

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 789**

21 Número de solicitud: 201430372

51 Int. Cl.:

C07D 491/052 (2006.01)

A61K 31/4162 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2015

Fecha de la concesión:

01.08.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.08.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070184

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAGEROVIC, Nadine;
MORALES LAZARO, Paula;
GOYA LAZA, María del Pilar;
BLASCO BENITO, Sandra;
SÁNCHEZ GARCÍA, María Cristina;
GÓMEZ CAÑAS, María y
FERNÁNDEZ RUÍZ, José Javier**

74 Agente/Representante:

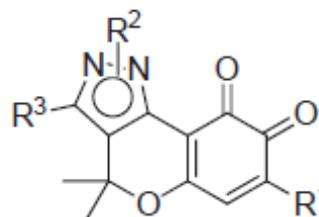
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **NUEVAS CROMENOQUINONAS MODULADORAS DE RECEPTORES CANNABINOIDES CB2
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

57 Resumen:

Nuevas cromenoquinonas moduladoras de receptores cannabinoides CB2 con actividad antitumoral.

La presente invención proporciona nuevos cannabinoides derivados de cromenopirazol-ortoquinona representados por la fórmula (I), composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y su uso como moduladores del receptor cannabinoide CB2, por lo que son especialmente útiles para el tratamiento del cáncer y de los tumores malignos.



Fórmula (I)

ES 2 548 789 B1

DESCRIPCION

Nuevas cromenoquinonas moduladoras de receptores cannabinoides CB2 con actividad antitumoral.

5

Sector de la Técnica

La presente invención se engloba en el campo de la farmacología. Específicamente, la presente invención se refiere a compuestos derivados de cromeno[4,3-c]pirazol-8,9-dionas, que modulan selectivamente el receptor cannabinoide CB2 y que son útiles para el tratamiento del cáncer y de los tumores malignos.

10

Estado de la Técnica Anterior

El cáncer es una de las principales causas de muerte, a pesar de la existencia de tratamientos que incluyen la quimioterapia, la cirugía y la radioterapia. Por lo tanto, se están realizando investigaciones sobre las causas, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Una gran parte de estos estudios tienen como objetivo la obtención de nuevos agentes antitumorales activos y seguros para administrarlos a pacientes que padecen cáncer.

15

Los endocannabinoides, junto con sus receptores y su sistema de síntesis y degradación constituyen el sistema endocannabinoide. Durante los diez últimos años, se han conseguido avances importantes sobre el papel que juega este sistema en los procesos fisiológicos y patológicos. Los cannabinoides, ya sean endógenos, naturales o sintéticos, actúan sobre los receptores cannabinoides y pueden proporcionar beneficios terapéuticos en diversas patologías. Hoy en día en algunos países se utilizan clínicamente tres medicamentos basados en el tetrahidrocannabinol o derivados (Marinol®, Sativex® y Cesamet®) para aliviar los síntomas relacionados con el tratamiento del cáncer, de la esclerosis múltiple o de la infección por SIDA. Además, en estos últimos años un número creciente de estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio han puesto de manifiesto las propiedades antitumorales de los cannabinoides. Éstos pueden inhibir la proliferación de células cancerosas, su diseminación metastásica y provocar la muerte por apoptosis de células tumorales de diversos orígenes (carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemias, mielomas, melanomas) (Velasco G. *et al*, *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12, 436-444).

La supervivencia por cáncer de mama sensibles a hormonas (ER+/PR+), Her2 positivos y triple negativos ha mejorado notablemente durante estos veinte últimos años. Sin embargo, sigue siendo el tumor maligno más frecuente entre las mujeres. Por otra parte, existe una creciente evidencia que los cannabinoides pueden actuar como antitumorales en diversos subtipos de cáncer de mama (Caffarel M. M. *et al*, *Cancer Treat. Rev.* 2012, 38, 911-918). Estos estudios se basan en resultados obtenidos en células tumorales de mama humanas y en distintos modelos animales de cáncer. Teniendo en cuenta que el receptor cannabinoide CB2 está implicado en el efecto antitumoral de los cannabinoides y que la activación del receptor cannabinoide CB1 a nivel del sistema nervioso central es la responsable de los efectos psicotrópicos asociados al consumo de estas sustancias, se hace necesaria la búsqueda de ligandos selectivos del receptor cannabinoide CB2 con actividad antitumoral que no desencadenen este tipo de efectos secundarios adversos.

Quinonas derivadas de estructuras cannabinoides con propiedades antitumorales ya han sido descritas pero todas llevan estructuras de para-quinona, es decir, los dos grupos carbonilo se encuentran en las posiciones 1 y 4 del anillo quinolínico. En WO2005067917 se describen para-quinonas derivadas del cannabidiol, del Δ^8 -tetrahidrocannabinol y del cannabinoil. Sin embargo, estas para-quinonas de naturaleza tricíclica, a pesar de mostrar propiedades antiproliferativas en líneas celulares de cáncer humano, no se unen a los receptores

50

cannabinoides según precisan sus autores, excluyendo un mecanismo antitumoral de tipo cannabinoide.

5 Otras para-quinonas derivadas del cannabidiol y su uso en el tratamiento de cánceres han sido reivindicadas en WO2008107878 donde se describe la actividad anti-proliferativa pero en ningún caso se ha encontrado que presenten actividad cannabinoide y/o de unión a los receptores cannabinoides. Es decir, la introducción de una para-quinona en estas estructuras de tipo cannabinoide da lugar a la pérdida de las propiedades cannabinoides.

10 Para-quinonas con estructura cannabinoide que modulan los receptores PPAR γ han sido descritas recientemente en EP2551255 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, metabólicas y diabetes tipo II.

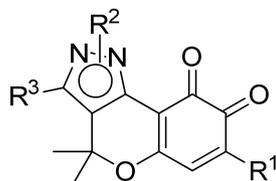
15 Más recientemente, en WO2014013117 los autores de la presente invención describen antitumorales con estructura de tipo cromenopirazol-para-diona con afinidad moderada por los receptores cannabinoides CB1 y CB2. Sin embargo, el efecto antiproliferativo de dichos compuestos, estudiado *in vitro* en líneas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular y de cáncer de próstata, está parcialmente mediado por los receptores cannabinoides CB1 y no por los receptores CB2 (Morales P. *et al*, *Eu. J. Med. Chem.* 2013, 70, 111-119).

20 En WO2010109050, el grupo de investigación de los autores de la presente invención describe cromenopirazoles de estructura no quinónica como cannabinoides con actividad analgésica, sin que se les hayan atribuido propiedades antitumorales.

25 La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos compuestos útiles para el tratamiento del cáncer y de los tumores malignos que minimicen los efectos secundarios adversos característicos de los fármacos anticancerosos empleados en la actualidad como, por ejemplo, la aparición de neuropatías. Dicho problema se pretende resolver mediante una nueva familia de compuestos caracterizados por su estructura de tipo cromenopirazol-orto-quinona que actúan por apoptosis de las células tumorales a través de diversos mecanismos de señalización celular relacionados con el receptor cannabinoide CB2 y por estrés oxidativo. Estos compuestos modulan selectivamente dicho receptor, evitando por una parte los efectos adversos de naturaleza psicotrópica que aparecen cuando se modula el receptor cannabinoide CB1 en el cerebro y por otra, minimizando la aparición de neuropatías gracias a las propiedades antiinflamatorias características de los cannabinoides.

Breve descripción

40 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I)



Fórmula (I)

45 donde,

- R¹ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alqueno C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos, halógeno, -CN, -NO₂, -N(R⁴)₂, -OR⁴, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R⁴;

- R² se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;
- 5 - R³ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos, -CN, -NO₂, -OR⁴, -N(R⁴)₂, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R⁴;
- 10 - R⁴ se independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₅, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;

o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 Además, la presente invención también hace referencia al uso del compuesto de fórmula (I) o de una composición farmacéutica del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno.

20 Es asimismo, objeto de la presente invención el procedimiento de obtención del compuesto de fórmula general (I) mediante una reacción de oxidación del correspondiente derivado fenólico precursor del compuesto de fórmula (I) con ácido *o*-yodoxibenzoico.

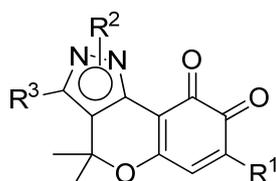
Descripción de la invención

- 25 Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que los compuestos de fórmula (I) actúan como antitumorales.

30 Además, los compuestos de fórmula (I) descritos en la presente invención presentan una ventaja técnica respecto a otros antitumorales conocidos que viene dada por su selectividad frente al receptor cannabinoide CB2. Dicha selectividad evita la aparición de efectos secundarios de naturaleza psicotrópica asociados a la modulación en el cerebro del receptor cannabinoide CB1.

35 Otra ventaja técnica de estos compuestos puede resultar del propio mecanismo de acción. La modulación del receptor CB2 por parte de los compuestos de fórmula general (I) debe proporcionar las propiedades antiinflamatorias propias de los cannabinoides. Por tanto, los compuestos de la presente invención podrían disminuir e incluso eliminar los efectos neuropáticos que actualmente presentan los fármacos antitumorales usados en clínica.

- 40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I),



Fórmula (I)

- 45 donde,

- R¹ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos, halógeno, -CN, -NO₂, -N(R⁴)₂, -OR⁴, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R⁴;

5 - R² se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;

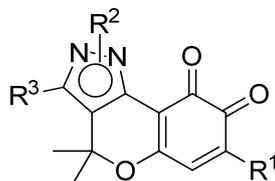
10 - R³ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos, -CN, -NO₂, -OR⁴, -N(R⁴)₂, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R⁴;

15 - R⁴ se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₇, heterocicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₅, arilo C₅-C₁₈ y heteroarilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;

o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cuando R² es un hidrogeno, los compuestos de fórmula general (I) pueden encontrarse como tautómeros.

20 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I),



Fórmula (I)

donde,

30 - R¹ se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇ y alquenilo C₂-C₁₈, opcionalmente sustituidos;

35 - R² se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, alquenilo C₂-C₁₈ y arilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;

- R³ se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₇ y alquenilo C₂-C₅, opcionalmente sustituidos;

40 o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cuando R² es un hidrogeno, los compuestos de fórmula general (I) pueden encontrarse como tautómeros.

En la presente invención, el término “alquilo C₁-C₁₈” se refiere a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 18 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 9 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, 1',1'-dimetilheptilo, 1,2-dimetiheptilo o 1',1'-dimetiletilo. Mientras que el término “alquilo C₁-C₅” se refiere a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo o *n*-pentilo. Para ambos términos, el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C₁-C₅, -CO-alquilo C₁-C₅, -CN, -COOH, -COO-alquilo C₁-C₅, -CONH-alquilo C₁-C₅ o -SO₂-alquilo C₁-C₅. Como ejemplos de grupos alquilo sustituidos son, pero sin limitarse a, 1-(1,3-ditiolano)hexilo, 1-hidroxietilo o hidroximetilo, indol-3-ilmetilo, 1,1-dimetil-5-cianopentilo, 1,1-ciclopentiloheptano, 1,1-dimetilheptano, 1,1-di(trifluorometil)hexano.

El término “alqueno C₁-C₁₈” se refiere, en la presente invención, a cadenas carbonadas, lineales o ramificadas, que presentan al menos un doble enlace y que contienen entre 2 a 18 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y 9 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse a, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo, 3-metil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 1-dodecenilo o similares. Mientras que el término “alqueno C₁-C₅” se refiere a cadenas carbonadas, lineales o ramificadas, que presentan al menos un doble enlace y que contienen entre 2 y 5 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse a, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo, 3-metil-2-butenilo. Para ambos términos, el grupo alqueno puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C₁-C₅, -CO-alquilo C₁-C₅, -CN, -COOH, -COO-alquilo C₁-C₅, -CONH-alquilo C₁-C₅ o -SO₂-alquilo C₁-C₅.

El término “cicloalquilo C₃-C₇” se refiere a un radical estable de cadenas carbonadas que forman un ciclo de entre 3 y 7 átomos de carbono, como por ejemplo y sin limitarse a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, adamantilo, 1-ciclopentilhexilo. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C₁-C₅, -CO-alquilo C₁-C₅, -CN, -COOH, -COO-alquilo C₁-C₅, -CONH-alquilo C₁-C₅ o -SO₂-alquilo C₁-C₅.

El término “heterocicloalquilo C₃-C₇” se refiere un radical estable de anillo de 3 a 7 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 5 o 6 miembros con uno o más heteroátomos. El heterocicloalquilo, según esta invención, puede ser un sistema de anillo monocíclico o bicíclico que puede incluir sistemas de anillos condensados y el átomo de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterocicloalquilo puede estar opcionalmente oxidado; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterocicloalquilo puede estar parcialmente insaturado. Ejemplos de tales heterociclos incluyen pero no se limitan a, piperidina, piperazina, pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano y morfolina. El grupo heterocicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C₁-C₅, -CO-alquilo C₁-C₅, -CN, -COOH, -COO-alquilo C₁-C₅, -CONH-alquilo C₁-C₅ o -SO₂-alquilo C₁-C₅.

El término “arilo C₅-C₁₈” se refiere, en la presente invención, a un radical estable de anillo de 5 a 18 de átomos de carbono pudiendo ser un sistema de anillo monocíclico o multicíclico que puede incluir sistemas de anillos condensados. Los grupos arilo son, por ejemplo pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Preferiblemente, el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como

alquilo C₁-C₁₈, alqueno C₂-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, halógeno, hidroxilo, -O-alquilo C₁-C₅, -CO-alquilo C₁-C₅, -CN, -COOH, -COO-alquilo C₁-C₅, -CONH-alquilo C₁-C₅ o -SO₂-alquilo C₁-C₅. Radicales arilo sustituidos son por ejemplo, pero sin limitarse a, 2,4-diclorofenilo, 1,3-diclorofenilo, 3,5-difluorofenilo, 3-metoxifenilo.

5 El término "heteroarilo C₅-C₁₈" se refiere un radical estable de anillo de 5 a 18 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 5 o 6 miembros con uno o más heteroátomos. El heteroarilo, según esta invención, puede ser un sistema de anillo
10 monocíclico o bicíclico que puede incluir sistemas de anillos condensados y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Ejemplos de radicales heteroarilos incluyen pero no se limitan a, imidazol, pirrol, piridina, piridazina, piperidina, pirazina, quinolina, indol, tiofeno, furano, oxazo y pirazol.

15 El término "halógeno" se refiere, en la presente invención, a bromo, cloro, yodo o flúor. Preferentemente a cloro.

Hay que entender que la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I), es decir, todas las formas geométricas, tautómeras y ópticas, y sus mezclas (por
20 ejemplo, mezclas racémicas). Cuando hay más centros quirales en los compuestos de fórmula (I), la presente invención incluye dentro de su alcance todos los posibles diastereómeros, incluidas sus mezclas. Las diferentes formas isómeras pueden separarse o resolverse entre sí por métodos convencionales, o cualquier isómero dado puede obtenerse por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica, estereoselectiva o asimétrica. La
25 presente invención también incluye compuestos marcados con isótopos, que son idénticos a los citados en las fórmulas (I), (II), (III) y (IV) salvo en que uno o más átomos se han reemplazado por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de
30 hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, yodo y cloro, tales como ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ¹⁸F, ¹²³I y ¹²⁵I.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentran compuestos de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos que contienen los
35 isótopos mencionados anteriormente y/u otros isótopos de otros átomos. Los compuestos marcados con isótopos de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radioactivos tales como ³H o ¹⁴C son útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o sustratos en tejidos. Se prefieren particularmente los isótopos tritio, es decir ³H, y carbono-14, es decir, ¹⁴C, por su facilidad de preparación y detectabilidad. Los isótopos ¹¹C y ¹⁸F son particularmente útiles en PET (tomografía de emisión de positrones), y los isótopos ¹²⁵I son particularmente útiles en SPECT (tomografía computerizada de emisión de un solo fotón), todos útiles en la formación de imágenes del cerebro. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar algunas ventajas terapéuticas que resultan de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor vida media *in vivo* o menores requisitos de dosificación, y por lo tanto en algunos casos pueden ser preferidos. Los
45 compuestos isotópicamente marcados de fórmula (I) se pueden preparar generalmente llevando a cabo los procedimientos descritos en los ejemplos de más abajo, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible.

50 El término "tautómero" o "forma tautomérica", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles vía una barrera de baja energía. Por ejemplo, tautómeros protónicos (también conocidos como

tautómeros prototrópicos) que incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, como por ejemplo isomerizaciones ceto-enólicas o imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos electrones de enlace.

5 Se apreciará que, para uso farmacéutico, las sales mencionadas anteriormente serán sales fisiológicamente aceptables, pero pueden encontrar utilidad otras sales, por ejemplo en la preparación de compuestos de fórmula (I) y sus sales fisiológicas aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas por Berge, Bighley y Monkhouse, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen el ácido acético, benzenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múcico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ptoluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilensalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, benzenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

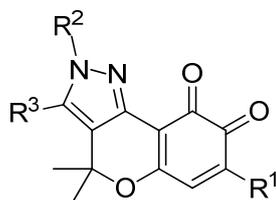
35 Los derivados o profármacos particularmente favoritos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, haciendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente por la sangre), o que potencian la liberación del compuesto original en un compartimento biológico (por ejemplo, un tumor) con relación a la especie original.

40 Cualquier compuesto que es un profármaco de un compuesto de fórmula (I) está dentro del alcance de la invención. El término "profármaco" se usa en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Tales derivados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los compuestos presentes: ésteres, ésteres de aminoácido, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos y amidas.

50 Los compuestos de fórmula (I) pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, el solvato es un hidrato.

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales o solvatos están preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otros, que tienen un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I) o de sus sales, solvatos o profármacos.

De acuerdo con una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (II),



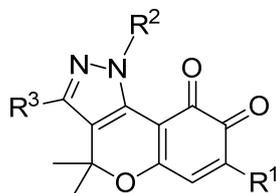
Fórmula (II)

donde,

- R¹ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇ y alqueno C₂-C₁₈, opcionalmente sustituidos;
- R² se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, alqueno C₂-C₁₈ y arilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;
- R³ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₇ y alqueno C₂-C₅, opcionalmente sustituidos;

o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (III),



Fórmula (III)

donde,

- R¹ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇ y alqueno C₂-C₁₈, opcionalmente sustituidos;
- R² se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, cicloalquilo C₃-C₇, alqueno C₂-C₁₈ y arilo C₅-C₁₈, opcionalmente sustituidos;
- R³ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₇ y alqueno C₂-C₅, opcionalmente sustituidos;

o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cuando R² es un hidrógeno, los compuestos de fórmula general (I) pueden encontrarse como tautómeros. Es decir, que se encuentran en equilibrio entre las estructuras de fórmula (II) y de fórmula (III).

En un ejemplo preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R³ se selecciona entre hidrógeno y alquilo C₁-C₁₈ opcionalmente sustituido.

En un ejemplo preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R³ es hidrógeno.

En otro ejemplo preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R¹ es un grupo alquilo C₁-C₁₈ opcionalmente sustituido.

En otro ejemplo más preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R¹ se selecciona entre metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo y 1,1-dimetilheptilo.

En otro ejemplo aún más preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R¹ es 1,1-dimetilheptilo.

En otro ejemplo preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R² es un grupo seleccionado entre hidrógeno y alquilo C₁-C₁₈ opcionalmente sustituido.

En otro ejemplo preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R² es un grupo seleccionado entre hidrógeno, metilo, etilo, propilo y 2-hidroxiethyl.

En otro ejemplo aún más preferido, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto donde R³ es un hidrógeno y R¹ es 1,1-dimetilheptilo.

De acuerdo con un modo de realización preferido, el compuesto de fórmula (I) o cualquiera de sus realizaciones y ejemplos preferidos anteriores, se selecciona entre uno del grupo que consiste en:

- a) 7-(1',1'-dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;
- b) 7-(1',1'-dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;
- c) 7-(1',1'-dimetilheptil)-1-etil-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;

o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El compuesto definido en el apartado a) anterior, consiste en un compuesto de fórmula general (I) donde R¹ es 1,1-dimetilheptilo, R² es hidrógeno y R³ es hidrógeno.

El compuesto definido en el apartado b) anterior, consiste en un compuesto de fórmula general (I) que responde a la estructura de fórmula (II) donde R^1 es 1,1-dimetilheptilo, R^2 es metilo y R^3 es hidrógeno.

5 El compuesto definido en el apartado c) anterior, consiste en un compuesto de fórmula general (I) que responde a la estructura de fórmula (III) donde R^1 es 1,1-dimetilheptilo, R^2 es etilo y R^3 es hidrógeno.

10 Según la presente memoria, cualquiera de los compuestos definidos anteriormente, es decir, aquellos compuestos que responden a la fórmula general (I) (incluyendo los compuestos de fórmulas generales (II), (III), o cualquiera de las realizaciones o ejemplos preferidos), pueden ser igualmente referidos en esta memoria como "compuesto o compuestos de la invención".

15 Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I), como descrito anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica que comprende al menos un adyuvante o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, se contempla que la composición farmacéutica contenga otro principio activo.

20 Las composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), sus tautómeros, profármacos, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, junto con los vehículos farmacéuticamente aceptables, constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de la invención. En adelante, dicha composición farmacéutica puede ser igualmente referida como "composición farmacéutica de la invención".

30 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o un gobierno federal, o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense, en la Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

40 La cantidad de compuesto de la invención, sus tautómeros, profármacos, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, terapéuticamente eficaz que debe administrarse (también referida en la presente descripción como cantidad terapéuticamente eficaz o efectiva), así como su dosificación para tratar un estado patológico con dichos compuestos, dependerá de numerosos factores, entre los que se encuentra la edad, el estado del paciente, la severidad de la enfermedad, la ruta y frecuencia de administración, el compuesto modulador a utilizar, etc.

50 Los compuestos y composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser empleados solos o junto con otros fármacos para proporcionar una terapia combinada. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición farmacéutica, o ser proporcionados como una composición farmacéutica separada, para su administración al mismo tiempo o en un momento diferente. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida

(comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral.

5 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de una composición farmacéutica, que contenga al menos un compuesto de fórmula (I) o uno de sus tautómeros, profármacos, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo en una cantidad terapéuticamente efectiva para la fabricación de un medicamento.

10 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno. Ejemplos de tipos de cáncer o de tumor maligno son: carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, mieloma y melanoma.

15 En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el
20 tratamiento de un carcinoma.

En la presente invención, se entiende por carcinoma a una forma de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno. Lugares comunes de aparición de
25 carcinomas son: la piel, la boca, el pulmón, las mamas, el tracto digestivo y el útero.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente o un tautómero, profármaco, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el
30 tratamiento de un cáncer de mama.

En la presente invención, se entiende por cáncer de mama a los siguientes grupos de cánceres: cánceres de mama sensibles a hormonas (ER+/PR+), cánceres de mama Her2 positivos y cánceres de mama triple negativos.

35 En una realización todavía más preferida el cáncer de mama corresponde al cáncer de mama triple negativo.

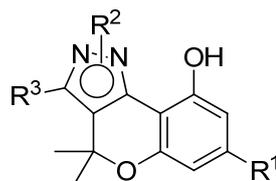
En la presente invención se entiende como cáncer de mama triple negativo a un grupo muy heterogéneo de cánceres de mama caracterizado porque no expresa los genes de los
40 receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PR) y receptores con actividad tirosina quinasa Her2 (HER2/neu).

De forma general, aunque los ensayos de actividad mostrados en la presente invención se han llevado a cabo exclusivamente sobre un tumor de mama triple negativo existen estudios que
45 muestran que los cannabinoides y los derivados de cannabinoides que actúan como cannabinoides, pueden tener efectos antitumorales en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, el cannabinoide WIN-55,212-3 mostró tener eficacia en línea de células tumorales de cáncer de mama (Qamri Z. *et al*, *Cancer Ther.* 2009, 8, 3117-3129), de cáncer de próstata (Sarfaraz S. *et al*, *Cancer Res.* 2005, 65, 1635-1641) y de colon (Sreevalsan S. *et al*, *Mol. Cancer Ther.* 2013,
50 12, 2483-2493). Igualmente, el cannabinoide delta(9)-tetrahidrocannabinoide ha sido valorado positivamente en varios tipos de cáncer. Estudios *in vitro* han mostrado que un cannabinoide puede inhibir la proliferación y/o la migración de diferentes carcinomas de mama (MCF-7, EFM-

19, T-47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436, 4T1, TSA-E1, EVSA-T, SkBr3, HTB-126) (Guindon J. *et al*, *Br. J. Pharmacol.* 2011, 163, 1447-1463).

5 Según la presente descripción, el uso de un compuesto de la invención o de una composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento o alternativamente su uso como medicamento, para el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno, puede ser obviamente entendido como un método de tratamiento de dicho cáncer o tumor, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho compuesto o composición farmacéutica de la invención. Dicho en otras palabras, la presente invención se refiere asimismo a un método de tratamiento de un cáncer o un tumor maligno (preferentemente seleccionado entre carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, mieloma y melanoma; y más preferentemente cáncer de mama sensible a hormonas (ER+/PR+), Her2 positivo o triple negativo y aún más preferentemente cáncer de mama triple negativo) que comprende administrar a un sujeto el compuesto de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, o una composición farmacéutica de la invención que comprenda el compuesto de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva.

20 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula general (I), que comprende una reacción de oxidación de un compuesto de fórmula general (IV) mediante el empleo de ácido *o*-yodoxibenzoico como agente o reactivo oxidante.



Fórmula (IV)

25 donde los sustituyentes R¹, R² y R³ se definen según se han definido en la fórmula (I).

De forma general, el procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y por extensión, los compuestos de fórmulas (II) y (III), consiste en la disolución de un compuesto de fórmula (IV) en DMF, seguida de la adición de ácido *o*-iodoxibenzoico. La reacción se deja evolucionar con agitación magnética o mecánica, a temperatura ambiente. La oxidación a orto-quinona tiene lugar de forma regioespecífica transcurridas entre 0,5 y 1,5 horas, observándose durante este proceso un cambio a rojizo del color de la mezcla. Mediante un proceso de aislamiento y purificación convencional se obtienen los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) con la pureza adecuada.

Breve descripción de las figuras

40 **Figura 1. Efecto de los compuestos de los ejemplos 1, 2 y 3 de la presente descripción sobre la viabilidad celular. A)** La línea celular MDA-MB-231 (derivada de cáncer de mama humano triple negativo) fue tratada con dosis crecientes de los compuestos de los ejemplos 1, 2 y 3 durante 48h tras lo cual se determinó la proliferación celular mediante ensayos colorimétricos con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Los datos son medias de tres experimentos independientes realizados por triplicado ± D.E. (Desviación Estándar).

45 **B)** Dosis-respuesta del compuesto ejemplo 3 de la presente invención desde la dosis de 0,5 hasta 10 µM.

Figura 2. Implicación de los receptores cannabinoides en el mecanismo antiproliferativo del ejemplo 3 de la presente descripción. Mecanismos de señalización implicados en el efecto antiproliferativo del compuesto 3. Células derivadas de tumor de mama triple negativo MDA-MB-231 fueron incubadas durante 48h con distintos antagonistas (de los receptores CB1 [SR141716 (SR1)], CB2 [SR144528 (SR2)], GPR55 [CID16020046 (CID)] y un antioxidante [α -tocoferol (Toc)]) en ausencia o presencia del compuesto 3 de la presente descripción a una dosis de 6 μ M. Las células fueron pre-tratadas con los mencionados inhibidores una hora antes de adicionar el compuesto objeto de estudio. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los datos son medias de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm D.E. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. En las figuras se indican con asteriscos los niveles de significación: *, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$ vs células tratadas en vehículo; #, $p < 0,05$ y ##, $p < 0,01$ vs células tratadas con ejemplo 3. Tratamiento en presencia del antagonista CB1, (SR1, 1 μ M), el antagonista CB2 (SR2, 1 μ M) y el antioxidante (Toc, 10 μ M). Tratamiento en presencia del antagonista GPR55 (CID, 25 μ M).

Figura 3. Citotoxicidad frente a células mamarias normales. Evaluación de la viabilidad de células epiteliales mamarias normales humanas (HMEC) 48 h después de ser tratadas con dosis crecientes (de 0,5-10 μ M) del compuesto ejemplo 3. Los datos son medias de dos experimentos independientes realizados por triplicado \pm D.E.

Figura 4. Análisis del mecanismo de acción antiproliferativo del ejemplo 3 de la presente descripción. La línea celular MDA-MB-231 fue tratada con una dosis de 6 μ M del compuesto 3 (24h). Posteriormente, se procedió al análisis mediante Western Blot de un biomarcador de apoptosis (panel **A**). Se observó un aumento muy significativo de los niveles de caspasa 3 activa en las células tratadas con el ejemplo 3 de la presente patente provoca la muerte de las células tumorales por apoptosis. El panel **B** muestra la cuantificación de 2 Western blots diferentes.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

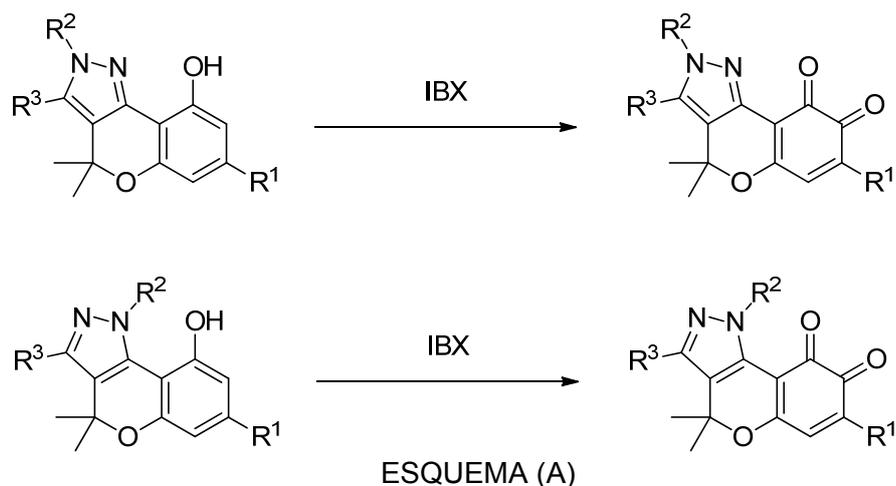
EJEMPLOS

Para la síntesis de los compuestos de fórmula (I) de la presente invención se ha utilizado como productos de partida, los 4,4-dimetil-7-(H o alquil)-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-9-oles correspondientes. Los 4,4-dimetil-7-(H o alquil)-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-9-oles de partida pueden obtenerse mediante una combinación de reacciones sintéticas conocidas en el estado del arte tales como las mencionadas en el artículo de Cumella J. *et al. ChemMedChem* 2012, **7**, 452-463.

Procedimiento general para la síntesis de orto-quinonas derivados de cromeno[4,3-c]pirazol.

Los 4,4-dimetil-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-8,9-dionas de fórmula (I) de la presente invención se obtienen por oxidación de los 4,4-dimetil-7-(H o alquil)-dihidrocromeno[4,3-c]pirazol-9-oles correspondientes. Esta oxidación transcurre de forma regioespecífica debido al empleo de ácido *o*-yodoxibenzoico (IBX) que permite obtener la *orto*-quinona deseada.

Este procedimiento se resume en el siguiente esquema (A):



Ejemplo 1- Preparación y obtención de 7-(1',1'-dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona

A una disolución de 7-(1',1'-dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-9-ol (0,030 g, 0,087 mmol) en DMF (1,5 mL) se añade ácido *o*-iodoxibenzoico (0,036 g, 0,13 mmol). La reacción se agita durante 60 minutos a temperatura ambiente observando un cambio de color de la disolución a los 30 minutos aproximadamente (adquiere un color rojizo). La mezcla de reacción se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con agua y disolución saturada de NaCl secando finalmente sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evapora a vacío y la mezcla resultante se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente Hex/AcOEt (2:1). Rto.: 29 % Sólido rojo, P.f.: 90,2 °C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8,03 (sa, 1H, NH); 7,66 (s, 1H, 3-H); 7,12 (s, 1H, 6-H); 1,65 (sa, 6H, OC(CH₃)₂); 1,49 (sa, 2H, 2'-H); 1,37 (s, 6H, C(CH₃)₂); 1,29 (sa, 6H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 1,21 (sa, 2H, 6'-H); 0,84-0,80 (m, 3H, 7'-H) ppm. HPLC/MS*: Gradiente: 80% A a 100% A; EM (ES⁺) m/z: 357 (99%) [M+H]⁺; *t_R* (tiempo de retención): 2,03 min. Anal.: C₂₁H₂₈N₂O₃ (356,46 g/mol) Teórico: C, 70,76%; H, 7,92%. Hallado: C, 70,41%; H, 7,57%.

Ejemplo 2- Preparación y obtención de 7-(1',1'-dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona

La síntesis de este compuesto se basa en el procedimiento descrito en el ejemplo 4 siguiendo las condiciones de reacción detalladas a continuación: 7-(1',1'-dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-c]pirazol-9-ol (0,025 g, 0,07 mmol), ácido *o*-iodoxibenzoico (0,038 g, 0,1 mmol). Eluyente Hex/AcOEt (1:1). Rto.: 24 % Sólido rojo, P.f.: 86,1 °C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 7,28 (s, 1H, 3-H); 6,73 (s, 1H, 6-H); 3,89 (s, 3H, NCH₃); 1,64 (s, 6H, OC(CH₃)₂); 1,57 (sa, 2H, 2'-H); 1,29 (s, 6H, C(CH₃)₂); 1,22-1,18 (m, 6H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 1,10-1,03 (m, 2H, 6'-H); 0,81 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, 7'-H) ppm. HPLC/MS*: Gradiente: 80% A a 100% A; EM (ES⁺) m/z: 371 (88%) [M+H]⁺; *t_R*: 2,07 min. Anal.: C₂₂H₃₀N₂O₃ (370,49 g/mol) Teórico: C, 71,32%; H, 8,16%. Hallado: C, 71,19%; H, 7,82%.

Ejemplo 3- Preparación y obtención de 7-(1',1'-dimetilheptil)-1-etil-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona

La síntesis de este compuesto se basa en el procedimiento descrito en el ejemplo 4 siguiendo las condiciones de reacción detalladas a continuación: 7-(1',1'-dimetilheptil)-1-etil-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-9-ol (0,020 g, 0,05 mmol), ácido *o*-iodoxibenzoico (0,022 g, 0,08 mmol). Eluyente Hex/AcOEt (4:1). Rto.: 20 % Sólido rojo, P.f.: 94,8 °C. ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 7,49 (s, 1H, 3-H); 7,11 (s, 1H, 6-H); 4,04 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H, NCH₂CH₃);

1,49 (s, 6H, OC(CH₃)₂); 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, NCH₂CH₃); 1,30-1,26 (m, 2H, 2'-H); 1,22 (s, 6H, C(CH₃)₂); 1,19 (sa, 6H, 3'-H, 4'-H, 5'-H); 1,03 (sa, 2H, 6'-H); 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, 7'-H) ppm. HPLC/MS*: Gradiente: 80% A a 100% A; EM (ES⁺) *m/z*: 385 (94%) [M+H]⁺; *t_R*: 3,87 min. Anal.: C₂₃H₃₂N₂O₃ (384,51 g/mol) Teórico: C, 71,84%; H, 8,39%. Hallado: C, 71,93%; H, 8,06%.

5

* Para todos los datos de HPLC/MS las fases móviles empleadas son: A (MeCN + 0,08% ácido fórmico) y B (H₂O + 1% ácido fórmico). El gradiente utilizado viene indicado en cada caso, en 5 minutos a un flujo de 0,25 mL/min y $\lambda = 254$ nm.

10

Ensayos biológicos

1. Afinidad por los receptores cannabinoides.

15 En la presente invención se valoró la actividad cannabinoide de los compuestos de fórmula (I) llevando a cabo ensayos *in vitro* de desplazamiento del radioligando cannabinoide [³H]-CP55940 (10 μM) y [³H]-WIN 55,212-2 (50 μM) en células transfectadas por los receptores humanos CB2 o CB1. A continuación se proporciona las constantes de afinidad de los compuestos de los ejemplos 1, 2 y 3 de la presente invención a modo de ilustración:

20

- 7-(1',1'-Dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-*c*]pirazol-8,9-diona (Ejemplo 1) *K_i* = 398 ± 49 nM (CB2) y *K_i* > 40 μM (CB1);

- 7-(1',1'-Dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-*c*]pirazol-8,9-diona (Ejemplo 2) *K_i* = 567 ± 77 nM (CB2) y *K_i* > 40 μM (CB1);

25

- 7-(1',1'-Dimetilheptil)-1-etil-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-*c*]pirazol-8,9-diona (Ejemplo 3) *K_i* = 520 ± 26 nM (CB2) y *K_i* > 40 μM (CB1).

2. Efecto antiproliferativo y mecanismo de acción.

30

En la presente invención se valoró la actividad antiproliferativa de los compuestos de fórmula (I) llevando a cabo ensayos *in vitro* en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo altamente invasivo MDA-MB-231 utilizando los métodos descritos a continuación.

2.1. Métodos.

35

Mantenimiento y cultivo celular. Se utilizó la línea de células tumorales MDA-MB-231, derivada de cáncer de mama humano triple negativo (carecen de expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y receptores con actividad tirosina quinasa Her2). El cultivo se realizó en medio DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Doce horas antes de tratar con los compuestos se cambió el medio de cultivo a DMEM sin FBS.

40

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos de la presente descripción sobre células no tumorales se utilizó la línea de células epiteliales mamarias normales humanas (HMEC). El cultivo se llevó a cabo en medio MEM libre de FBS (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) según las instrucciones del fabricante. Todas las células se mantuvieron en ambiente húmedo, a 37°C y con un 5% de CO₂.

45

Test de proliferación celular. Tras el tratamiento de las células con los diferentes compuestos, éstas se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a 37°C en oscuridad durante 2h. Posteriormente los cristales se solubilizaron con 100 μl de isopropanol ácido y agitación suave. Una vez que la coloración era homogénea se valoraron las distintas absorbancias a 570 nm con un espectrofotómetro de placa. La medida de

50

absorbancia obtenida en el pocillo control se consideró como el 100% de células vivas, y por lo tanto los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato.

5 **Análisis mediante Western blot.** Las células procedentes de la línea tumoral de adenocarcinoma humano MDA-MB-231, previamente tratadas con el compuesto ejemplo 3 de la presente descripción, fueron lisadas utilizando tampón de lisis (formado por: tris-HCl 50 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM; NaF 50 mM; pirofosfato de sodio 5 mM; ortovanadato de sodio 1 mM; Tritón X-100 al 0,1%; leupeptina 1 µg/mL; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM y β-glicerofosfato de sodio a pH 7,5 suplementado con PMSF 200 µM, microcistina 200 µM y β-mercaptoetanol 200 µM). Para determinar la concentración de proteína total en cada muestra se realizó el ensayo colorimétrico de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (medición de absorbancia a 595 nm). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, 12% de acrilamida). A continuación, fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) que se incubó con una disolución de anticuerpo: anti-caspasa-3 activa (1:500) y anti-β-actina (1:1000) como control de carga.

2.2. Resultados.

20 Se presentan a continuación y a modo ilustrativo, los resultados obtenidos para los compuestos de la presente invención:

7-(1',1'-dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona (ejemplo 1)

7-(1',1'-dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona (ejemplo 2) y

7-(1',1'-dimetilheptil)-1-etil-2,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona (ejemplo 3)

25 **Acción antiproliferativa en línea celular tumoral de mama MDA-MB-231.** El efecto de los compuestos ejemplos 1, 2 y 3 sobre la viabilidad celular se analizó utilizando la línea celular derivada del tumor humano de mama agresivo triple negativo MDA-MB-231. Este tipo de tumores se caracterizan por su falta de expresión de receptores de estrógeno, receptores de progesterona y receptores Her2 y tienen peor prognosis que otros subtipos moleculares de dicha patología. Como se observa en la figura 1, los tres compuestos ejemplos 1, 2 y 3 de la presente invención mostraron capacidad antiproliferativa en esta línea celular destacando el compuesto ejemplo 3 de la presente patente como el más eficaz con una CI50 de 3 µM. Los compuestos de los ejemplos 1 y 2 también presentan efectividad en el rango micromolar con concentraciones inhibitorias medias de 8,61 y 5,22 µM respectivamente. Asimismo, se realizó un estudio cinético de la viabilidad celular del compuesto ejemplo 3 a la dosis correspondiente a su CI50 a 24, 48 y 72 h. Se observó una inhibición celular del 50% sin cambios significativos desde las 24h.

40 **Citotoxicidad frente a células mamarias normales.** La citotoxicidad selectiva sobre células tumorales frente a células normales es esencial en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. Por ello, se evaluó la viabilidad de células epiteliales mamarias normales humanas (HMEC) 48 h después de ser tratadas con dosis crecientes (de 0,5-30 µM) del compuesto ejemplo 3. A las dosis evaluadas el compuesto no indujo muerte significativa (CI50>10 µM) indicando baja toxicidad frente a estas células siendo por tanto selectivo para las tumorales (figura 2).

50 **Dianas de los compuestos.** Con el fin de profundizar en los mecanismos celulares mediante los cuales el compuesto 3 fue capaz de inducir muerte celular en la línea tumoral de mama triple negativa, se desarrolló el siguiente estudio de viabilidad celular. Células MDA-MB-231 fueron tratadas con el antagonista CB1 SR141716 (SR1, también denominado Rimonabant), el antagonista CB2 SR144528 (SR2), el antioxidante α-tocoferol o el antagonista GPR55 CID16020046 en ausencia o presencia del compuesto ejemplo 3 (6 µM). Tras 48h de

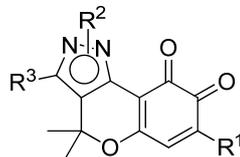
5 incubación, se determinó la viabilidad celular mediante ensayos MTT. El antagonista CB2 y el antioxidante fueron capaces de prevenir significativamente la caída en viabilidad celular inducida por el compuesto ejemplo 3 (figura 3). Estos resultados indican que el efecto antiproliferativo de la cromenopirazoldiona analizada está mediado por un mecanismo que implica la generación de estrés oxidativo e involucra a los receptores cannabinoides CB2.

10 **Mecanismo molecular del efecto antiproliferativo.** Para caracterizar el tipo de muerte celular inducida por el compuesto 3 de la presente descripción se procedió al análisis mediante Western Blot de un biomarcador de apoptosis (figura 4). Se observó un aumento significativo de los niveles de caspasa 3 activa en las células tratadas con el ejemplo 3 de la presente patente indicando que éste provoca la muerte de las células tumorales por apoptosis.

15 Estos resultados indican que las quinonas derivadas de cannabinoides reivindicadas en la presente invención exhiben un efecto antitumoral sobre la línea de adenocarcinoma de mama hormono-independiente altamente invasivo MDA-MB-231. Este efecto es especialmente interesante en el caso del compuesto ejemplo 3 de la presente patente porque además de su elevada eficacia mostró ser selectivo frente a células epiteliales mamarias normales humanas. Por tanto, los resultados aquí mostrados indican que los compuestos reivindicados en la presente descripción podrían tener aplicaciones terapéuticas como agentes antitumorales.
20 Además es muy importante resaltar que se trata de agentes antitumorales con efectos citotóxicos reducidos en células normales

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I)



Fórmula (I)

donde,

R^1 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_{18} , cicloalquilo C_3-C_7 , heterocicloalquilo C_3-C_7 , alqueno C_2-C_{18} , -O-alquilo C_1-C_5 , arilo C_5-C_{18} y heteroarilo C_5-C_{18} , opcionalmente sustituidos, halógeno, -CN, -NO₂, -N(R⁴)₂, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R₄;

R^2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_{18} , cicloalquilo C_3-C_7 , heterocicloalquilo C_3-C_7 , alqueno C_2-C_{18} , arilo C_5-C_{18} y heteroarilo C_5-C_{18} , opcionalmente sustituidos;

R^3 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_{18} , cicloalquilo C_3-C_7 , heterocicloalquilo C_3-C_7 , alqueno C_2-C_{18} , arilo C_5-C_{18} y heteroarilo C_5-C_{18} , opcionalmente sustituidos, -CN, NO₂, -N(R⁴)₂, -COR⁴, -COOR⁴, -CON(R⁴)₂ y -SO₂R₄;

R^4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_7 , heterocicloalquilo C_3-C_7 , alqueno C_2-C_5 , arilo C_5-C_{18} y heteroarilo C_5-C_{18} , opcionalmente sustituidos;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, donde

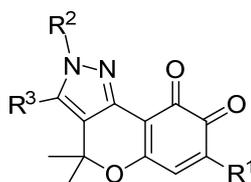
R^1 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_{18} , cicloalquilo C_3-C_7 y alqueno C_2-C_{18} , opcionalmente sustituidos;

R^2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_{18} , cicloalquilo C_3-C_7 , alqueno C_2-C_{18} y arilo C_5-C_{18} , opcionalmente sustituidos;

R^3 se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_7 y alqueno C_2-C_5 , opcionalmente sustituidos;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto según la reivindicación anterior, de fórmula general (II)



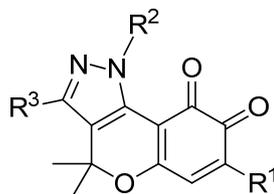
Fórmula (II)

donde R^1 , R^2 y R^3 se definen como en la reivindicación 2;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

4. Un compuesto según la reivindicación 2, de fórmula general (III)



10

Fórmula (III)

donde R^1 , R^2 y R^3 se definen como en la reivindicación 2;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R^3 se selecciona entre hidrógeno y alquilo C_1 - C_{18} opcionalmente sustituido.

6. Un compuesto según la reivindicación anterior donde R^3 es hidrógeno.

20

7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R^1 es un alquilo C_1 - C_{18} opcionalmente sustituido.

8. Un compuestos según la reivindicación anterior donde R^1 se selecciona entre metilo, etilo, propilo, butilo, hexilo, heptilo y 1,1-dimetilheptilo.

25

9. Un compuesto según la reivindicación anterior donde R^1 es 1,1-dimetilheptilo.

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde R^2 es un grupo seleccionado entre hidrógeno y alquilo C_1 - C_{18} opcionalmente sustituido.

30

11. Un compuesto según la reivindicación anterior donde R^2 se selecciona entre hidrógeno, metilo, etilo y propilo.

12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se selecciona del grupo que consiste en:

35

a) 7-(1',1'-dimetilheptil)-1,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;

40

b) 7-(1',1'-dimetilheptil)-2,4-dihidro-2,4,4-trimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;

c) 7-(1',1'-dimetilheptil)-1-etil-2,4-dihidro-4,4-dimetilcromeno[4,3-c]pirazol-8,9-diona;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y al menos un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Composición según la reivindicación anterior que además comprende otro principio activo.

5 15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un medicamento.

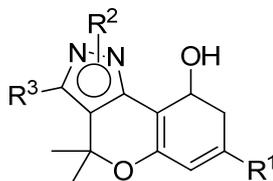
10 16. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o un tumor maligno.

17. Uso según la reivindicación anterior donde el cáncer o tumor maligno se selecciona entre carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, mieloma y melanoma.

15 18. Uso según la reivindicación anterior donde el carcinoma se selecciona entre cánceres de mama sensibles a hormonas (ER+/PR+), cánceres de mama Her2 positivos y cáncer de mama triple negativo.

20 19. Uso según la reivindicación anterior donde el cáncer de mama es el cáncer de mama triple negativo.

25 20. Un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula general (I), caracterizado porque comprende una reacción de oxidación de un compuesto de fórmula general (IV) con ácido *o*-yodoxibenzoico



Fórmula (IV)

30 donde los sustituyentes R¹, R² y R³ se definen como en la reivindicación 1.

FIG.1-A

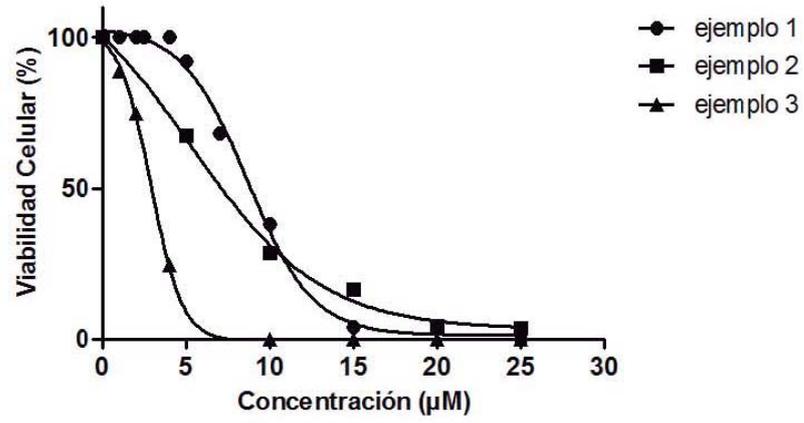


FIG.1-B

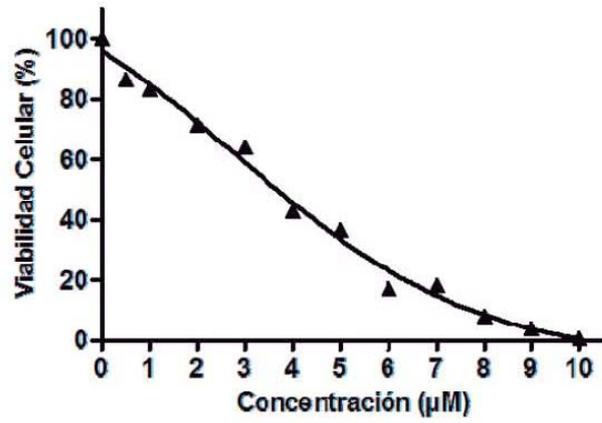


FIG.2

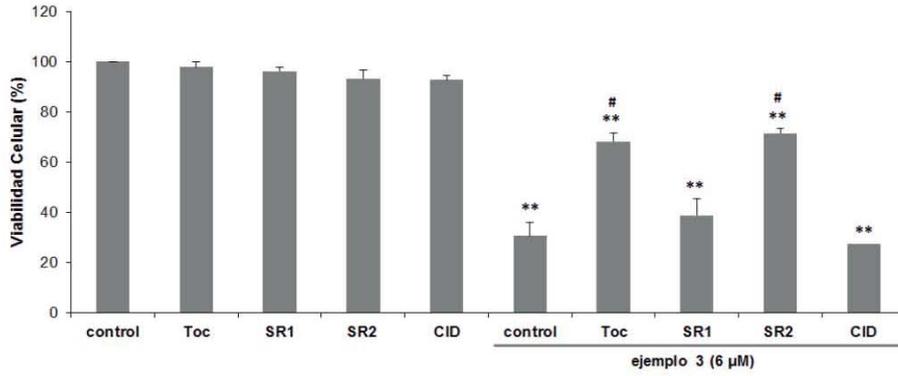


FIG.3

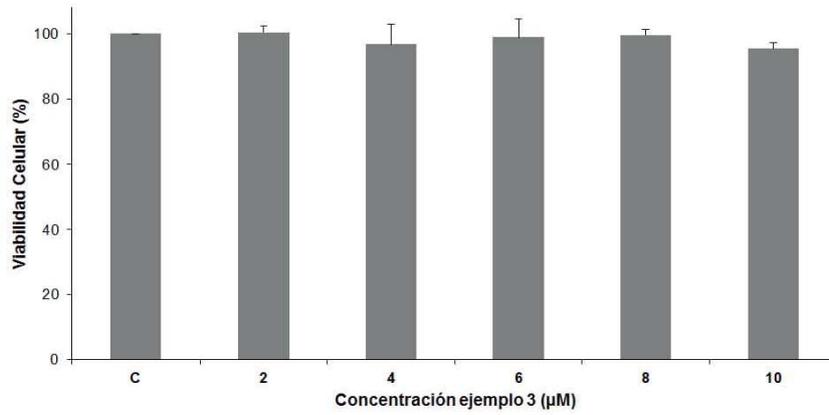


FIG.4-A

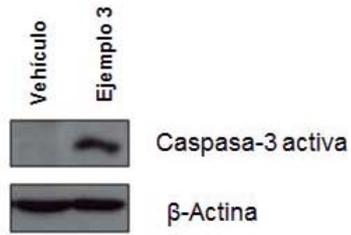


FIG.4-B

