas convencionales.

Los métodos terapéuticos, usos y composiciones pueden ser para administración a seres humanos o a animales, incluyendo mamíferos tales como animales de compañía y domésticos (tales como perros y gatos) y animales de cría (tales como ganado, ovejas, cerdos y cabras), aves (tales como pollos, pavos, patos), animales marinos incluyendo los de piscifactorías (tales como pescado, crustáceos y moluscos) y similares.

El compuesto activo o los derivados profármacos o sales del mismo farmacéuticamente aceptables se pueden co-administrar también con otros materiales activos que no afecten a la acción deseada, o con materiales que suplementen la acción deseada, tales como compuestos antibióticos, antifúngicos, antiinflamatorios, o antivirales. El

agente activo puede comprender dos o más isoflavonas o derivados de las mismas en combinación o mezcla sinérgica. Los compuestos activos se pueden administrar también con agentes reductores de lípidos tales como probucol y ácido nicotínico; inhibidores de la agregación de plaquetas tales como aspirina; agentes antitrombóticos tales como coumadina; bloqueantes de los canales de calcio tales como verapamilo, diltiazem, y nifedipino; inhibidores de la enzima conversora de angiotensina (ACE) tales como captopril y enalapril, y β-bloqueantes tales como propanolol, terbutalol, y labetalol. Los compuestos se pueden administrar también en combinación con antiinflamatorios no esteroideos tales como ibuprofeno, indometacina, aspirina, fenoprofeno, ácido mefenámico, ácido flufenámico y sulindac. Los compuestos se pueden administrar también con corticosteroides o con un anti-emético tal como zofran®.

Los compuestos de la fórmula (I) parece que son particularmente adecuados para co-administración con uno o más fármacos anti-cáncer tales como cisplatino, deshidroequol (DHE), taxol (paclitaxel), gemcitabina, doxorubicina, topotecán y/o camptotecina, especialmente cisplatino, deshidroequol (DHE), taxol. Esto puede producir mejores efectos en el tratamiento, por ejemplo en la forma de efectos sinérgicos, en comparación a cuando se emplea solamente uno de los medicamentos. Particularmente los compuestos de la invención presentemente reivindicada, especialmente el HMC (esto es, el compuesto 1) parece que son quimiosensibilizantes y aumentan la citotoxicidad de los uno o más fármacos anticáncer co-administrados con ellos. Esto parece que ocurre aunque los fármacos anticáncer actúan a través de una variedad de diferentes mecanismos, por ejemplo se cree que el cisplatino actúa interactuando con el DNA nuclear, se cree que el taxol actúa bloqueando las células en la fase G2/M del ciclo celular y evita que formen un aparato mitótico normal, se cree que la gemcitabina actúa incorporándose en el DNA de la célula, evitando a la larga la mitosis, se cree que la doxorubicina es un inhibidor de la topoisomerasa II con lo que evita la replicación y transcripción del DNA y se cree que el topotecán es un inhibidor de la topoisomerasa I.

De forma interesante, en algunas situaciones este aumento de la citotoxicidad para las células cancerosas no está asociado con un correspondiente aumento de la toxicidad para las células no cancerosas.

Aunque esta observación tiene importantes implicaciones para el tratamiento de muchos cánceres, es especialmente importante para el tratamiento de cánceres tales como el melanoma, que son extremadamente difíciles de tratar.

La co-administración puede ser simultánea o secuencial. La administración simultánea se puede efectuar para los compuestos que están en la misma dosis unitaria, o en dosis unitarias individuales y discretas administradas al mismo tiempo o tiempo similar. La administración secuencial se puede hacer en cualquier orden según necesidades y típicamente requerirá que esté en curso un efecto fisiológico del primer agente activo o agente activo inicial cuando se administre el segundo o último agente activo, especialmente cuando se desea un efecto acumulativo o sinérgico.

La invención se extiende también a un paquete que comprende la terapia de combinación.

Los compuestos para uso en los métodos sintéticos preferidos de la presente invención se pueden derivar de muchas fuentes fácilmente identificables por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la daidzeina está fácilmente disponible o se puede sintetizar por métodos estándar conocidos en la técnica. Se pueden encontrar métodos adecuados, por ejemplo, en las solicitudes publicadas de patentes internacionales WO 98/08503 y WO 00/49009, y en las referencias citadas en ellas.

Los compuestos de las fórmulas generales (II), (III) y (IV) descritos antes, son intermedios en la producción de los compuestos de isoflavano activos de la fórmula (I). Estos intermedios representan también aspectos adicionales de la presente invención.

Aunque sin querer restringirse con consideraciones teóricas los compuestos de la presente invención se cree que regulan una amplia variedad de procesos de transducción de señales dentro de las células animales y que estos procesos de transducción de señales están implicados en un amplio intervalo de funciones que son vitales para la supervivencia y función de todas las células animales. Por lo tanto, estos compuestos tienen amplios e importantes beneficios en los animales incluyendo los seres humanos, y en particular tienen el potencial para evitar y tratar enfermedades, trastornos y funciones humanas importantes y comunes, lo que representa un beneficio sustancial inesperado.

Por lo tanto parece que los compuestos de la presente invención tienen actividad como inhibidores de TNFα. Se plantea como hipótesis que el TNFα es parte de una red de citocinas estrechamente regulada, que activa múltiples rutas de transducción de señales y que induce o suprime una amplia variedad de genes. El TNFα puede proporcionar una señal de supervivencia para las células cancerosas y por lo tanto se ha considerado como un factor favorecedor del tumor. Como un mediador central de inflamación, el TNFα proporciona un enlace molecular entre los estímulos inflamatorios crónicos y el subsiguiente desarrollo de la enfermedad tumoral maligna. Consecuentemente su inhibición por los compuestos de la invención puede proporcionar un mecanismo por el cual éstos ejercen una actividad anti-cáncer y/o anti-inflamatoria. Alternativamente, estos compuestos se pueden usar como agentes quimiopreventivos.

Los beneficios particulares de esta invención se basan en (a) la gran variedad de procesos de transducción de señales a los que se dirigen los compuestos, (b) el hecho de que la regulación de estos diferentes procesos incluye tanto la regulación por incremento de algunos procesos como la regulación por reducción de otros, y (c) que este efecto amplio y variado sobre los procesos de transducción de señales va acompañado también por un efecto independiente sobre una variedad de importantes enzimas que son fundamentales para el metabolismo y la esteroidogénesis.

Los compuestos de isoflavano de la presente invención presentan buenos perfiles de toxicidad *in vitro* frente a las células normales. Los isoflavanos tienen amplia actividad, marcadamente mejor o al menos comparable con el deshidroequol. Los isoflavanos son muy activos frente a células cancerosas representativas de leucemia, glioma, cáncer de próstata, de ovario, de mama y de pulmón. Los compuestos isoflavanos presentan potente actividad frente a las líneas celulares de melanoma y colangiocarcinoma (cáncer de vesícula). Se ha observado una buena actividad frente a las células del cáncer colorrectal.

La radio-sensibilización *in vivo* se puede analizar por ejemplo empleando tumores A431 de carcinoma vulval epidermoide humano establecidos en el muslo y sometidos a varias dosis de radiación local (solamente a la pierna con el tumor). Un tratamiento de radiación con un régimen de 2,5 Gy/día durante 4 días retrasará el crecimiento del tumor, y el efecto de la dosis de radiación en combinación con el compuesto de ensayo se podría evaluar haciendo seguimiento del retraso de crecimiento del tumor. Se puede esperar un retraso de crecimiento del tumor de ~6 días utilizando solamente radiación. Se puede determinar por separado el retraso de crecimiento del tumor utilizando el compuesto de ensayo administrado oralmente. La evidencia de la radio-sensibilización mediada por el compuesto de ensayo de los tumores A431 se determina entonces midiendo el retraso de crecimiento del tumor utilizando animales pre-tratados con un régimen del compuesto de ensayo administrado oralmente seguido por el régimen convencional de terapia de radiación descrito antes. Un retraso medio del crecimiento de hasta 30 días utilizando el tratamiento de combinación en comparación con hasta 10 días utilizando regímenes de radiación o de monoterapia con el compuesto de ensayo es una evidencia de las propiedades de radio-sensibilización de los compuestos de la invención.

La radio-sensibilización se puede analizar *in vitro*, por ejemplo, empleando ensayos clonogénicos utilizando líneas celulares A431 de carcinoma de vulva epidermoide humano para medir la respuesta a la radiación sola o en combinación con los compuestos de ensayo. Se puede usar una dosis de fármaco que causa una toxicidad de 10 % a las células en combinación con dosis graduadas de radiación. La dosis apropiada de compuesto se debe determinar por ensayo clonogénico. La evidencia de radio-sensibilización mediada por el compuesto de ensayo se demuestra, por ejemplo, por una toxicidad >20 % para las células utilizando terapia de quimiorradiación en comparación con una toxicidad de 10 % utilizando los correspondientes regímenes de monoterapia.

Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento, prevención o mejoría de enfermedades asociadas con la supervivencia aberrante de las células, la proliferación aberrante de las células, la migración celular anormal, angiogénesis anormal, equilibrio anormal de estrógenos/andrógenos, génesis de esteroides disfuncional o anormal, degeneración incluyendo cambios degenerativos dentro de las paredes de los vasos sanguíneos, inflamación, y desequilibrio inmunológico.

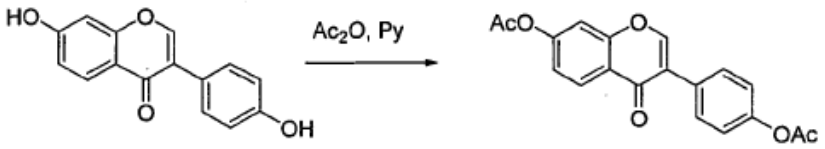
La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos no limitantes y los dibujos que les acompañan.

Ejemplos

En los ejemplos y dibujos que les acompañan que siguen, la abreviatura “DHE” se utiliza para deshidroequol, “HMC” se utiliza para el compuesto Nº 1, que es 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)-croman-7-ol y “HHC” se utiliza para el compuesto Nº 11, que es 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-croman-7-ol.

1.0. Síntesis

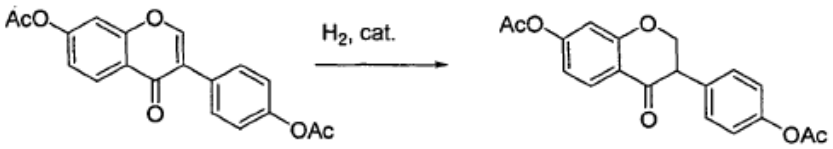
Ejemplo 1 4′,7-Diacetoxidaidzeina



Se calentó una mezcla de daidzeina (2,0 g), anhídrido acético (10 ml) y piridina (2 ml) a 105-110 ºC durante 1 h. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se agitó durante 30 minutos más, durante cuyo tiempo

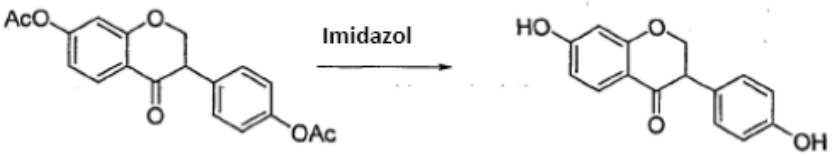
cristalizó el diacetato de la solución. Se filtró el producto, se lavó a fondo con agua y se recristalizó en metanol para dar 4′,7-diacetoxidaidzeina como prismas incoloros (2,4 g, 90 %).

Ejemplo 2 7-Acetoxi-3-(4-acetoxifenil)croman-4-ona



Se añadió paladio sobre carbón vegetal (5 %, 0,02 g) a una solución de 4′,7-diacetoxidaidzeina (0,50 g, 1,5 mmol) en acetato de etilo (80 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 72 h. Se separó el catalizador por filtración a través de Celita y el filtrado resultante se evaporó a vacío. Se recristalizó el residuo en etanol para dar 7-acetoxi-3-(4-acetoxifenil)croman-4-ona (0,40 g, 80 %) como placas incoloras.

Ejemplo 3 7-Hidroxi-3-(4-hidroxifenil)croman-4-ona

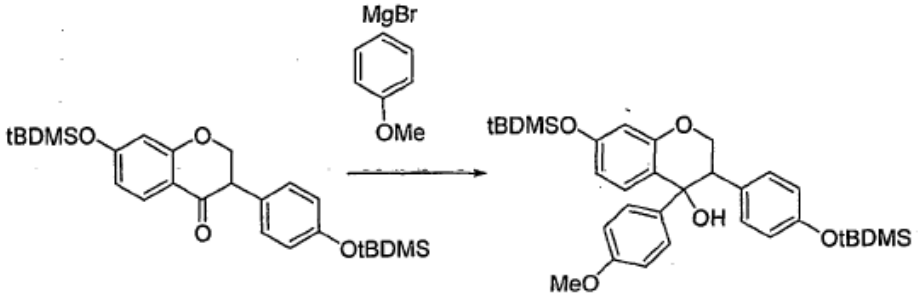


Se añadió imidazol (0,63 g) a una suspensión de 4′,7-diacetoxidihidrodaidzeina (0,26 g, 0,08 mmol) en etanol absoluto (5,0 ml) y se mantuvo la mezcla a reflujo durante 45 min bajo argón. Se concentró la solución a presión reducida y se añadió agua destilada (10 ml) al residuo. Se dejó la mezcla durante la noche bajo refrigeración y se filtró el precipitado resultante. Se recristalizó el producto crudo en acetato de etilo/diclorometano para dar 7-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)croman-4-ona (0,14 g, 71 %) como un polvo blanco.

Ejemplo 4 7-(*terc*-Butildimetilsililoxi)-3-(4-(*terc*-butildimetilsililoxi)fenil)croman-4-ona

Se reunieron 42 g de 7-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)croman-4-ona, 130 g de imidazol, 127 g de cloruro de *terc*-butildimetilsililo, y N,N-dimetilformamida (500 ml) en un matraz de fondo redondo de 2 L y se agitaron bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas. Se sofocó la reacción con la adición de H_2O fría (200 ml) con la mezcla de reacción enfriada en un baño de hielo. El sólido blanco resultante se filtró y se lavó con agua. Por recristalización en etanol se obtuvo el producto como cristales blancos esponjosos (35,7 g).

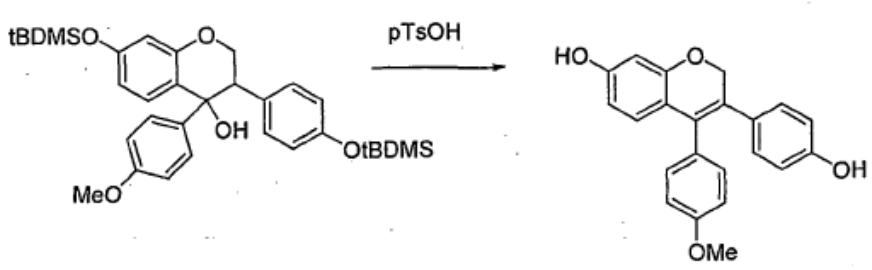
Ejemplo 5 7-(*terc*-Butildimetilsililoxi)-3-(4-(*terc*-butildimetilsililoxi)fenil)-4-(4-metoxifenil)croman-4-ol



Se pesaron 25 g de 7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3-(4-(*terc*-butildimetilsililoxi)fenil)4-(4-metoxifenil)croman-4-ol en un matraz de fondo redondo de dos bocas y se pasó por él una corriente de nitrógeno. Se añadieron 80 ml de THF anhidro al vaso de reacción para dar una solución límpida ligeramente amarilla. Se adaptó un condensador y se puso el vaso de reacción en un baño de hielo. Se añadieron 225 ml de bromuro de 4-metoxifenilmagnesio comercial (solución 0,5 M en THF) a la mezcla de reacción gota a gota durante 10 minutos. Se sofocó la reacción por la adición gota a gota de éter húmedo (50:50 H_2O:éter dietílico) bajo nitrógeno, formándose un precipitado blanco al añadir cantidades crecientes de H_2O. Se añadió una cantidad adicional de H_2O a la mezcla de reacción antes de extracción con éter dietílico.

Se reunieron las capas orgánicas y se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se separó el disolvente en un rotavapor para dar un aceite límpido amarillo que solidificó durante la noche para dar un sólido casi blanco. El producto crudo se usó en la siguiente etapa sin purificación.

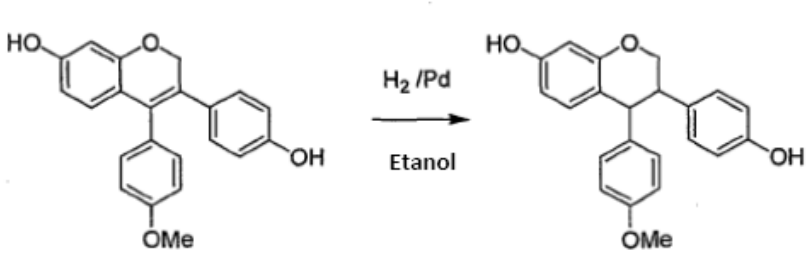
Ejemplo 6 3-(4-Hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)2H-cromen-7-ol



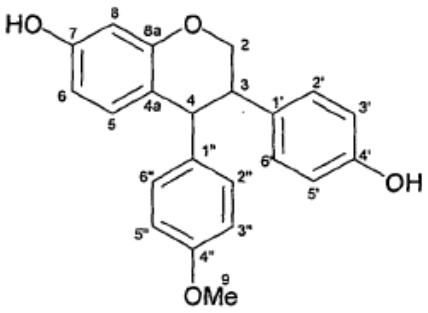
Se reunieron 7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3-(4-(*terc*-butildimetilsililoxi)fenil)-4-(4-metoxifenil)croman-4-ol (42 g), pTsOH (435 g), perlas de ebullición y 2,5 L de etanol en un matraz de fondo redondo de 5 L de dos bocas con condensador acoplado. Se calentó la reacción a reflujo durante 3 horas. Se concentró el disolvente a vacío hasta ~100 ml antes de verterlo sobre agua fría en agitación (700 ml). Se extrajo entonces la mezcla con acetato de etilo, las capas orgánicas reunidas se lavaron con agua (3 × 2 L), salmuera (1 × 500 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtraron y se separó el disolvente a vacío para dar un aceite pardo rojizo. Se disolvió el aceite en metanol (~100 ml) y se puso en el congelador durante la noche.

Durante la noche se formó un precipitado blanco, que se separó por filtración y se lavó con metanol. Se concentró el filtrado a vacío para dar un aceite pardo.

Ejemplo 7 3-(4-Hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol



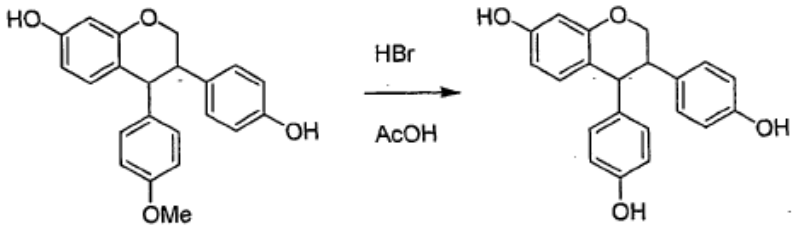
Se reunieron 25,5 g de 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)-2H-cromen-7-ol (70 mmoles), 3,95 g de Pd al 10 %/Al_2O_3 y 200 ml de etanol en un matraz de fondo redondo de 500 ml de dos bocas. Se hidrogenó la reacción a baja presión utilizando condiciones estándar durante 3 horas. Se filtró la reacción a través de Celita para separar el catalizador y se lavó a fondo con etanol (300 ml). Se concentró el filtrado hasta ~50 ml antes de que fuera vertido sobre agua fría en agitación (1,4 L). Se formó un precipitado de color anaranjado pálido que después formó un aceite pardo. Se extrajo entonces la mezcla con éter dietílico, las capas orgánicas reunidas se lavaron con agua (3 × 1 L), salmuera (1 × 500 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtraron. Se separó el disolvente a vacío para dar un aceite pardo rojizo. Se recristalizó el producto en éter dietílico (~100 ml), para dar un sólido pardo que se lavó con éter dietílico frío para dar cristales casi blancos, 11,3 g. El espectro ^1H NMR y el esquema de numeración se muestran a continuación.



H	δ ppm	Forma del pico	J Hz	Integrados	Comentarios
C2 ecuatorial	4,14	Dd	10,98	1	
C2 axial	4,35	Dd		1	Dd es solapamiento
C3	3,47	Ddd		1	
C4	4,20	Dd	5,12	1	
C5	6,71	D	8,05	1	
C6	6,36	Dd	2,56, 8,42	1	
C8	6,41	D	2,20	1	
C9	3,71	S	—	3	
C2′,C6′	6,61	D	—	2	Dobletes de solapamiento para C2′,C3′,C2″,C3″ La integración total es 8
C3′,C5′	6,61	D	—	2	
C2″,C6″	6,61	D	—	2	
C3″,C5″	6,61	D	—	2	

En los métodos generales anteriores, las estructuras pueden estar opcionalmente sustituidas o protegidas con sustituyentes apropiados, o sintones o derivados de los mismos. Los compuestos pueden estar presentes, por ejemplo, como sus sales, acetatos, o derivados de bencilo o sililoxi como pueden determinar los expertos en la química sintética, Los grupos hidroxi se pueden alquilar fácilmente (MeI/base), acilar (AC2O/Py) o sililar (Cl-SiR3/base) y asimismo se pueden desproteger por métodos estándar conocidos en la técnica.

Ejemplo 8 3-(4-Hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-croman-7-ol



Se transfirió 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol (3,17 g) a un matraz de fondo redondo y se purgó el matraz con nitrógeno. Se añadió gota a gota al matraz bromuro de hidrógeno al 33 % en peso en ácido acético (13 ml) y se calentaron los contenidos a reflujo a 130 ºC durante 7 horas. Se puso la mezcla de reacción en un baño de hielo y se ajustó a pH 6 utilizando solución de hidróxido de sodio (al 40 % p/v). Se extrajo la mezcla con acetato de etilo y la capa de acetato de etilo se lavó además con agua y salmuera antes de secar sobre sulfato de magnesio. Se filtró la mezcla y se separó el disolvente a vacío para dar un sólido pardo (2,89 g). Se disolvió el sólido en el mínimo de acetato de etilo y se purificó por cromatografía en columna (Silica 60 H, 200-400 mallas utilizando acetato de etilo:cloroformo (40:60) como eluyente). Se obtuvo 3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)croman-7-ol con ~80 % de pureza y se purificó después por cromatografía de líquidos semi-preparativa de alta resolución (HPLC). El espectro ^{1}H NMR se muestra en la Fig. 12.

2.0. Materiales y métodos

2.1. Cultivo de tejidos

Se cultivó rutinariamente la línea de células de cáncer pancreático humano HPAC (CRL-2119) en una mezcla 1:1 de DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma) más medio F12 de Ham (Sigma) que contiene HEPES (15 mM), insulina (0,002 mg/ml), transferrina (0,005 mg/ml), hidrocortisona, (40 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico

(10 ng/ml). Las líneas de células CP70 de cáncer de ovario, se obtuvieron como un presente del Dr. Gilo Mor (Yale University) y se cultivaron en una mezcla 1:1 de DMEM más medio F12 de Ham, y la línea SKOV-3 (línea de células de cáncer de ovario) se compró de ATCC y se cultivó en medio 5a de McCoys. La línea de células MDA-MB-468 de cáncer de mama se cultivó en medio L-15 de Leibovitz. La línea de células MM200 de melanoma se obtuvo como un presente de Peter Hersey (University of Newcastle) y A2058 se obtuvo como un presente de Dr Peter Parsons (QIMR). Ambas se cultivaron en medio DMEM.

Todos los cultivos fueron suplementados con 10 % de FCS (suero fetal de ternera CSL, Australia), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y bicarbonato de sodio (1,2 g/L), y se cultivaron a 37 ºC en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2. Todas las líneas celulares se compraron de ATCC (Maryland, USA) excepto cuando se indica otra cosa.

La línea de células normales NFF (fibroblastos de prepucio neonatal) fue un presente del Dr. Peter Parsons (Queensland Institute of Medical Research). Las células RK (riñón de conejo) se obtuvieron de Miller Whalley (Macquarie University). Ambas líneas celulares se cultivaron en RPMI suplementado con 10 % de FCS (CSL, Australia), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 mM) y bicarbonato de sodio (1,2 g/L), y se cultivaron a 37 ºC en una atmósfera humidificada, con 5 % de CO_2.

2.2. Ensayos de proliferación

Se determinaron los valores IC50 para cada línea celular. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de células apropiada determinada por el análisis cinético de crecimiento y se cultivaron durante 5 días en ausencia y en presencia de los compuestos de ensayo. Se evaluó la proliferación celular después de 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 3-4 horas a 37 ºC según las instrucciones del fabricante. Se calcularon los valores IC50 a partir de gráficos semi-logarítmicos con el % de proliferación control en el eje y frente al log de la dosis en el eje x.

2.3. Farmacocinética de DHE y HMC - Oral

Se prepararon HMC y DHE como suspensiones homogéneas en CMC al 1 % (m:v, agua). Se administraron ambas formulaciones oralmente por sonda a ratones hembras BALB/c a una dosis de 50 mg/kg. Se asignaron tres animales a cada punto de tiempo (15 min, 30 min, 1 h, 4 h y 24 h). En cada punto de tiempo respectivo, se sacrificaron los animales mediante luxación cervical y se recogió la sangre. Se analizó el HMC libre por espectroscopía de masas.

2.4. Farmacocinética de HMC - i.v. e i.p.

Se preparó HMC como una solución en hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20 % (m:v, agua). Se administró la formulación oralmente por sonda o por inyección i.p. a ratones hembras BALB/c a una dosis de 50 mg/kg. Se asignaron tres animales a cada punto de tiempo (15 min, 30 min, 1 h, 4 h y 24 h). En cada punto de tiempo respectivo, se sacrificaron los animales mediante luxación cervical y se recogió la sangre. Se recogió también la orina y se analizó para HMC. Se analizó el HMC libre por espectroscopía de masas.

2.5 Estudio piloto de eficacia *in vivo* – ratones con tumor HPAC

Se tripsinaron frascos subconfluentes (80 %) de células HPAC, se lavaron con solución salina equilibrada de Hanks (Sigma), se resuspendieron en medio mínimo esencial de Dubellco (Sigma) y un volumen igual de matrigel™ (Becton Dickson) a una densidad de $3,7 \times 10^7$ células por ml. Se inocularon ratones atímicos nu/nu BALB/c subcutáneamente con $3,7 \times 10^6$ células HPAC bi-lateralmente a la mitad de la superficie dorsal. Para los grupos de HMC (n=3 por régimen posológico) y los grupos control (n=2), el tratamiento comenzó cinco días después de la inoculación para permitir la formación del tumor. El HMC se formuló en HPBCD al 20 % y se administró i.p. diariamente durante 15 días. El grupo control recibió dosis equivalentes (peso:peso) i.p. de HPBCD al 20 %. Las medidas del tumor empezaron el día 5 después de la inoculación (10×10 mm^2) y se midieron en 2 dimensiones, longitud (a) y anchura (b), utilizando calibres. Se calculó el peso del tumor (W) por la fórmula W=ab2/2, donde a, es la más larga de las 2 medidas (Odwyer et al., 1994). Se analizaron las curvas de proliferación del tumor con respecto a la máxima inhibición del tumor (tratado/control, T/C). En el sacrificio, tejidos de hígado, riñón, fémur, estómago se fijaron en formalina tamponada, se incluyeron en parafina, se cortaron secciones y se tiñeron con H&E. Las secciones teñidas se sometieron después a Rothwell consulting para análisis histopatológico. Se realizó el análisis bioquímico del suero sobre las sangres tomadas de los grupos de control, de control con vehículo y de tratamiento con HMC. El análisis de suero fue realizado por Veterinary Clinical pathology (U. Syd).

2.6 Análisis de sinergia en modelo tres-D

El análisis en modelo 3-D de la interacción citotóxica entre el fármaco A y el fármaco B hace posible la representación del efecto inhibidor previsto de dos fármacos en combinación en 3 dimensiones para revelar las regiones reales de sinergia o de antagonismo. Las representaciones gráficas de sinergia en 3D se basan en una

teoría de “Aditividad teórica” (TA) como se describe por Kanzawa et al (Int. J. Cancer 71, 311-319 (1997)). La aditividad teórica se calculó a partir de las citotoxicidades del fármaco A y del fármaco B como monoterapias utilizando la siguiente fórmula que asume que los fármacos son inhibidores mutuamente exclusivos:

$$TA_{(I)} = \frac{(f_a)_A + (f_a)_B - 2(f_a)_A(f_a)_B}{1 - (f_a)_A(f_a)_B}$$

Donde: (fa)A=fracción de células afectadas por el fármaco A
(fa)B=fracción de células afectadas por el fármaco B

La TA se calcula para cada combinación de concentraciones de fármacos y se resta del efecto experimental observado para cada combinación para dar una medida de la acción sinérgica. Una diferencia positiva indica que se afectan más células por la combinación de fármacos que las que se podría esperar en teoría si los dos fármacos se administraran juntos – por lo tanto sinergismo. Una diferencia negativa indica que se afectan menos células que las esperadas en teoría – por lo tanto antagonismo.

3.0. Resultados

3.1. Toxicidad para las células normales

El deshidroequol (DHE) fue menos tóxico tanto para las células NFF como para las células de riñón de conejo con valores de IC50 por encima de 150 µM en comparación con el HMC (86 y 61 µM respectivamente) (Tabla 1 y Figura 1). En un estudio separado, se encontró que el HHC no era tóxico ni para las células NFF ni para las células de riñón de conejo (véase de nuevo la Tabla 1). Cuando se compara con el cisplatino, un agente quimioterapéutico de referencia, el grado de toxicidad presentado por HMC y HHC es suave

Tabla 1. Toxicidad relativa de DHE, HMC, HHC y cisplatino frente a fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) y células de riñón de conejo

Tipo de célula/tejido	Designación	Análogo (IC50 µM)			Antineoplásico (IC50 µM)
		DHE	HMC	HHC	Cisplatino
Fibroblasto	Fibroblastos de prepucio neonatal (NFF humano)	>150	86,12 ± 7,6	60,8	9,85 ± 5
Riñón	Riñón de conejo	>150	61 ± 4,3	>150	No analizado

3.2. Eficacia *in vitro* frente a células cancerosas

Cuando se comparó con los valores IC50 de DHE, el HMC demostró una actividad marcadamente superior (~5-10 veces más grande) frente a la línea de células de cáncer de ovario p53 mt resistente a multi-fármacos (SKOV-3), la línea de células de cáncer de próstata p53 Mt (PC3) AR negativa, las líneas de células de cáncer de mama tanto ER positivas (p53 wt) como negativas (p53 mt) (MCF-7 y MDA-MB-468 respectivamente), Glioma p53 Mt (HTB-138), cáncer pancreático p53 Mt (HPAC) y cáncer de pulmón de células grandes p53 Mt (Tabla 2). El HMC presentó una actividad anti-cáncer comparable a la de DHE frente a todas las otras líneas celulares ensayadas (Tabla 1). Se observó una particular eficacia de HMC frente a las células de melanoma, (Tabla 2.1 y Fig. 2). Esto representa una ventaja sustancial sobre la técnica anterior.

El HMC fue diferencialmente activo frente a 2 líneas celulares colorrectales separadas, con marcada actividad observada frente a células HT-29 y algo menos de actividad frente a HCT-15. Se observa que HT-29 y HCT-15 son COX-2 positivas y deficientes respectivamente. Cuando se examinaron microscópicamente y se compararon a las células tratadas con vehículo sólo, las células SKOV-3 tratadas con HMC presentaron cambios morfológicos concordantes con las células que sufren apoptosis (alargamiento celular, aspecto granular del citosol y globulización de la membrana plasmática). En contraste, las células SKOV-3 expuestas a deshidroequol 100 µM, después de 18 h retenían una morfología relativamente normal, comparable con la de las células tratadas solamente con vehículo.

Tabla 2.1. Comparación de la citoxicidad de deshidroequol y HMC frente a líneas celulares representativas de diferentes tumores malignos

Indicación	Designación	Análogo (IC50 uM)		Antineoplásico (IC50 uM)
		DHE	HMC	Cisplatino

Indicación	Designación	Análogo (IC50 uM)		Antineoplásico (IC50 uM)
		DHE	HMC	Cisplatino
Ovario	A2780	1,7 ± 0,61	1,58 ± 0,59	2,10
	CP70	1,69 ± 0,62	1,21 ± 0,29	10,30
	SKOV-3	21,83 ± 4,65	2,26	5,40
Próstata	PC3	9,09 ± 8,12	2,9 ± 0,92	2,11
	LNCaP	4,8 ± 3,8	4,52	>10
	DU145	5,95 ± 1,5	3,78	2,07
Mama	MCF-7	21,5 ± 13,2	7,15 ± 7	3,69
	MDA-MB-468	7,9 ± 3,5	1,1 ± 0,35	0,58
Glioma	HTB-138	7,35 ± 0,89	1,9 ± 0,27	42,30
Pancreático	CRL-2119	56,62 ± 16,8	14,1 ± 1,16	9,36
Leucémico	RPMI-8226	3,72 ± 0,08	NT	NT
	CCRF-CEM	1,7 ± 0,68	1,90	NT
Pulmón	NCI-H23	8,75 ± 7,2	3,75 ± 2,5	NT
	NCI-H460	10,6 ± 3,8	2,23 ± 0,15	22,29
Colorrectal	HT-29	50,45 ± 21,9	3,7 ± 1,4	22,7 ± 35
	HCT-15	24,4 ± 12,57	37,8 ± 33	129,9 ± 39
Melanoma	MM200	2,90	0,7 ± ,03	8,3 ± 0,7
	A2058	NT	1,2 ± 0,65	5,73 ± 2,3
	IGR-3	NT	0,53 ± 0,02	NT

En otros estudios, se determinó la citotoxicidad de diferentes compuestos descritos aquí frente a diferentes líneas celulares. El compuesto 14-eno es el precursor cromeno 3-eno para el cromano correspondientemente reducido, el compuesto 14, esto es 3-(4-hidroxifenil)-4-(3-aminofenil)-croman-7-ol. Se observó que los compuestos 1, 2 y 11 presentan la mejor eficacia frente a la mayor parte de todas las líneas celulares cancerosas. El compuesto 14 presenta una eficacia ligeramente mejor en general comparada con su correspondiente 14-eno y con el compuesto 6 (Tabla 2.2), esto es 3-(4-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-7-metoxicromano.

Tabla 2.2. Citotoxicidad de los compuestos cromano 1, 2, 6, 11 y 14 y del compuesto crom-3-eno 14-eno frente a líneas celulares representativas de diferentes tumores malignos

Indicación	Línea celular	Compuesto (IC50 uM)					
		HMC 1	2	6	HHC 11	14-eno	14
Ovario	CP70	2,1	3 ± 1,2	>100	1,1 ± 0,9	>100	>100
Próstata	PC3	2,5 ± 1	4,2 ± 0,02	116 ± 57	0,88 ± 0,4	46,2 ± 7	32,5 ± 2,1
Mama	MDA-MB-468	2,8 ± 4,2	1,9	28,7 ± 3,6	1 ± 0,1	NT	56,6
Glioma	HTB-138	1,9 ± 0,3	3,77	>100	0,52 ± 0,1	82 ± 10	53,5 ± 14
Pancreático	HPAC	2,8 ± 0,9	24,4 ± 12	>100	31,6 ± 27	81,5 ± 59	79 ± 56
Leucemia	CCRF-CEM	2 ± 0,97	4,02	92 ± 81,6	0,6 ± 0,01	>100	73 ± 51,6
Pulmón NSC	NCI-H460	2,8 ± 2	5,4 ± 2,1	NT	0,5 ± 0,1	>100	65
Colorrectal	HT-29	5,4 ± 1,8	59,4	>100	2,5 ± 1	97,5 ± 30	45 ± 4,7
Melanoma	MM200	1,07 ± 0,5	7,34	>100	0,6 ± 0,3	58 ± 2,7	93 ± 2,9

3.3.1. Farmacocinética de HMC - Oral

Cuando se comparó con el perfil farmacocinético de DHE administrado oralmente, el HMC administrado por la misma vía y con la misma dosis (50 mg/kg), el HMC presentó una Cmax de 141 µM (alcanzada después de 1 h) en comparación con 511 µM para DHE (alcanzada después de 15 min) (Tabla 3 y Figura 3). Como el DHE, el HMC es sometido también a conjugación con concentraciones plasmáticas bajas de la forma libre de la molécula observada (1,3 µM después de 30 min) (Tabla 3 y Figura 3). Esto es menos de la mitad de la concentración máxima de deshidroequol libre alcanzada utilizando el mismo régimen posológico (3,3 µM después de 15 min) (Figura 3). La relación de libre:total es mayor para el HMC cuando se compara al DHE (0,92 frente a 0,64 respectivamente).

Tabla 2.1. Comparación de las concentraciones plasmáticas de fármaco libre y total alcanzadas en ratones a los que se ha administrado 50 mg/kg de HMC o DHE p.o.

Tiempo	HMC (uM)		DHE (uM)	
	Total	Libre	Total	Libre
0,25	72 ± 4,4	0,38 ± 0,04	511,5 ± 99	3,3 ± 0,13

0,5	122 ± 18,4	1,3 ± 0,2	357 ± 82	2,9 ± 0,05
1	141 ± 45,8	0,95 ± 0,4	387 ± 22,8	1,5 ± 0,11
4	33,9 ± 12,7	0,19 ± 0,08	117,6 ± 42	1,3 ± 0,07
24	0	0	0,13 ± 0,1	0,15 ± 0,04

3.3.2. Farmacocinética de HMC y HHC - oral

Se administraron oralmente a pacientes humanos 200 mg de HMC o de HHC. Para cada paciente tratado, se tomó sangre durante un período de 6 horas y se calculó la media de los resultados para caracterizar la farmacocinética plasmática. Los resultados iniciales dieron una semivida oral de de 3,99 horas para HMC y 3,26 horas para HHC (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Comparación de la semivida de las concentraciones plasmáticas alcanzada en seres humanos a los que se han administrado 200 mg de HMC o de HHC

Compuesto	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	$t_{1/2}$ (h)
HMC (1)	513	2,17	3,99
HHC (11)	341	2,67	3,26

3.4. Farmacocinética de HMC - i.v. y i.p.

Cuando se formuló en HPBCD y se administró i.v., se observaron niveles de HMC extremadamente altos en la sangre igualando a una concentración 1 mM de fármaco, 15 min después de la administración (Figura 4). La cinética de eliminación de HMC administrado i.v. fue bifásica siendo excretado rápidamente el HMC de la sangre a una velocidad de ~1000 µM/h en la primera hora después de la administración. Asumiendo una excreción lineal, esta velocidad se redujo a 0,97 µM/h en las horas 1-4 h después de la administración. Cuando se administró la misma formulación i.p., se observó aproximadamente 1 log menos de HMC en el plasma (131 µM por administración i.p. frente a 1069 µM por administración i.v.) hasta 1 hora después de la administración (Figura 4). Sin embargo, la cinética de eliminación por administración i.p. fue mucho más lenta durante este período (112 µM/h) resultando por tanto en una concentración sérica unas 4,5 veces más alta 1 hora después de la administración (18,7 por i.p. frente a 3,98 por i.v.). Inversamente, 1-4 horas después de la administración, la cinética de eliminación fue más rápida después de la administración i.p. en comparación con la i.v. (4,6 µM/h por i.p. frente a 0,97 µM/h por i.v.). Estos datos confirman que el HMC está altamente biodisponible en su estado libre cuando se administra por las vías i.v. o i.p.. Conjuntamente con los datos de farmacocinética oral, estos datos sugieren también que el HMC es susceptible de ser eliminado rápidamente por las enzimas gastrointestinales de desintoxicación. Se observaron grandes concentraciones de HMC libre en la orina cuando se recogió a las 0,5, 1 y 4 horas (3,3 mM, 3,9 mM y 0,093 mM).

Tabla 4. Comparación del perfil farmacocinético de HMC en suero después de administración i.v. e i.p. de HMC formulado en hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20 % a una dosis de 50 mg/kg). El recuadro muestra las concentraciones de HMC en suero.

Tiempo (horas)	HMC en suero (uM)	
	i.v.	I.p.
0,25	1069,75	131,37
0,50	198,66	31,78
1	3,98	18,74
4	0,07	0,15
24	0,05	0,17

3.5. Estudio piloto de eficacia *in vivo* – ratones con tumores HPAC

El HMC cuando se administró diariamente, i.p. a 100 mg/kg retrasó significativamente la proliferación de tumores HPAC durante el período de tratamiento cuando se comparó al control con vehículo (Figura 5). Cuando se evaluó la masa media terminal del tumor se observó también una reducción significativa de la masa final tumoral (% T/C = 62) (Figura 6). De modo importante, no se observaron signos de toxicidad en los animales a los que se administró HMC a 100 mg/kg diariamente durante 15 días como se determinó por la pérdida de peso. De hecho los animales tratados con HMC parecieron crecer cuando se compararon con el control (Figura 7). Se recogieron los órganos (hígado, riñón, bazo, fémur, estómago y colon) y se sometieron para evaluación histopatológica por Rothwell consulting. Se realizó también un análisis limitado de la bioquímica sérica. Estos datos confirman que el HMC demuestra actividad antitumorígena frente a los tumores HPAC *in vivo*.

3.5.1. Examen histopatológico de grupos tratados con HMC

Se realizó el examen histopatológico de secciones teñidas por hematoxilina y eosina cortadas de tejidos fijados por formalina procedentes de dos series de ratones experimentales. Se examinaron el hígado, riñón, estómago y colon para demostrar el daño tóxico, el bazo y la médula ósea para demostrar la mielosupresión y el tumor para el grado de necrosis. Se asignó una puntuación de 0-5 a cada muestra de tumor para el grado de necrosis presente, representando una puntuación de 0, sin necrosis, y una puntuación de 5, necrosis total. Las puntuaciones de las secciones se hicieron "a ciegas" en dos ocasiones separadas y la puntuación final dada en los resultados es la media de estas dos puntuaciones.

Tabla 5. Toxicología de HMC

Muestra	Descripción	Puntuación de la necrosis 0-5
4/04 & 1/8	Control con vehículo	0,5
4/04 & 2/8	HMC	2
4/04 & 4/8		2
4/04 & 5/8		2
4/04 & 1/11	Sin control de tratamiento	0,5

3.5.1.1. Revisión de los resultados

No se detectaron signos de toxicidad ni de mielosupresión en las secciones cortadas de los tejidos de ratones tratados con el fármaco. Sin embargo, en todos los ratones tratados con el fármaco hubo cambios irregulares inflamatorios crónicos suaves/moderadamente severos, que afectan a la serosa y al mesenterio unido, así como cambios reactivos de las células mesoteliales, en alguno de los tejidos examinados. Estos cambios son concordantes con la inyección intra-peritoneal de un material suavemente irritante.

No se detectó ninguna necrosis significativa del tejido del tumor en las muestras control 1/8 y 1/11. Sin embargo, hubo considerable necrosis en las secciones tumorales procedentes de los ratones tratados con el fármaco.

3.5.1.2. Bioquímica sérica de ratones tratados con HMC en comparación con el control

Se evaluaron la fosfatasa alcalina (ALP), la alanina-transferasa (ALT) y la creatina (Cre) en los animales tratados con HMC frente a los animales control. Los niveles de ALP y Cre fueron similares al control y estaban dentro de los límites normales (para la rata), sin embargo los niveles de ALT en el control con vehículo y en los grupos tratados con HMC fueron mucho más bajos que los niveles del control sin tratamiento

Tabla 6. Bioquímica sérica de ratones tratados con HMC en comparación con el control.

Muestra	Grupo	Marcador clínico (ratones)			
		ALP	ALT	Cre	Urea
		U/L	U/L	uM	mM
Control	1/11	116	713	7	6,92
Control con vehículo	1/8	152	441	26	9,81
Tratado con HMC (100 mg/kg)	2/8	74	505	17	7,27
	4/8	111	482	8	8,11
	5/8	100	494	8	7,79
Intervalos normales		86-246	84-143	1,5-6	6,3-8*

*para rata
ALP: Fosfatasa alcalina
ALT: Alanina-aminotransferasa
Cre: Creatinina

3.6. Apoptosis inducida por HMC en células de melanoma y en fibroblastos normales

3.6.1. Melanoma

La apoptosis inducida por HMC en todas las células de melanoma sensibles y resistentes a TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF) a concentraciones tan bajas como 2 µM (~7-10 % de apoptosis) durante 24 y 48 horas de exposición (Tabla 7 y Figura 8A). En la concentración de fármaco clínicamente significativa de 4 µM, la incidencia de células apoptóticas después de 24 h de exposición a HMC aumentó a 25 % y 39 % en las líneas celulares sensibles a TRAIL (MEL-RM) y negativas a TRAIL (IGR3) respectivamente (Tabla 7 y Figura 8A). La incidencia de apoptosis inducida por HMC a 4 µM después de 24 h de exposición en las otras líneas celulares fue ~9 %. En comparación, la incidencia de apoptosis en células tratadas con DHE a una concentración 4 µM después de 24 h de exposición fue 0-1 %. Durante 48 h a la misma concentración de HMC (4 µM), la incidencia de apoptosis

aumentó a 21-42 % en todas las líneas celulares examinadas (Tabla 7 y Figura 8B). El DHE fue el único agente distinto que indujo niveles moderados de apoptosis después de 48 h de exposición a una concentración de 4 µM, pero solamente en las líneas celulares ME4405 (14 %) y Mel-AT (15 %) (Tabla 7 y Figura 8B).

Tabla 7. Sumario de incidencia de apoptosis en células de melanoma tratado con DHE y HMC durante 24 y 48 horas.

Concentración de fármaco (µM)		Porcentaje de apoptosis							
		Sensible a TRAIL				Resistente a TRAIL		TRAIL-positiva/ Caspasa 8-negativa	
		MEL-RM		ME4405		IGR3		Mel-AT	
		DHE	HMC	DHE	HMC	DHE	HMC	DHE	HMC
24 h de exposición	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	8	0	0
	2	0	8	2	8	0	11	3	6
	4	0	25	2	9	1	39	4	9
	8	2	39	6	11	3	41	8	23
	20	5	38	11	19	4	32	10	24
48 h de exposición	Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1,5	1	1,5	1	1	1,5	1
	2	1,5	8	3	8	1	9	5	7
	4	3	22	14	42	2	21	15	25
	8	10	38	40	20	8	38	43	59
	20	12	30	35	18	8	38	40	35

3.6.2. Fibroblastos normales

Se realizaron estudios sobre fibroblastos normales (MRC-5) y células de melanoma sensibles a TRAIL (ME4405 y MEL-RM) utilizando concentraciones 8 µM de DHE o de HMC durante 24 y 48 h de exposición (Figura 9). Estos datos demuestran que el HMC, y en menor medida el DHE, indujeron marcados niveles de apoptosis en ambas líneas celulares de melanoma durante 24 y 48 horas. De modo importante, a la vez que se promovía la muerte celular programada de las células malignas, los fibroblastos normales demostraron que ambos, HMC y DHE, indujeron la apoptosis a una concentración 8 µM de fármaco durante 24 y 48 h de exposición. Estos datos confirman que el HMC es selectivamente citotóxico para las células cancerosas.

Los compuestos de isoflavano de la invención presentan un perfil de eficacia superior frente a todos los cánceres analizados en comparación con DHE. Mientras que el HMC es marginalmente más tóxico que el DHE en las células NFF y RK, el HMC es marcadamente menos tóxico que el cisplatino. El HMC administrado oralmente a ratones es menos biodisponible en comparación con el DHE pero la relación de libre:total es mayor. El HMC formulado en HPBCD estaba marcadamente biodisponible en su forma libre cuando se administró i.v. e i.p. Las concentraciones significativas en suero de HMC libre después de administración i.p. estuvieron unas 18 veces por encima de las de HMC administrado oralmente. Se ha demostrado que el HMC, formulado en HPBCD al 20 % y administrado i.p., ejerce una moderada actividad antitumorígena frente a tumores HPAC *in vivo*. El HMC cuando se administra a 100 mg/kg a los ratones no es tóxico para los órganos importantes como se determina por histopatología, sin embargo, en todos los ratones tratados con el fármaco se observaron cambios irregulares inflamatorios crónicos suaves/moderadamente severos, que afectan a la serosa y al mesenterio unido, así como cambios reactivos de las células mesoteliales, que son concordantes con la inyección intra-peritoneal de un material suavemente irritante.

El HMC indujo niveles moderadamente fuertes de apoptosis en células de melanoma resistentes a TRAIL y sensibles a TRAIL tanto después de 24 como de 48 horas de exposición. Las células fibroblastos normales fueron resistentes a la apoptosis después de 48 horas de exposición. El DHE induce niveles suaves-moderados de apoptosis en células de melanoma resistentes a TRAIL y sensibles a TRAIL después de 48 horas de exposición. Las células fibroblastos normales fueron resistentes a la apoptosis después de 48 horas de exposición. La capacidad de ambos, HMC y DHE para inducir la apoptosis en células caspasa-negativas da a entender que no es esencial una ruta operacional de muerte programada extrínseca para la apoptosis mediada por HMC y DHE.

3.7 Toxicidad sinérgica de HMC *in vitro* en células cancerosas cuando se combina con cisplatino, paclitaxel y gemcitabina, camptotecina, topotecán y doxorubicina

3.7.1. Combinación de HMC con cisplatino frente a la línea celular MM200 de melanoma.

Se evaluó la sinergia de HMC con cisplatino en combinación durante 5 días de exposición o en secuencia (HMC→cisplatino) frente a la línea celular MM200 de melanoma. Fue difícil evaluar la toxicidad sinérgica utilizando un cambio de la IC50 como una medida de la sinergia debido a la toxicidad de HMC como monoterapia (Tabla 8). El

análisis 3D de los datos revela que solamente la toxicidad aditiva fue clara utilizando el protocolo de combinación de 5 días (Fig. 11). La evidencia de sinergia utilizando la combinación de HMC-cisplatino fue evaluada además utilizando la secuencia de HMC→cisplatino (24 horas de exposición a cada compuesto secuencialmente) frente a la línea celular MM200 de melanoma. Utilizando el cambio en la IC50 para evaluar la sinergia se observó que el HMC a concentraciones de 2 µM quimiosensibilizaba marcadamente las células MM200 para el cisplatino en >1000 veces (Tabla 8). Se confirmó que el HMC inducía la quimiosensibilización de las células MM200 para el cisplatino utilizando el análisis 3D de los datos (Fig. 11B). Estos datos demuestran que el HMC es capaz de quimiosensibilizar las células cancerosas, en este caso melanoma, al cisplatino.

Tabla 8. Evaluación comparativa de la sinergia entre el HMC y el cisplatino frente a la línea celular Mel-RM de melanoma. Se muestran datos de la IC50 media para cada agente cuando se evalúa como una monoterapia o en combinación

FÁRMACO	TRATAMIENTO (IC50 uM)				
	Combinado	Factor de cambio	24 h	HMC en primer lugar	Factor de cambio
cisplatino	8,82	—	6,32	—	—
HMC	0,72	—	20,64	—	—
HMC 10 uM	1,00E−06	efecto HMC	—	1,28E−05	>10000
HMC 5 uM	1,00E−06	efecto HMC	—	2,71E−05	>10000
HMC 2 uM	1,00E−06	efecto HMC	—	1,00E−06	>10000
HMC 1 uM	0,45	efecto HMC	—	8,29	−1,31

3.7.2 Combinación de HMC con gemcitabina frente a las células Mel-RM de melanoma.

Se evaluó la sinergia de HMC con gemcitabina en combinación durante 5 días de exposición o en secuencia (HMC→gemcitabina) frente a la línea celular Mel-RM de melanoma. Fue difícil evaluar la toxicidad sinérgica utilizando un cambio de la IC50 como una medida de la sinergia debido a la toxicidad de HMC como monoterapia (Tabla 9). El análisis 3D de los datos revela que el protocolo de combinación de 5 días no provocó toxicidad sinérgica frente a la línea celular Mel-RM. La evidencia de sinergia utilizando la combinación de HMC-gemcitabina fue evaluada además utilizando la secuencia HMC→gemcitabina (24 horas de exposición a cada compuesto secuencialmente) frente a la línea celular Mel-RM de melanoma. Utilizando el cambio en la IC50 para evaluar la sinergia se observó que el HMC a concentraciones de 2 y 1 µM quimiosensibilizaba marcadamente las células Mel-RM para la gemcitabina en >1000 veces. Se confirmó que el HMC inducía la quimiosensibilización de las células Mel-RM para la gemcitabina utilizando análisis 3D de los datos. Estos datos demuestran que el HMC es capaz de quimiosensibilizar las células cancerosas a la gemcitabina.

Tabla 9. Evaluación comparativa de la sinergia entre el HMC y la gemcitabina frente a la línea celular Mel-RM de melanoma. Se muestran datos de la IC50 media para cada agente cuando se evalúa como una monoterapia o en combinación

FÁRMACO	TRATAMIENTO (IC50 uM)				
	Combinado	Factor de cambio	24 h	HMC en primer lugar	Factor de cambio
HMC	0,51	—	27,79	—	—
HMC 1 uM	1,00E−06	efecto ?HMC	—	1,76E−03	>1000
HMC 2 uM	1,00E−06	efecto ?HMC	—	1,00E−06	>1000
Gemcitabina	3,88E−03	—	4,67E−03	—	—
HMC	0,51	—	27,79	—	—
HMC 1 uM	1,00E−06	efecto ?HMC	—	1,00E−06	>1000
HMC 2 uM	1,00E−06	efecto ?HMC	—	3,89E−05	>100

3.7.3. Combinación de HMC con paclitaxel frente a la línea celular 4405 de melanoma.

Se evaluó la sinergia de HMC con paclitaxel en combinación durante 5 días de exposición o en secuencia (HMC→paclitaxel) frente a la línea celular 4405 de melanoma. Fue difícil evaluar la toxicidad sinérgica utilizando un cambio de la IC50 como una medida de la sinergia debido a la toxicidad de HMC como monoterapia (Tabla 10). Se observó una reducción de 30 veces en la IC50 en el experimento de combinación en comparación con la monoterapia de paclitaxel. Sin embargo, el análisis 3D de los datos reveló que el protocolo de combinación de 5 días no provocó toxicidad sinérgica frente a la línea celular 4405. La evidencia de sinergia utilizando la combinación de HMC-paclitaxel fue evaluada además utilizando la secuencia HMC→paclitaxel (24 horas de exposición a cada compuesto secuencialmente) frente a la línea celular 4405 de melanoma. Utilizando el cambio en la IC50 para evaluar la sinergia se observó que el HMC a concentraciones 2 µM quimiosensibilizaba marcadamente las células

4405 para el paclitaxel en >1000 veces. Se confirmó que el HMC inducía la quimiosensibilización de las células 4405 para el paclitaxel utilizando análisis 3D de los datos. Estos datos demuestran que el HMC es capaz de quimiosensibilizar las células cancerosas al paclitaxel.

Tabla 10. Evaluación comparativa de la sinergia entre el HMC y el paclitaxel frente a la línea celular 4405 de melanoma. Se muestran datos de la IC50 media para cada agente cuando se evalúa como una monoterapia o en combinación

FÁRMACO	TRATAMIENTO (IC50 uM)				
	Combinado	Factor de cambio	24 h	HMC en primer lugar	Factor de cambio
HMC 1 uM	0,006	1,00	—	0,03	−4,44
HMC 2 uM	1,00E−06	5964,400	—	0,01	−1,035
Paclitaxel	1,25E−07	—	5,84E−04	—	—
HMC	1,26	—	55,50	—	—
HMC 1 uM	4,12E−09	30,36	—	5,31E−05	11,00
HMC 2 uM	3,91E−10	efecto ?HMC	—	5,48E−09	106633,75

3.7.4. Combinación de HMC con topotecán frente a la línea celular MM200 de melanoma

Se evaluó la sinergia de HMC con topotecán en combinación durante 5 días de exposición o en secuencia (HMC→topotecán) frente a la línea celular MM200 de melanoma. Fue difícil evaluar la toxicidad sinérgica utilizando un cambio de la IC50 como una medida de la sinergia debido a la toxicidad de HMC como monoterapia (Tabla 8). El análisis 3D de los datos confirmó que el protocolo de combinación de 5 días no provocó toxicidad sinérgica frente a la línea celular MM200. La evidencia de sinergia utilizando la combinación de HMC-gemcitabina fue evaluada además utilizando la secuencia HMC→topotecán (24 horas de exposición a cada compuesto secuencialmente) frente a la línea celular MM200 de melanoma. Utilizando el cambio en la IC50 para evaluar la sinergia se observó que el HMC a una concentración 2 μM quimiosensibilizaba marcadamente las células MM200 pare el topotecán en >1000 veces (Tabla 11). Se confirmó que el HMC inducía la quimiosensibilización de las células MM200 para el topotecán utilizando análisis 3D de los datos. Estos datos demuestran que el HMC es capaz de quimiosensibilizar las células cancerosas al topotecán. Del análisis 3D aparece que la combinación óptima de HMC y topotecán frente a la línea celular MM200 de melanoma es de 2 μM de HMC y entre 1 y 0,1 μM de topotecán.

Tabla 11. Evaluación comparativa de la sinergia entre el HMC y el topotecán frente a la línea celular MM200 de melanoma. Se muestran datos de la IC50 media para cada agente cuando se evalúa como una monoterapia o en combinación

FÁRMACO	TRATAMIENTO (IC50 uM)				
	Combinado	Factor de cambio	24 h	HMC en primer lugar	Factor de cambio
HMC 1 uM	0,115	−14,145	—	0,009	9,304
HMC 2 uM	1,00E−06	Efecto ?HMC	—	7,85E−05	>1000
Topotecán	0,095	—	2,216	—	—
HMC	0,702	—	17,952	—	—
HMC 1 uM	0,000	Efecto ?HMC	—	0,044	50,656
HMC 2 uM	1,00E−06	Efecto ?HCM	—	1,00E−06	>10000

3.7.5. Combinación de HMC con camptotecina frente a la línea celular MeI-RM de melanoma

Se evaluó la sinergia de HMC con doxorubicina en combinación durante 5 días de exposición o en secuencia (HMC→doxorubicina) frente a la línea celular MeI-RM de melanoma. Fue difícil evaluar la toxicidad sinérgica utilizando un cambio de la IC50 como una medida de la sinergia debido a la toxicidad de HMC como monoterapia (Tabla 12). El análisis 3D de los datos confirmó que el protocolo de combinación de 5 días no provocó toxicidad sinérgica frente a la línea celular MeI-RM, con lo que se observó efectivamente la evidencia de antagonismo. La evidencia de sinergia utilizando la combinación de HMC-doxorubicina fue evaluada además utilizando el protocolo de secuencia HMC→doxorubicina (24 horas de exposición a cada compuesto secuencialmente) frente a la línea celular MeI-RM de melanoma. Utilizando el cambio en la IC50 para evaluar la sinergia se observó que el HMC a una concentración 2 μM quimiosensibilizaba marcadamente las células MeI-RM para la camptotecina en ~20 veces (Tabla 12). El análisis 3D de los datos reveló, sin embargo, un marcado grado de sinergia entre HMC y doxorubicina frente a las células MeI-RM. Estos datos demuestran que el HMC es capaz de quimiosensibilizar las células cancerosas para el paclitaxel. Del análisis 3D aparece que la combinación óptima de HMC y camptotecina frente a la línea celular MM200 de melanoma es de 2 μM de HMC y entre 1 y 0,1 μM de doxorubicina.

Tabla 12. Evaluación comparativa de la sinergia entre el HMC y la doxorubicina frente a la línea celular Mel-RM de melanoma. Se muestran datos de la IC50 media para cada agente cuando se evalúa como una monoterapia o en combinación

FÁRMACO	TRATAMIENTO (IC50 uM)				
	Combinado	Factor de cambio	24 h	HMC en primer lugar	Factor de cambio
Doxorubicina	0,19	—	0,100	—	—
HMC	0,54	—	50,515	—	—
HMC 1 uM	0,40	−2,06	—	0,062	1,62
HMC 2 uM	0,18	Efecto ?HMC	—	8,16E−03	12,22

3.8 Inhibición de TNFα en macrófagos murinos (RAW 264.7) por los compuestos 4, 6 y 7

Se cultivó la línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón en DMEM suplementado con FCS, glutamina 2 mM y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. Se separaron las células subconfluentes del matraz por suave rascado y se sembraron placas de 24 pocillos a 5×10^5 células por pocillo y se dejó que se adhirieran durante 1 h. Se trataron las células con el agente de ensayo (en DMSO al 0,025 %) o con vehículo solo, 1 hora antes de la adición de 50 ng/ml de LPS. Después de incubación durante 16 horas, se recogió el medio de cultivo y se conservó a −80 ºC para medir el TNFα utilizando un ensayo inmunométrico por enzimas (Becton Dickinson).

Se analizaron el compuesto 6, esto es 3-(4-metoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-7-metoxi-cromano, y el compuesto 7 de la presente invención y los resultados se muestran en la Figura 12, que indica que los compuestos ensayados inhiben el TNFα de los macrófagos murinos de una manera dependiente de la dosis a lo largo de los intervalos de concentraciones analizados.

Los datos originales para los compuestos 6, 7 y adicionalmente el compuesto 4, se muestran en la Tabla 13 que sigue.

Tabla 13. Inhibición de TNFα en macrófagos murinos por los compuestos 4, 6 y 7

Concentración (μM)	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 4
10	−48,7	−26,2	−6,1
1	−13,0	−25,4	−11,9
0,1	−10,4	−1,4	−6,3
0,001	1,0	19,2	−14,3
0,01	—	—	−11,3

3.9 Evaluación de HHC como quimiosensibilizante

Se sometió a cribado el HHC como quimiosensibilizante frente a un panel de líneas celulares representativas de una variedad de indicaciones de cáncer utilizando un panel de citotóxicos usados comúnmente en el tratamiento del cáncer. Se ha revelado que el HHC tiene capacidad para quimiosensibilizar fuertemente las líneas celulares cancerosas de diferentes patologías a la gemcitabina (cánceres de ovario, de próstata, de mama y pancreáticos, y glioma) (Tabla 14). Se ha observado una fuerte sinergia utilizando HHC:cisplatino frente a cáncer de ovario y de próstata, una sinergia suave frente a líneas celulares de cáncer colorrectal y no se observó ninguna sinergia en el cáncer pancreático ni en el glioma. Se ha observado sinergia moderada utilizando la combinación HHC:paclitaxel frente a las líneas celulares de cáncer de mama y colorrectal, y de melanoma. Se han observado datos equívocos de sinergia utilizando la combinación HHC:paclitaxel frente a líneas celulares de cáncer de ovario y líneas celulares de glioma y no hubo signos de sinergia frente a las líneas celulares de cáncer de próstata y pancreático. Los datos han revelado que el HHC es capaz de quimiosensibilizar fuertemente la línea celular MM96L de melanoma para el cisplatino, carboplatino y dacarbazina (Tabla 7).

Tabla 14. Evaluación de HHC como quimiosensibilizante utilizando un panel de líneas celulares cancerosas y citotóxicos estándar

Fármaco	Indicaciones de cáncer					
	Ovario	Próstata	Mama	Melanoma	Glioma	Pancreático
	CP70	PC3	MDA-468	MM96L	HTB-138	HPAC
Cisplatino	SSSSS	SSSSS	—	SSSSS	n.o.	n.o.
	—	SSSSS	—	—	n.o.	—
	—	—	—	—	—	—
Gemcitabina	SSSSS	SSSSS	SSSSS	—	SSSSS	SSSSS
	—	—	—	—	SSSSS	—

Fármaco	Indicaciones de cáncer					
	Ovario	Próstata	Mama	Melanoma	Glioma	Pancreático
	—	—	—	—	—	—
Paclitaxel	n.o.	n.o.	MS	—	MS	n.o.
	MS	—	—	—	n.o.	—
	—	—	—	—	n.o.	—
Carboplatino	—	—	—	SSSSS	—	—
Dacarbazina	—	—	—	SSSSS	—	—

Clave: SSSSS = Sinergia
MS = sinergia moderada
n.o. = no se observa
— = no se analiza

3.10. Eficacia de DHE, HMC y HHC frente a líneas celulares seleccionadas de melanoma

En comparación con el DHE, tanto el HMC como el HHC demostraron una excelente actividad anti-cáncer frente a una variedad de líneas celulares de melanoma. El HHC fue el agente más eficaz frente a todas las líneas celulares de melanoma analizadas hasta ahora teniendo valores de IC50 inferiores a 1 µM (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de la eficacia de DHE, HMC y HHC frente a la monoterapia de melanoma

Análogo	Línea celular de melanoma (IC50 µM)						
	MM200	A2058	IgR3	RM	4405	MM96L	SKMe128
DHE	4,77 ± 4	NT	NT	NT	NT	4,76	4,40
HMC	1,13 ± 0,52	1,42 ± 0,48	0,51 ± 0,08	1,4 ± 1,6	1,46 ± 0,18	1,31 ± 0,38	0,68 ± 0,16
HHC	0,66 ± 0,28	0,34	0,20	0,39 ± 0,28	0,50	0,2 ± 0,09	0,36 ± 0,34

4.0 Efecto sobre los macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con LPS

Se cultivó la línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón en DMEM suplementado con suero fetal de ternera (FCS), glutamina 2 mM y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. Se separaron las células subconfluentes del matraz por suave rascado y se sembraron placas de 24 pocillos a 5×10^5 células por pocillo y se dejó que se adhirieran durante 1 h. Se trataron entonces las células con el compuesto de ensayo a una concentración 10 µM (en DMSO al 0,025 %) o con vehículo solo, y se incubaron durante 1 hora. Se añadieron entonces 50 ng/ml de LPS (LPS-Sigma-Aldrich). Después de incubación durante 16 horas, se recogió el medio de cultivo y se conservó a −80 ºC para las medidas de eicosanoides utilizando ensayos inmunométricos por enzimas (PGE2 y TXB2—Cayman Chemical).

Tabla 16. Porcentaje de cambio en la síntesis de eicosanoides después de incubar el compuesto de ensayo a una concentración 10 µM comparado con la incubación con vehículo solo. Los valores positivos indican una síntesis mejorada, los valores negativos indican la inhibición de la síntesis y consecuentemente dan a entender una actividad anti-inflamatoria.

Compuesto	PGE_2	TXB2
1	−33,8	0
2	−12,6	16
6	−37,7	−16,4
11	27,2	51,4

La invención ha sido descrita aquí, con referencia a ciertas realizaciones preferidas, con el fin de facilitar al lector la práctica de la invención sin una experimentación indebida.

Además, los títulos, encabezamientos, o similares se proporcionan para mejorar la comprensión del lector de este documento, y no se deben considerar como limitantes del alcance de la presente invención,

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se debe entender que implican la inclusión de un entero o etapa indicado o un grupo de enteros o etapas indicados pero no la exclusión de ningún otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

La invención incluye también todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados individualmente o colectivamente en esta memoria descriptiva y cualquiera y todas las combinaciones de dos o más de dichas etapas o características.

La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier técnica anterior no es, y no debe ser tomada como un reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que la técnica anterior forma parte del conocimiento general común en el campo de lo que se pretende.

Artículos de referencia seleccionados

Constantinou AI, Mehta R, Husband A. 2003 Phenoxodiol, a novel isoflavone derivative, inhibits dimetthylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. Eur J Cancer. 39, 1012-8.

Constantinou A I, Husband A. 2002 Phenoxodiol (2H-1-benzopyran-7-0,1,3-(4-hydroxyphenyl)), a novel isoflavone derivative, inhibits DNA topoisomerase II by stabilizing the cleavable complex. Anticancer Res. 22, 2581-5.

Gamble, J R., Xia, P., Hahn, C., Drew, J., Drogemuller, C., Carter, C., Walker, C., Brown, D M., Vadas, M A. 2003 Phenoxodiol, a derivative of plant flavanoids, shows potent anti-tumour and anti-angiogenic properties. Nature Medicine. Submitted.

Hersey, P and Zhang, X. D. 2001 How melanoma cells evade Trail-induced apoptosis. Nature reviews, Cancer, 1, 142-150.

Kamsteeg, M., Rutherford, T., Sapi, E., Hanczaruk, B., Shahabi, S., Flick, M., Brown, D. M and Mor, G. 2003 Phenoxodiol-an isoflavone analogue-induces apoptosis in chemo-resistant ovarian cancer cells. Oncogene, 22, 2611-20.

O'Dwyer P J, Moyer J D, Suffness M, Harrison S D Jr, Cysyk R, Hamilton T C, Plowman J. 1994 Antitumor activity and biochemical effects of aphidicolin glycinate (NSC 303812) alone and in combination with cisplatin *in vivo*. Cancer Res. 54, 724-9

Todorov P T, Field W N, Tisdale M J 1999 Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). Br J Cancer. 80,1734-7.

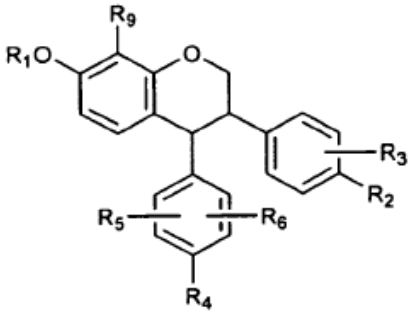
Bellisarii, F. L., S. Gallina, et al. (2001). “Tumor necrosis factor-alpha and cardiovascular diseases.” Italian Heart Journal: Official Journal of the Italian Federation of Cardiology. 2(6):408-17.

Szlosarek, P. W. and F. R. Balkwill (2003). “Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours.” Lancet Oncol 4(9): 565-73.

Nakata E, Hunter N, Mason K, Fan Z, Ang K K, Milas L. 2004 C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances the efficacy of docetaxel chemoradiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 59(4):1163-73.

REIVINDICACIONES

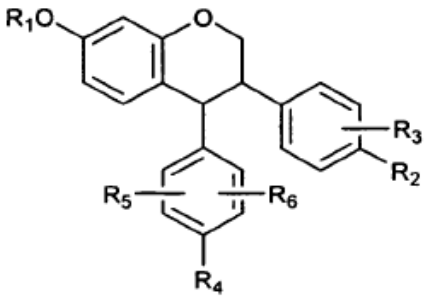
1. Un compuesto de la fórmula general (I)



(I)

en la que
R_1 es hidrógeno;
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno;
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, alcoxi, o alquilo, y
R_9 es hidrógeno o alquilo,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables..

2. Un compuesto según la reivindicación 1, de la fórmula general (I-a):



(I-a)

en la que
R_1 es hidrógeno;
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, o alcoxi.

3. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde

R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi, o alcoxi C_{1-4}, con la condición de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_4, R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, o alcoxi,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Un compuesto de la reivindicación 3, en donde

R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi o isopropoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_4 es hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi, o isopropoxi; y
R_5 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, metoxi, etoxi, propoxi, o isopropoxi,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. Un compuesto de la reivindicación 4, en donde

R_1 es hidrógeno,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, hidroxi o metoxi, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno;
R_4 y R_6 son independientemente hidrógeno, hidroxi, o metoxi; y
R_5 es hidrógeno,
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

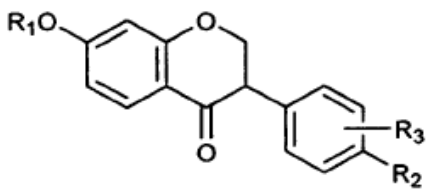
6. Un compuesto de la reivindicación 1, seleccionado de:

3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol;
3-(4-hidroxifenil)-4-fenilcroman-7-ol;
3-(4-hidroxifenil)-4-(3-metoxifenil)croman-7-ol;
3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol;
3-(4-hidroxifenil)-4-(2,6-dimetoxi-4-hidroxifenil)croman-7-ol;
3-(4-hidroxifenil)-4-(2-hidroxifenil)croman-7-ol;
3-(3-hidroxifenil)-4-(3-metoxifenil)croman-7-ol;
3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)croman-7-ol; y
3-(4-hidroxifenil)-4-(3-metoxifenil)croman-7-ol.

7. Un compuesto según la reivindicación 6, seleccionado de:

3-(4-hidroxifenil)-4-(4-metoxifenil)croman-7-ol; y
3-(4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)croman-7-ol.

8. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I-a) según la reivindicación 2, que comprende la etapa de hacer reaccionar el grupo 4-ceto de un compuesto de la fórmula (II):



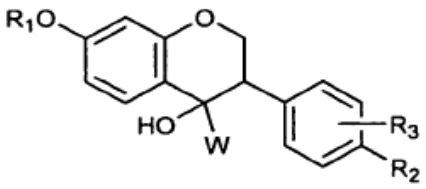
(II)

en la que
R_1, es alquilo o $Si(R_{10})_3$,
R_2 y R_3 son independientemente hidrógeno, alcoxi o $OSi(R_{10})_3$, con la excepción de que R_2 y R_3 no son ambos hidrógeno, y
R_{10} es independientemente alquilo o arilo,

con un agente arilante W−M+,

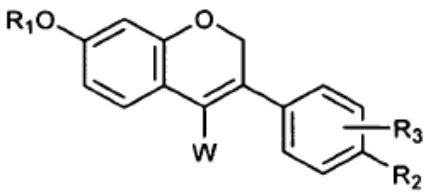
en donde:
W^- es un radical arilo opcionalmente sustituido, y
M^+ es uno o más contraiones, preferiblemente $[MgBr]^+$,

para formar el alcohol terciario intermedio de la fórmula (III):



(III)

o una de sus sales, en donde W es arilo opcionalmente sustituido, y que se deshidrata para formar un compuesto de la fórmula (IV):



(IV)

en donde W es arilo opcionalmente sustituido, cuyo compuesto de la fórmula (IV) es posteriormente hidrogenado y opcionalmente desprotegido para formar un compuesto de la fórmula (I).

9. Uno o más compuestos de la fórmula (I) o (I-a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en quimioterapia o como un agente radiosensibilizante o quimiosensibilizante.

10. El uso de uno o más compuestos de la fórmula (I) o (I-a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en asociación con un vehículo y/o excipiente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejoría de una enfermedad o trastorno.

11. El uso de la reivindicación 10, en donde la enfermedad es un cáncer o una masa tumoral.

12. El uso de la reivindicación 11, en donde el cáncer o masa tumoral es de origen epitelial (incluyendo células de cáncer de próstata, de ovario, de cuello uterino, de mama, de vesícula biliar, pancreático, colorrectal, renal, y de cáncer de pulmón de células no pequeñas), de origen mesenquimal (incluyendo células cancerosas de melanoma, mesotelioma y de sarcoma), o de origen neural (incluyendo células cancerosas de glioma).

13. Un agente para uso en el tratamiento, prevención o mejoría de una enfermedad o trastorno, cuyo agente comprende uno o más compuestos de la fórmula (I) o (I-a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

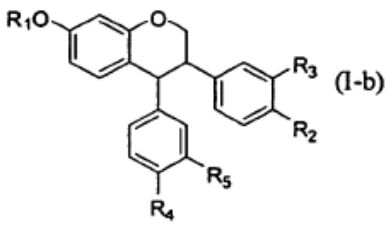
14. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la fórmula (I) o (I-a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en asociación con uno o más vehículos, excipientes, sustancias auxiliares y/o diluyentes farmacéuticos.

15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14, que comprende además un agente quimioterapéutico adicional.

16. Una composición de la reivindicación 15, en donde el agente quimioterapéutico adicional es cisplatino, deshidroequol, paclitaxel, gemcitabina, doxorubicina, topotecán, o camptotecina.

17. Una bebida o producto alimenticio, que contiene uno o más compuestos de la fórmula (I) o (I-a) según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

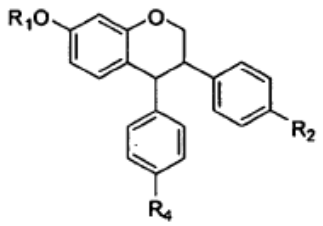
18. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula general (I-b):



(I-b)

en la que:
R_1 es hidrógeno,
R_2, R_3 y R_4 son independientemente hidrógeno, hidroxi o alcoxi C_{1-6}, y
R_5 es hidrógeno, hidroxi, alcoxi C_{1-6}, o alquilo C_{1-6},
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

19. Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula general (I-c):



(I-c)

en la que:
R_1 es hidrógeno,
R_2 es hidroxi o alcoxi C_{1-6}, y
R_4 es hidroxi o alcoxi C_{1-6},
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20. Un compuesto de la reivindicación 19, en donde R_2 es hidroxi o metoxi.

21. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 19-20, en donde R_4 es hidroxi o metoxi.

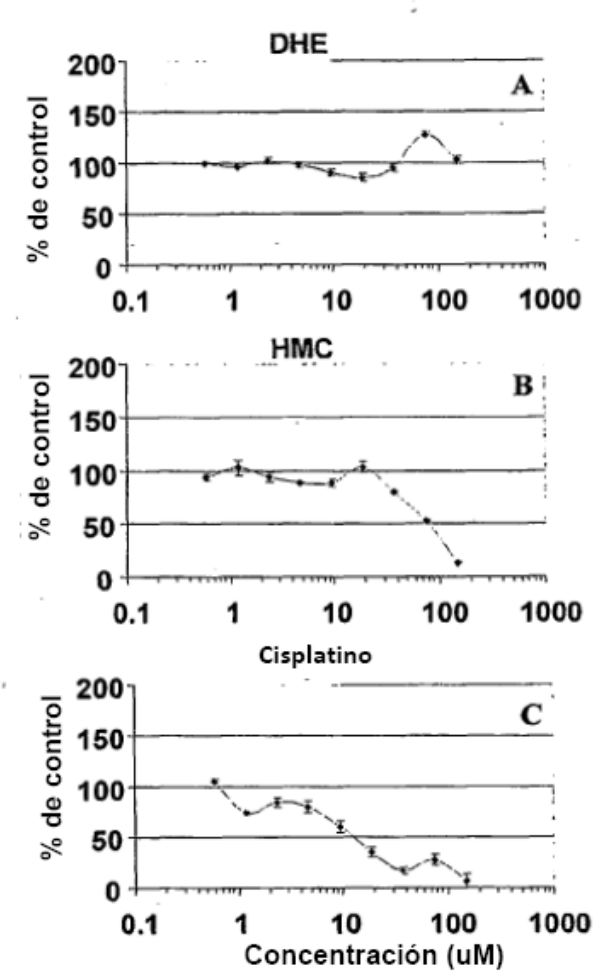

DHE
A
% de control
200
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
HMC
B
% de control
200
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
Cisplatino
C
% de control
200
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
Concentración (uM)

Fig. 1

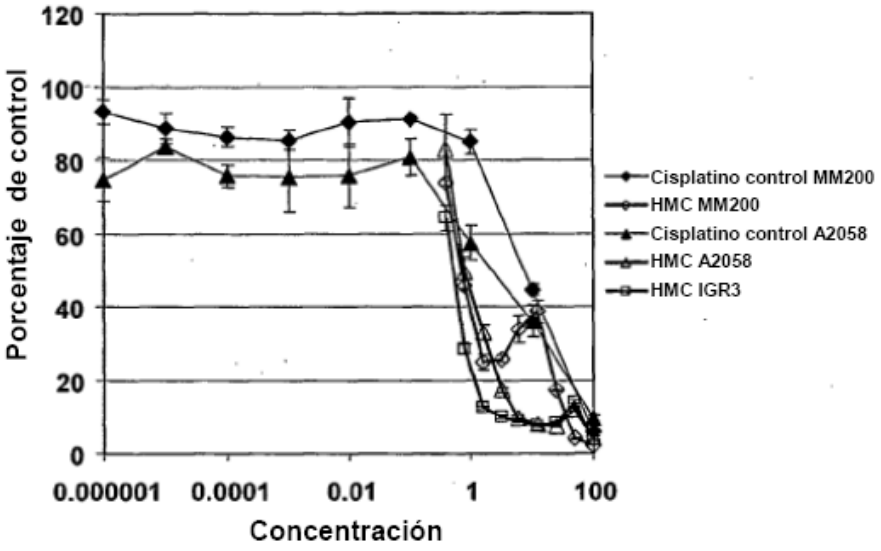

120
100
80
60
40
20
0
Porcentaje de control
0.000001
0.0001
0.01
1
100
Concentración
Cisplatino control MM200
HMC MM200
Cisplatino control A2058
HMC A2058
HMC IGR3

Fig. 2

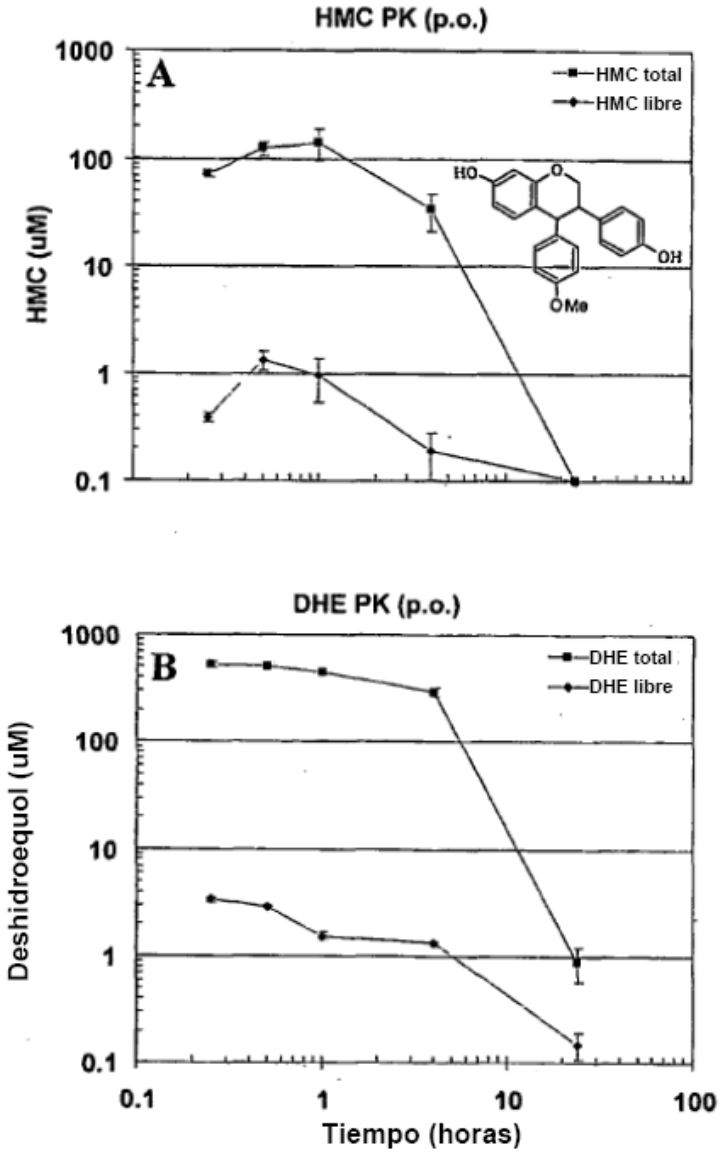

HMC PK (p.o.)
A
HMC total
HMC libre
HMC (uM)
1000
100
10
1
0.1
HO
O
OH
OMe
DHE PK (p.o.)
B
DHE total
DHE libre
Deshidroequol (uM)
1000
100
10
1
0.1
0.1
1
10
100
Tiempo (horas)

Fig. 3

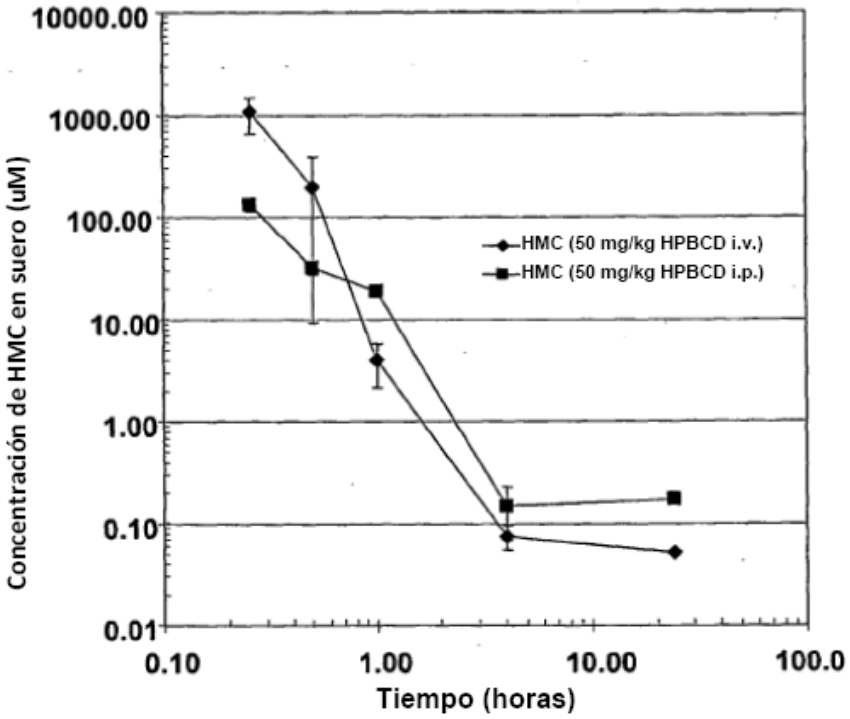

10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
0.10
0.01
Concentración de HMC en suero (uM)
0.10
1.00
10.00
100.0
Tiempo (horas)
HMC (50 mg/kg HPBCD i.v.)
HMC (50 mg/kg HPBCD i.p.)

Fig. 4

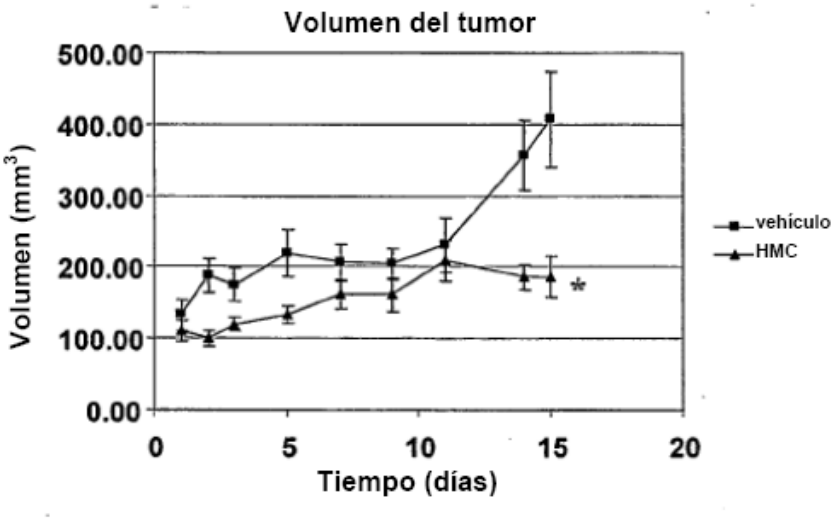

Volumen del tumor
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
Volumen (mm3)
0
5
10
15
20
Tiempo (días)
vehículo
HMC
*

Fig. 5

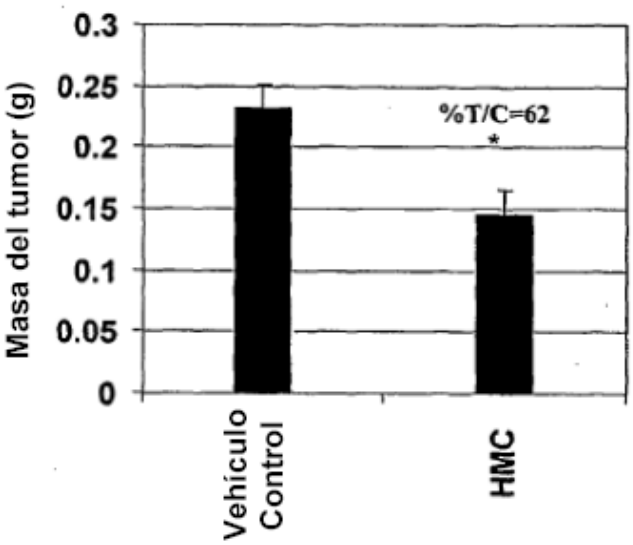

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Masa del tumor (g)
%T/C=62
*
Vehículo Control
HMC

Fig. 6

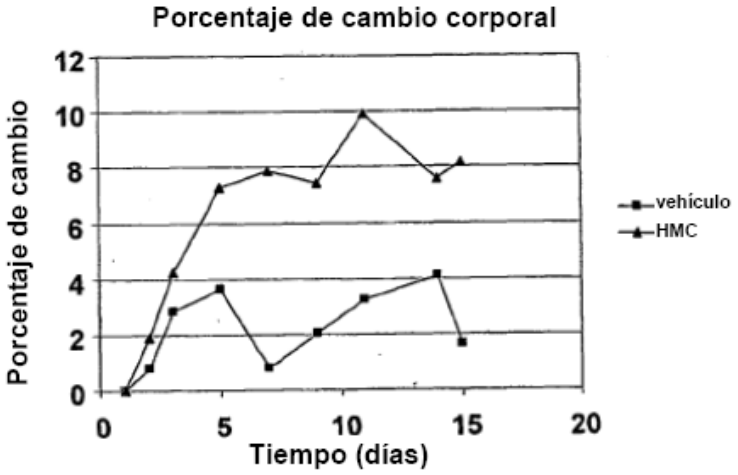

Porcentaje de cambio corporal
Porcentaje de cambio
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
Tiempo (días)
vehículo
HMC

Fig. 7

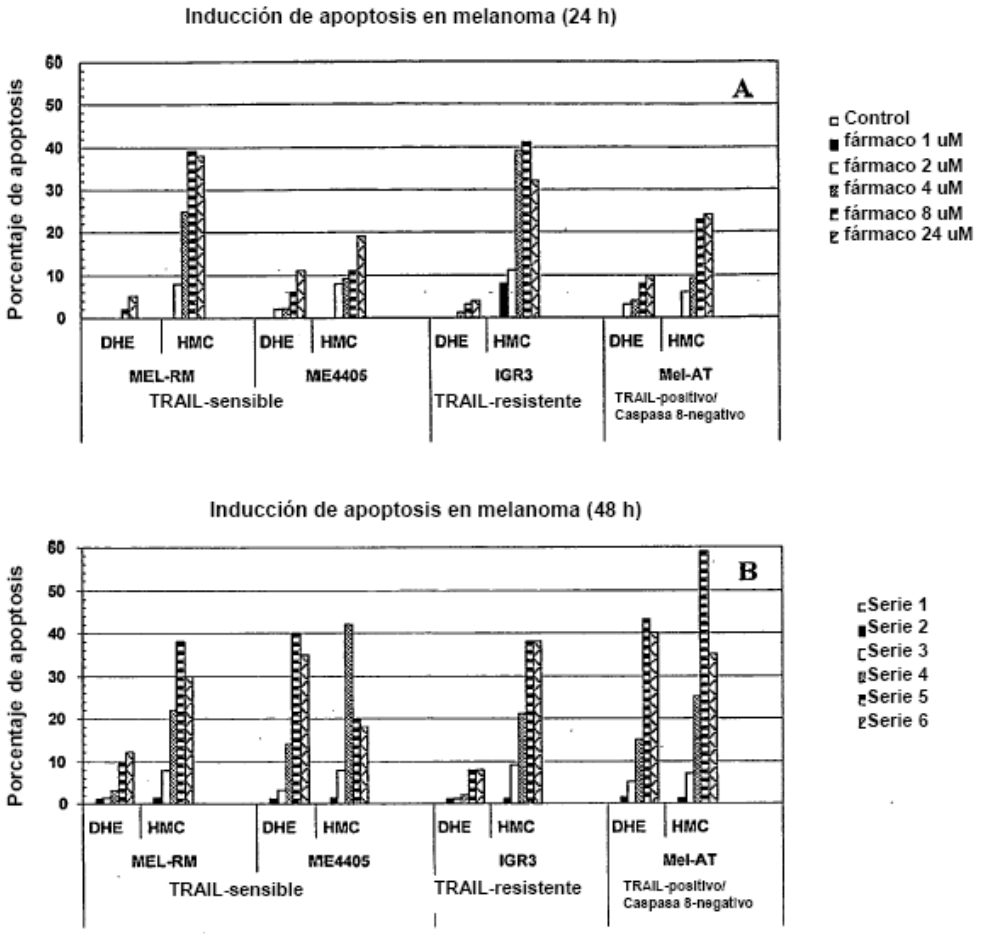

Inducción de apoptosis en melanoma (24 h)
Porcentaje de apoptosis
60
50
40
30
20
10
0
A
Control
fármaco 1 uM
fármaco 2 uM
fármaco 4 uM
fármaco 8 uM
fármaco 24 uM
DHE
HMC
MEL-RM
ME4405
IGR3
Mel-AT
TRAIL-sensible
TRAIL-resistente
TRAIL-positivo/
Caspasa 8-negativo
Inducción de apoptosis en melanoma (48 h)
Porcentaje de apoptosis
B
Serie 1
Serie 2
Serie 3
Serie 4
Serie 5
Serie 6

Fig. 8

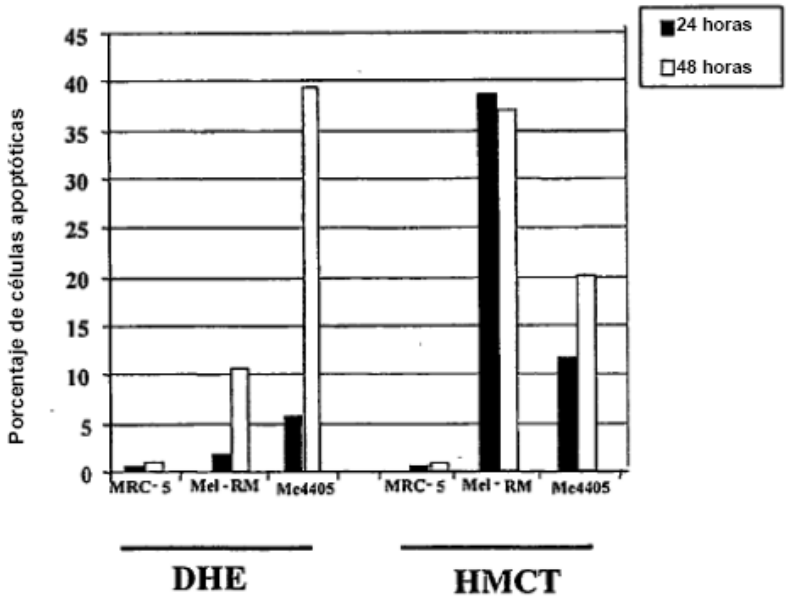

24 horas
48 horas
Porcentaje de células apoptóticas
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MRC-5
Mel-RM
Me4405
MRC-5
Mel-RM
Me4405
DHE
HMCT

Fig. 9

Fig. 10A

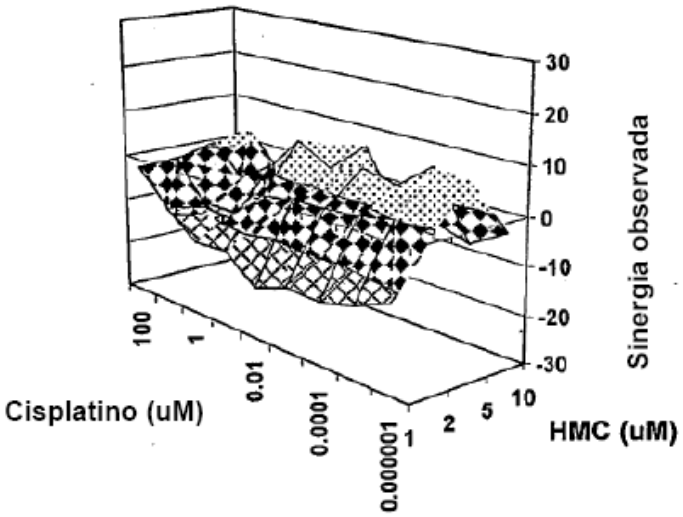
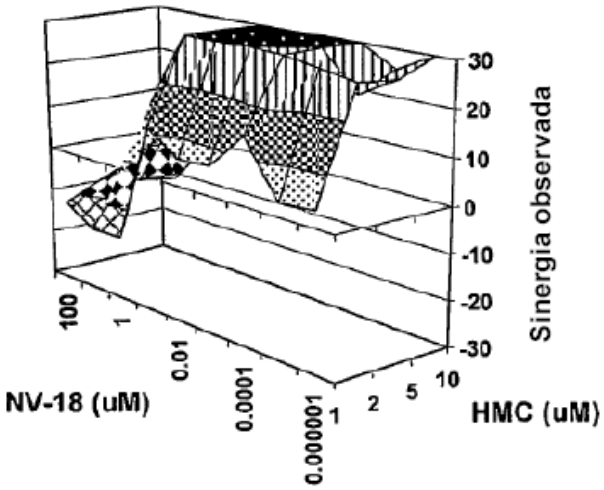
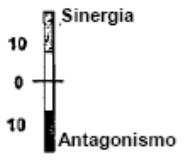
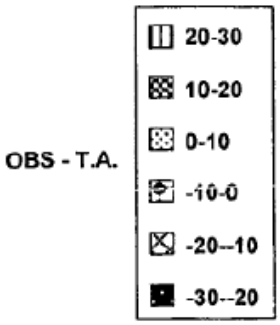


Fig. 10B







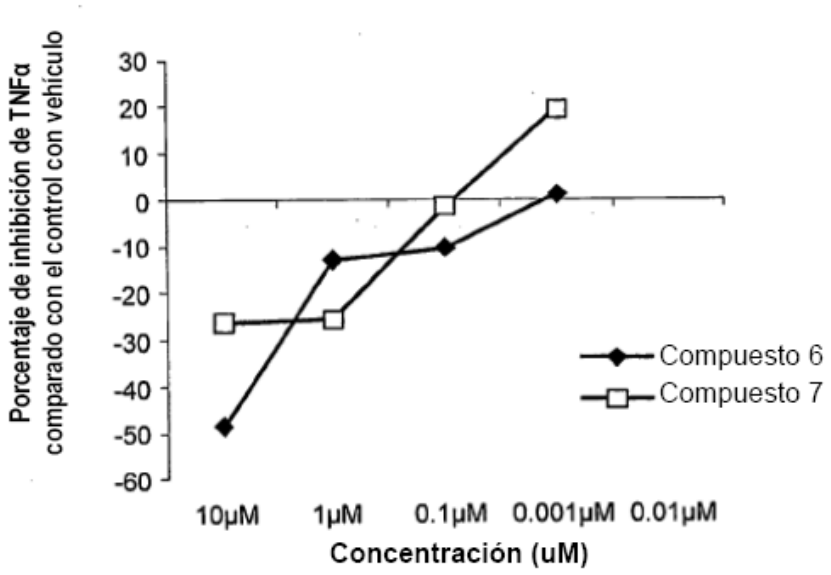

Porcentaje de inhibición de TNFα comparado con el control con vehículo
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
10μM
1μM
0.1μM
0.001μM
0.01μM
Concentración (uM)
Compuesto 6
Compuesto 7

Fig. 11

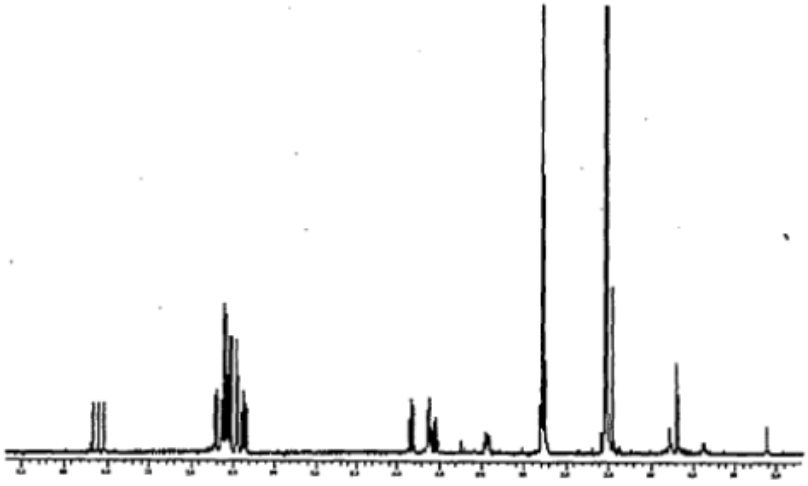


Fig. 12