



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 335 849**

② Número de solicitud: 200802811

⑤ Int. Cl.:

C07D 311/74 (2006.01) **A61K 31/353** (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) **A61P 3/10** (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **03.10.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2010**

Fecha de la concesión: **10.03.2011**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **22.03.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
22.03.2011

⑦ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Castellanos Santamaría, Esther;**
Rial Zueco, Eduardo;
Viso Beronda, Alma y
Fernández de la Pradilla Sáinz de Aja, Roberto

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Derivados de cromano y sus usos como inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes.**

⑦ Resumen:

Derivados de cromano y sus usos como inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes.

Compuestos derivados del cromano, que presentan la fórmula general (I), donde R¹ y R², son iguales o diferentes entre sí, y están representados por un átomo de hidrógeno (H) o un grupo alquilo (C₁-C₈); R³ está representado por un átomo de H, un halógeno, un grupo arilo o un grupo -COOR⁵; donde R⁵ es alquilo (C₁-C₄) o un alquilarilo; y R⁴ está representado por un átomo de hidrógeno (H), un grupo alquilarilo o un grupo alquilo (C₁-C₈), lineal o ramificado. Así como sus diferentes usos, más concretamente en la identificación de compuestos terapéuticos, como compuestos reguladores de las proteínas desacoplantes o su uso terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias que cursen con un aumento en la actividad de dichas proteínas.

ES 2 335 849 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Derivados de cromano y sus usos como inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes.

5 La presente invención se refiere a una serie de compuestos derivados del cromano, así como sus diferentes usos, más concretamente en la identificación de compuestos terapéuticos, como compuestos reguladores de las proteínas desacoplantes o su uso terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias que cursen con un aumento en la actividad de dichas proteínas como son el cáncer, la caquexia, la diabetes no dependiente de insulina, las infecciones o la fiebre.

10

Estado de la técnica

15 Las “especies reactivas de oxígeno” (ROS) son moléculas muy reactivas debido a que tienen un electrón no apareado (radical libre) como el ión superóxido o el radical hidroxilo. Se incluyen en esta denominación las moléculas precursoras de los radicales libres, como por ejemplo el H₂O₂. Las ROS son un subproducto más del metabolismo oxidativo, siendo la acción de la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, el citocromo P450 y la cadena transportadora de electrones de la mitocondria las fuentes de ROS más significativas. Las ROS participan en procesos fisiológicos, actuando en muchos casos como señales intracelulares [D’Auréaux B, Toledano MB (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8:813-24]. En situaciones fisiológicas normales hay un equilibrio entre la producción de ROS y su inactivación mediante los mecanismos celulares de defensa frente al estrés oxidativo, en los que intervienen moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (tales como glutatión y vitamina E) y enzimas como la catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, que inactivan las ROS. Además, un aumento de la actividad de la cadena respiratoria también mitiga la producción mitocondrial de ROS. Cuando se rompe este equilibrio se produce el estrés oxidativo. Este genera una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que son la base de muchos procesos patológicos y que pueden originar incluso la muerte celular. El daño celular ocurre a varios niveles, siendo los más importantes la alteración del ADN mitocondrial, la peroxidación lipídica y la modificación covalente de proteínas.

30 El uso de agentes que provocan un aumento en la producción de ROS es una estrategia que se ha explotado de modo satisfactorio en la terapia contra el cáncer. Este objetivo se puede conseguir mediante dos aproximaciones: (i) induciendo directamente la generación de ROS en la célula tumoral o (ii) inhibiendo los sistemas de defensa. Entre los agentes químicos utilizados para esta estrategia están la procarbazona, vinblastina, doxorubicina, metotexafina, camptotecina, neocarzinostatina, y el cisplatino [Renschler MF (2004) The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. Eur. J. Cancer 40:1934-1940; y Ozben T (2007) Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. J. Pharm. Sci. 96:2181-2196].

40 La respiración celular es un proceso mitocondrial de oxidación de azúcares y grasas. La transferencia de electrones desde las moléculas que se están oxidando hasta el oxígeno tiene lugar en la membrana mitocondrial interna y se acopla a un bombeo de protones de dentro hacia afuera de la mitocondria, con lo que se forma un gradiente de protones. La energía almacenada en este gradiente es usada para la síntesis del ATP mediante la fosforilación oxidativa de su precursor. El ATP es la molécula universal que permite almacenar la energía y distribuirla luego a la fabricación de componentes celulares, el transporte de moléculas, la transmisión de señales, etc. Los dos procesos (respiración y síntesis de ATP) se encuentran acoplados, de modo que la velocidad de oxidación de sustratos (respiración) se ajusta a la demanda celular de ATP, evitando así que se malgasten las reservas energéticas.

50 Las proteínas desacoplantes (*uncoupling proteins*, UCP) son transportadores que pertenecen a la superfamilia formada por los transportadores mitocondriales de metabolitos, proteínas relacionadas evolutivamente y que presentan semejanzas estructurales y funcionales. La función de las UCP es disminuir la eficiencia de la fosforilación oxidativa, mediante una disipación controlada del gradiente de protones [Krauss S, Zhang CY & Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling protein homologues. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:248-261]. En mamíferos se han descrito cinco UCP, con una distribución anatómica específica para cada una de ellas.

55 La proteína desacoplante UCP1, exclusiva del tejido adiposo marrón de mamíferos, es la mejor conocida jugando un importante papel por ejemplo en el mantenimiento de la temperatura corporal en recién nacidos. Cuando la UCP1 es activada por ácidos grasos provoca que los protones vuelvan al interior de la mitocondria sin que haya síntesis de ATP. Se acelera, por tanto, la respiración, pero la energía del gradiente de protones se disipa en forma de calor [Nicholls DG, & Locke RM (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol. Rev. 64: 1-64]. La actividad transportadora es inhibida por los nucleótidos de purina que se unen en el interior de la proteína, a la que acceden desde la cara expuesta al espacio intermembranar. El sitio de unión de esos nucleótidos aún no se conoce con detalle, pero los datos disponibles sugieren que el anillo de purina interacciona con los *loops* (lazos) que cierran por el lado matricial el barril formado por las regiones transmembrana de la proteína [Ledesma A *et al.* (2002) Modeling the transmembrane arrangement of the uncoupling protein UCP1 and topological considerations of the nucleotide-binding site. J Bioenerg Biomembr. 34:473-86].

65 La UCP2 se encuentra en numerosos tejidos y órganos y su función no está totalmente esclarecida. Sin embargo, hay numerosas evidencias de su papel en el control de la producción de ROS, constituyendo un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo basado en que la inducción del desacoplamiento entre respiración y síntesis de ATP

origina una aceleración de la respiración y esto provoca una reducción de la producción de ROS. [Krauss S, Zhang CY & Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling protein homologues. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:248-261]. El primer fenotipo que se describió en el ratón *knock-out* para la UCP2 fue unos mayores niveles de ROS en los macrófagos, lo cual confirió a estos ratones una mayor resistencia a la infección por toxoplasma [Arsenijevic D, *et al.* (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26:435-439]. En consonancia con este posible papel protector frente al daño por estrés oxidativo, se ha encontrado que UCP2 está implicada en procesos patológicos en los que las ROS juegan un papel importante para el desarrollo de la enfermedad (aterosclerosis, cáncer e inflamación crónica) [Nübel T & Ricquier D (2006) Respiration under control of uncoupling proteins: clinical perspective. *Hormone Res.* 65:300-310].

El papel protector de UCP2 frente al daño por estrés oxidativo es relevante para el tratamiento del cáncer, ya que en muchos casos la aparición de células tumorales resistentes a la quimioterapia está asociada con su capacidad de defensa frente al estrés oxidativo [Benhar M, Engelberg D & Levitzki A (2002) ROS, stress-activated kinases and stress signalling in cancer. *EMBO Rep.* 3:420-425 y Derdak Z *et al.* (2008) The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res.* 68:2813-2819], Existen datos que demuestran una mayor síntesis de UCP2, acompañada de una mayor protección frente al estrés oxidativo, en sublíneas de células tumorales resistentes a quimioterapia [Harper ME, *et al.* (2002) Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J.* 16:1550-1557], Asimismo, se ha encontrado aumento de la expresión de UCP2 en cáncer de colon [Horimoto M, *et al.* (2004) Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 10:6203-6207] y que esta mayor síntesis está asociada a una respuesta al estrés oxidativo [Derdák Z, *et al.* (2006) Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF- κ B activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 27:956-961], Además, se ha demostrado que un aumento de la expresión de la UCP2 en la línea celular de hematoma HepG2 disminuye el daño por estrés oxidativo y hace las células más resistentes a la apoptosis [Jones CP, *et al.* (2005) Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis. *Liver Int.* 25:880-887].

Por otra parte, el cáncer es una causa de la caquexia, un proceso multifactorial que provoca un incremento del gasto energético, anorexia, pérdida de las reservas de grasa y degradación proteica, y conlleva una severa pérdida de peso que es, en muchos casos, la causa de la muerte del enfermo de cáncer. La zinc-a2-glicoproteína (ZAG), segregada por los tumores caquéticos, promueve la oxidación de las reservas de lípidos y provoca un aumento en los niveles de UCP2 en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado así como en los de UCP3 en músculo [Bing C *et al.* (2002) Expression of uncoupling proteins-1 -2 and -3 mRNA is induced by adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br. J. Cancer* 86: 612-618; y Sanders PM & Tisdale MJ (2004) Effect of zinc-a2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Lett.* 212: 71-81]. Las UCP podrían estar jugando un doble papel en este proceso: actuar como vías disipadoras de energía y como mecanismo de protección frente al estrés oxidativo que se origina por la alta oxidación lipídica.

Las UCP pueden por tanto ser dianas farmacológicas para el tratamiento del cáncer y para mitigar los efectos de la caquexia tumoral. El desarrollo de inhibidores de su actividad desacoplante serviría para potenciar el efecto antitumoral de todos aquellos agentes que actúan aumentando el estrés oxidativo y también contrarrestaría el efecto del aumento en los niveles de UCP2 en los tumores caquéticos.

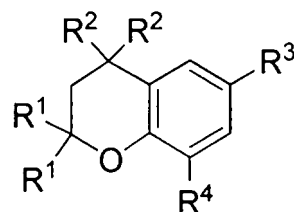
Además de los nucleótidos de purina, que son los inhibidores naturales de las UCP, se ha descrito un compuesto natural, la genipina, que actúa como inhibidor de la UCP2 en células beta pancreáticas [Zhang CY, *et al.* (2006) Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metabolism* 3:417-427 y Zhang CY, *et al.* (2008) Genipin derivatives and uses thereof. Publicación US2008/0009450 A9]. Este compuesto se obtiene a partir de extractos de los frutos de la planta *Gardenia jasmonides* Ellis, que han sido utilizados en la medicina tradicional china para tratar una variedad de patologías, incluida la diabetes tipo 2. La relación entre UCP2 (como modulador de la secreción de insulina) y la diabetes tipo 2 está bien establecida [Zhang CY, *et al.* (2001) Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105:745-755]. Aunque la citotoxicidad de la genipina es baja, puede causar estrés oxidativo e inducir apoptosis [Kim BC, *et al.* (2005) Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochem Pharmacol.* 70:1398-407].

Descripción de la invención

En la presente invención se describen una serie de compuestos derivados del cromano. Dichos compuestos han sido caracterizados como inhibidores de la actividad transportadora de la UCP1 tras un primer cribado realizado en levaduras y validados posteriormente como inhibidores de la UCP2 utilizando células tumorales. Estos compuestos pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades y dolencias en las que hay un aumento en los niveles y/o actividad de las UCPs como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el cáncer, la caquexia tumoral, la diabetes no dependiente de insulina, las infecciones o la fiebre.

ES 2 335 849 B1

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a compuestos derivados del cromano, que presentan la fórmula general (I), sus enantiómeros, y cualquiera de sus sales aceptables farmacéuticamente (a partir de ahora compuestos de la invención):



(I)

Donde:

R¹ y R², son iguales o diferentes entre sí, y están representados por un átomo de hidrógeno (H) o un grupo alquilo (C₁-C₈);

R³ está representado por un átomo de H, un halógeno, un grupo arilo o un grupo -COOR⁵; donde R⁵ es alquilo (C₁-C₄) o un alquilarilo; y

R⁴ está representado por un átomo de hidrógeno (H), un grupo alquilarilo o un grupo alquilo (C₁-C₈), lineal o ramificado.

Una realización preferida de los compuestos de la invención comprende derivados 2,2-alquilocromanos, donde R¹ es un grupo alquilo (C₁-C₄), más preferiblemente un grupo metilo, y R² es H.

Otra realización preferida de los compuestos de la invención comprende derivados 4,4-alquilocromanos, donde R¹ es H y R² es un grupo alquilo (C₁-C₄), más preferiblemente R² es un grupo metilo.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono.

El término "arilo" se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 12 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo.

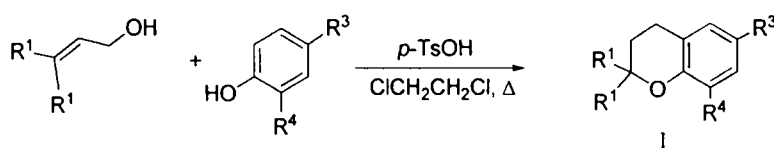
Por "arilalquilo" se entiende en la presente invención a un grupo arilo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo. Un ejemplo, no limitante, de arilalquilo es un grupo bencilo.

Por "halógeno" se entiende en la presente invención a un átomo de bromo, cloro, yodo o flúor.

Otra realización preferida de la presente invención comprende cualquiera de los compuestos de fórmula: 8-isopropil-2,2-dimetilcromano; 6-bromo-8-etil-2,2-dimetilcromano; 6-bromo-2,2-dimetil-8-propil-cromano; 6-bromo-8-isopropil-2,2-dimetilcromano; 6-bromo-8-*tert*-butil-2,2-dimetilcromano; 6-bromo-8-isopropil-4,4-dimetilcromano; 6-fenil-8-isopropil-2,2-dimetilcromano; 8-isopropil-2,2-dimetilcromano-6-carboxilato de etilo; ó 4,4-dimetilcromano-8-isopropil-6-carboxilato de etilo.

Los compuestos de la invención, de fórmula general (I), en los que R¹ es alquilo (C₁-C₈), R² es H, y R³ es H ó halógeno se obtienen por reacción de un alcohol alílico con un fenol en presencia de una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (Esquema 1).

Esquema 1



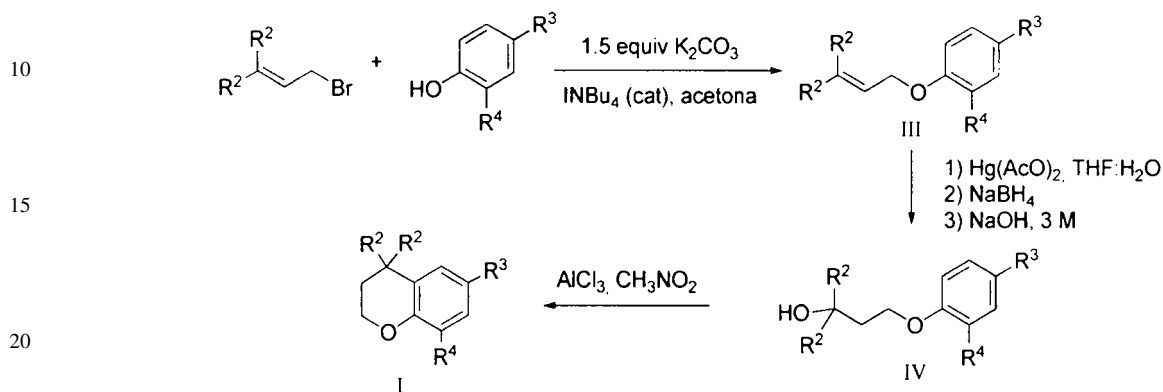
La síntesis de los compuestos de la invención, de fórmula general (I), en los que R¹ es H, R² es alquilo (C₁-C₈) y R³ es H o halógeno se puede llevar a cabo en una secuencia de tres pasos (Esquema 2). El primer paso es la reacción

ES 2 335 849 B1

entre un bromuro alílico (a) y un fenol (b) en presencia de una base, que produce un aril alil eter (c). La transformación de (c) en (d) se realiza por tratamientos consecutivos con acetato de mercurio, borohidruro sódico y finalmente NaOH. En el tercer paso, (d) cicla en presencia de tricloruro de aluminio, dando lugar a los derivados de cromano de fórmula general (I) en los que R² es alquilo (C₁-C₈) y R³ es H o halógeno.

5

Esquema 2

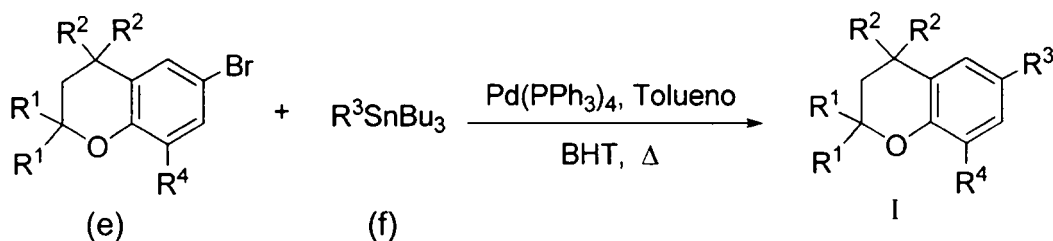


25 Los compuestos de fórmula general (I) en los que R³ es arilo se preparan por reacción de los bromo cromanos (e) (siendo R³ = Br) con arilestannanos (f) y un catalizador de paladio, en presencia de cristales de BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) en tolueno (Esquema 3).

Esquema 3

30

35

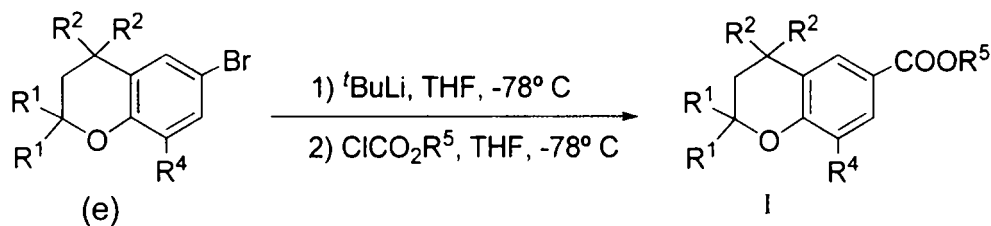


40 Los compuestos de fórmula general (I) en los que R³ = -COOR⁵ se preparan por reacción de los bromo cromanos (e) (siendo R³ = Br) con *tert*-butillitio en tetrahidrofurano a 78°C [1], seguido por adición del un electrófilo adecuado, por ejemplo un cloroformiato [2] (Esquema 4).

Esquema 4

45

50



55

Los compuestos de la invención pueden tener las siguientes aplicaciones o usos:

- reguladores de la actividad de las proteínas desacoplantes;
- 60 - reguladores del consumo de oxígeno celular modulando la actividad respiratoria mitocondrial;
- reguladores de la producción de ROS, a través de la modulación de la actividad de las proteínas desacoplantes;
- tratamiento de patologías asociadas a un aumento de la actividad de las proteínas desacoplantes;
- 65 - inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes en el tratamiento de enfermedades como el cáncer;

ES 2 335 849 B1

- inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes en el tratamiento de enfermedades como la diabetes no dependiente de insulina;
- inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes en el tratamiento de enfermedades en las que se necesite aumentar la producción de radicales libres en los macrófagos para combatir las infecciones; o
- inhibidores de la actividad de las proteínas desacoplantes en el tratamiento de enfermedades como la caquexia y dolencias como la fiebre.

10 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica. Preferiblemente, la composición farmacéutica es capaz de inhibir la actividad desacopladora de las proteínas desacoplantes.

15 Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades y/o dolencias en las que hay un aumento en los niveles y/o actividad de las proteínas UCP, como por ejemplo, no limitante, cualquiera del grupo que comprende el cáncer, la caquexia tumoral, la diabetes no dependiente de insulina, las infecciones o la fiebre.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención en cantidad terapéuticamente efectiva, o mezclas de los mismos, una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

25 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, la edad y estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

40 Descripción de las figuras

Figura 1.- Comparación del efecto inhibitor del nucleótido GDP (guanidin-difosfato) y del derivado de cromano E379 en mitocondrias aisladas de *Sacharomyces cerevisiae* transformada para que exprese la proteína desacoplante UCP1. Fig. 1A.- Disminución de la fluorescencia del NADH con el tiempo debido a su oxidación por las mitocondrias. Fig. 1B.- Consumo de NADH. En ambas figuras se representan los resultados obtenidos en situación basal (control) en presencia del activador palmitato (círculos), tras la adición del inhibidor GDP a una concentración de 100 μM (triángulos negros hacia abajo) y tras la adición de compuesto E379 a una concentración de 20 μM (triángulos blancos hacia arriba).

50 Figura 2.- Efectos de distintos compuestos derivados de cromano a distintas concentraciones (0, 2, 20 y 125 μM) sobre la respiración de mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* transformadas con un vector con el que no se expresa ninguna proteína recombinante (círculo negro) y transformadas para que expresen UCP1 (cuadrados).

55 Figura 3.- Actividad inhibitora de compuestos derivados de cromano. Se representa la EC_{50} para la inhibición de la actividad de la UCP1 determinada a partir de la velocidad de oxidación de NADH en mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* transformadas para que expresen UCP1 a la que se sustrajo el efecto de los mismos compuestos observado en mitocondrias de *S. cerevisiae* no transformadas. En todos los casos, las concentraciones de inhibidor usadas para el cálculo de la EC_{50} fueron 0, 2, 20, 125 y 250 μM . Las barras cortadas representan valores de EC_{50} mayores de 200 μM .

60 Figura 4.- Efecto del compuesto E379 sobre la supervivencia de las células de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, tratadas con trióxido de arsénico. Fig. 4A.- Inmunodetección de la proteína desacoplante UCP2 en extractos mitocondriales obtenidos a partir de cultivos de la línea celular Caco-2. Como control se muestra la señal obtenida con mitocondrias extraídas de bazo. Fig. 4B.- Efecto del compuesto E379 sobre la viabilidad de las células de la línea Caco-2 tratadas durante 24 horas con distintas concentraciones de trióxido de arsénico en ausencia (círculos) o en presencia (cuadrados) del compuesto E379 a una concentración de 50 μM .

Ejemplos de realización de la invención

La presente invención se describe adicionalmente en conexión con los siguientes ejemplos no limitantes.

5

Ejemplo 1*Síntesis de 2,2-dimetilcromanos*

10 El procedimiento general es la adición gota a gota de 3-metil-2-buten-1-ol a una disolución de un fenol y ácido *p*-toluensulfónico en 1,2-dicloroetano (3,5 mL/mmol) y posterior calentamiento a 80°C hasta la completa desaparición del sustrato de partida. Posteriormente se hidroliza la mezcla con disolución saturada de NaHCO₃ (1,5 mL/mmol) y H₂O (2 mL/mmol) y se separan las fases. Se extrae la fase acuosa con Et₂O, se secan las fases orgánicas reunidas con MgSO₄ anhidro, y se filtran y concentran a presión reducida para dar lugar a un crudo de reacción del que, tras
15 purificación cromatográfica en gel de sílice, se obtiene el 2,2-dimetilcromano.

Síntesis de 8-isopropil-2,2-dimetilcromano (E155)

20 A partir de 2-isopropilfenol (0,41 mL, 3,0 mmol), 3-metil-2-buten-1-ol (0,10 mL, 1,0 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (9,5 mg, 0,05 mmol) siguiendo el procedimiento general (2 h) se obtuvo un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano 1-5%) condujo a 91 mg (0,45 mmol, 45%) de E 155 como un aceite amarillo.

25 **Datos de E155:** $R_f = 0,58$ (EtOAc/Hex, 10%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,21 (d, 6 H, $J = 7,1$ Hz), 1,34 (s, 6 H), 1,79 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₃), 2,79 (t, 2 H, $J = 6,7$ Hz, H₄), 3,27 (sept, 1 H, CH), 6,79 (t, 1 H, $J = 7,4$ Hz, H₆), 6,91 (d, 1 H, $J = 7,8$ Hz, H₅), 7,04 (d, 1 H, $J = 7,4$ Hz, H₇). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 22,4 (2 C), 22,7, 26,9 (2 C), 27,0, 32,7, 73,7, 119,1, 120,3, 123,6, 126,8, 136,5, 151,1. EM (API-ES): 205 [M+H]⁺. IR (película): 2972, 2928, 2866, 1591, 1453, 1444, 1368, 1240, 1219, 1199, 1157, 1123, 942, 746 cm⁻¹.

30

Síntesis de 6-bromo-8-etil-2,2-dimetilcromano (E225)

35 A partir de 4-bromo-2-etilfenol (402 mg, 2,0 mmol), 3-metil-2-buten-1-ol (0,41 mL, 4,0 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (57 mg, 0,3 mmol) siguiendo el procedimiento general (20 h) se obtuvo un crudo de reacción que tras purificación (usando hexano) condujo a 439 mg (1,64 mmol, 82%) de E225 como un aceite amarillo.

40 **Datos de E225:** $R_f = 0,42$ (EtOAc/Hex, 5%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,13 (t, 3 H, $J = 7,5$ Hz), 1,29 (s, 6 H), 1,74 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₃), 2,52 (c, 2 H, $J = 7,5$ Hz), 2,72 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₄), 7,01 (s, 1 H), 7,03 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 13,8, 22,5, 23,1, 26,9 (2 C), 32,4, 74,1 111,1, 122,5, 129,3, 129,3, 134,6, 150,8. EM (API-ES): 291 [M+Na]⁺, 270 [M+2]⁺, 268 [M]⁺. IR (película): 2974, 2932, 2873, 1456, 1369, 1239, 1201, 1157, 1123, 928, 866, 835 cm⁻¹.

Síntesis de 6-bromo-2,2-dimetil-8-propil-cromano (E221)

45 A partir de 4-bromo-2-propilfenol (430 mg, 2,0 mmol), 3-metil-2-buten-1-ol (0,41 mL, 3,5 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (38 mg, 0,2 mmol) siguiendo el procedimiento general (20 h) se obtuvo un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano, 0-10%) condujo a 487 mg (1,72 mmol, 86%) de E221 como un aceite amarillo.

50 **Datos de E221:** $R_f = 0,45$ (EtOAc/Hex, 5%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 0,90 (t, 3 H, $J = 7,3$ Hz), 1,28 (s, 6 H), 1,54 (sext, 2 H, $J = 7,6$ Hz), 1,74 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₃), 2,47 (t, 2 H, $J = 7,3$ Hz), 2,71 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₄), 7,00-7,02 (m, 2 H, H₇, H₅). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 13,9, 22,6, 22,7, 26,9 (2 C), 31,9, 32,5, 74,1, 110,9, 122,5, 129,3, 130,2, 133,1, 150,9. EM (IE): 284 [M+2]⁺, 282 [M]⁺, 227, 69 (100%). IR (película): 2959, 2926, 2867, 1456, 1382, 1369, 1240, 1201, 1157, 1123, 942 cm⁻¹.

55

Síntesis de 6-bromo-8-isopropil-2,2-dimetilcromano (E183)

60 A partir de 4-bromo-2-isopropilfenol (697 mg, 3,2 mmol), 3-metil-2-buten-1-ol (0,83 mL, 7,9 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (62 mg, 0,3 mmol) siguiendo el procedimiento general (40 h) se obtuvo un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano, 1%) condujo a 623 mg (2,2 mmol, 68%) de E183 como un aceite amarillo.

65 **Datos de E183:** $R_f = 0,44$ (EtOAc/Hex, 5%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 1,15 (d, 6H, $J = 6,8$ Hz), 1,29 (s, 6 H), 1,75 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₃), 2,76 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H₄), 3,19 (sept, 1 H, $J = 6,8$ Hz), 7,00 (s, 1 H, H₇), 7,07 (s, 1 H, H₅). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 22,3 (2 C), 22,6, 26,8 (2 C), 26,9, 32,4, 74,1, 111,5, 122,6, 126,7, 129,1, 138,9, 150,2. EM (API-ES): 285 [M+2]⁺, 284 [M+1]⁺, 283 [M]⁺. IR (película): 2973, 2926, 2871, 1459, 1441, 1240, 1200, 1159, 1123, 941, 863, 762 cm⁻¹. Anal, calcd para C₁₄H₁₉BrO: C = 59,37; H = 6,76, Br = 28,21. Encontrado: C = 59,60; H = 6,84, Br = 27,88.

ES 2 335 849 B1

Síntesis de 6-bromo-8-terc-butil-2,2-dimetilcromano (E231)

A partir de 4-bromo-2-terc-butilfenol (458 mg, 2,0 mmol), con 3-metil-2-buten-1-ol (0,31 mL, 3,0 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (38 mg, 0,2 mmol) siguiendo el procedimiento general (22 h) se obtuvo un crudo de reacción que tras purificación (usando hexano) condujo a 557 mg (1,87 mmol, 94%) de E231 como un aceite amarillo.

Datos de E231: $R_f = 0.46$ (EtOAc/Hex, 5%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,32 (s, 15 H), 1,75 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz, H_3), 2,74 (t, 2 H, $J = 6,9$ Hz, H_4), 7,03 (d, 1 H, $J = 2,4$ Hz), 7,15 (d, 1 H, $J = 2,2$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 22,9, 26,8 (2 C), 29,5 (3 C), 32,3, 34,9, 74,3, 111,3, 123,0, 127,4, 129,8, 140,2, 151,6. EM (IE): 298 $[\text{M}+2]^+$, 296 $[\text{M}]^+$, 281 $[\text{M}-15]^+$, 241 $[\text{M}-55]^+$, 225 $[\text{M}-71]^+$ (100%). IR (película): 2971, 2950, 2867, 1436, 1384, 1369, 1241, 1215, 1166, 1124, 938, 868, 715 cm^{-1} .

Ejemplo 2

Síntesis de 6-fenil-8-isopropil-2,2-dimetilcromano (E379)

A una disolución de 6-bromo-8-isopropil-2,2-dimetilcromano (47 mg, 0,17 mmol) en tolueno anhidro (6 mL/mmol), se añadió $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4 mg, 0,034 mmol) y BHT (2 cristales). La mezcla se agitó y se le añadió gota a gota feniltributylestannano (0,10 mL, 0,26 mmol). Se calentó a reflujo de tolueno (110°C) hasta observar la desaparición del producto de partida. Tras 16 h se eliminó el disolvente a presión reducida, se disolvió en EtOAc y se filtró en gel de sílice para dar lugar a un crudo que tras purificación con CH_2Cl_2 -hexano al 2%, condujo a 30 mg (0,11 mmol, 65%) de E379 como un aceite incoloro.

Datos de E379: $R_f = 0.28$ (EtOAc/Hex, 5%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,07 (d, 6 H, $J = 6,9$ Hz), 1,34 (s, 6 H), 1,81 (t, 2 H, $J = 6,6$ Hz, H_3), 2,83 (t, 2 H, $J = 6,9$ Hz, H_4), 3,29 (sept, 1H, $J = 7,3$ Hz), 7,12 (s, 1 H), 7,24 (m, 2 H), 7,37 (m, 2 H), 7,53 (d, 2 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 22,5 (2 C), 22,9, 27,0 (2 C), 27,1, 32,8, 74,0, 120,5, 122,8, 125,5, 126,2, 126,8 (2 C), 128,5 (2 C), 132,1, 136,8, 141,7, 150,9. EM (IE): 280 $[\text{M}]^+$ (100%), 265 $[\text{M}-15]^+$, 163 $[\text{M}-55]^+$. IR (película): 3056, 3026, 2927, 2926, 2867, 1600, 1573, 1464, 1368, 1252, 1216, 1188, 1158, 1123, 943, 877, 762, 697 cm^{-1} .

Ejemplo 3

Síntesis de 4,4-dimetilcromanos

Síntesis de 4-bromo-2-isopropilfenil 3-metilbut-2-en-1-il eter (intermedio c)

A una disolución de 4-bromo-2-isopropilfenol (851 mg, 3,9 mmol) en acetona anhidra (1,5 mL/mmol) se añadió K_2CO_3 (819 mg, 5,9 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (0,30 mmol) y 4-bromo-2-metil-2-buteno (0,6 mL, 4,7 mmol). La suspensión se agitó a temperatura ambiente hasta observar la desaparición del producto de partida. Después de 20 h se añadió una disolución saturada de ditionito de sodio y H_2O , se separaron las fases, se extrajo la fase acuosa tres veces con EtOAc, las fases orgánicas se secaron con MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron a presión reducida para dar lugar a un crudo de reacción que, tras purificación cromatográfica en gel de sílice (usando EtOAc-hexano, 2-4%) condujo a 890 mg (3,4 mmol, 93%) del producto puro, como un aceite incoloro.

Datos de 4-bromo-2-isopropilfenil 3-metilbut-2-en-1-il eter: $R_f = 0,52$ (EtOAc/Hex, 5%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,16 (d, 6 H, $J = 6,8$ Hz), 1,70 (s, 3 H), 1,76 (s, 3 H), 3,27 (sept, 1 H, $J = 6,9$ Hz), 4,47 (d, 2 H, $J = 6,6$ Hz), 5,44 (m, 1 H), 6,69 (d, 1 H, $J = 8,7$ Hz), 7,19-7,26 (m, 2 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 18,2, 22,5 (2 C), 25,7, 26,8, 65,3, 112,9, 113,4, 119,8, 128,9, 129,1, 137,5, 139,8, 155,1. EM (IE): 284 $[\text{M}+2]^+$, 282 $[\text{M}]^+$, 214 $[\text{M}-68]^+$, 199 $[\text{M}-83]^+$, 149 (100%). IR (película): 2964, 2926, 2865, 1485, 1447, 1342, 1239, 1189, 1003, 803 cm^{-1} .

Síntesis de 4-(4-bromo-2-isopropilfenoxi)-2-metilbutan-2-ol (intermedio d)

A una disolución de acetato de mercurio (1,06 g, 3,3 mmol) en THF: H_2O (1,0:1,5 mL/mmol) se añadió gota a gota una disolución de 4-bromo-2-isopropilfenil 3-metilbut-2-en-1-il eter (799 mg, 3,3 mmol) en THF (0,5 mL/mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta observar la desaparición del producto de partida. Después de 2 h 30 minutos se añadió NaOH 3 M (1,9 mL, 5,6 mmol), y una disolución de NaBH_4 (125 mg) en NaOH 3 M (1,4 mL, 4,3 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos, hasta observar la completa formación del producto, tras los cuales se diluyó con hexano y se hidrolizó con disolución saturada de NH_4Cl (3 mL/mmol) y H_2O (1,5 mL/mmol), se separaron las fases, la fase acuosa se extrajo dos veces con hexano y una vez con Et_2O . La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NH_4Cl , se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para dar lugar a un crudo de reacción que tras purificación cromatográfica en gel de sílice (usando EtOAc-hexano, 5-50%) condujo a 506 mg (1,7 mmol, 51%) del producto puro, como un aceite incoloro.

ES 2 335 849 B1

Datos de 4-(4-bromo-2-isopropilfenoxi)-2-metilbutan-2-ol: $R_f = 0,32$ (EtOAc/Hex, 25%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,14 (d, 6 H, $J = 6,8$ Hz), 1,28 (s, 6 H), 1,96-1,99 (m, 2 H), 3,19 (sept, 1 H, $J = 6,8$ Hz), 4,05-4,11 (m, 2 H), 5,25 (s, OH), 6,69 (d, 1 H, $J = 8,5$ Hz), 7,19 (dd, 1 H, $J = 8,5, 2,4$ Hz), 7,24 (d, 1 H, $J = 2,4$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 21,0, 22,5 (2 C), 26,7, 29,4, 41,8, 65,3, 70,2, 112,8, 113,3, 129,1, 129,2, 139,2, 154,8. EM (API-ES): 325 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$. IR (película): 3392, 2966, 2926, 2871, 1489, 1474, 1240, 1191, 1156, 1026, 879, 804 cm^{-1} .

Síntesis de 6-bromo-8-isopropil-4,4-dimetilcromano (E179)

A una suspensión de AlCl_3 (269 mg, 2,0 mmol) en CH_3NO_2 (1,5 mL/mmol) enfriada a -5°C se añadió gota a gota una disolución de 4-(4-bromo-2-isopropilfenoxi)-2-metilbutan-2-ol (407 mg, 1,3 mmol) en CH_3NO_2 (0,5 mL/mmol). Se dejó subir la temperatura a 0°C y se agitó a esa temperatura hasta observar la completa desaparición del producto de partida. Tras 2 h de reacción se hidrolizó con disolución saturada de NaHCO_3 (2 mL/mmol) y H_2O , se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con hexano. La fase orgánica se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para dar lugar a un crudo de reacción que tras purificación cromatográfica en gel de sílice (usando EtOAc-hexano, 1%) condujo a 183 g (0,65 mmol, 48%) de E179, como un aceite incoloro.

Datos de E179: $R_f = 0,56$ (EtOAc/Hex, 5%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,5 (d, 6 H, $J = 6,9$ Hz), 1,29 (s, 6 H), 1,79 (t, 2 H, $J = 5,5$ Hz, H_3), 3,20 (sept, 1 H, $J = 6,9$ Hz), 4,16 (t, 2 H, $J = 5,5$ Hz, H_2), 7,07 (d, 1 H, $J = 2,3$ Hz, H_7), 7,24 (d, 1 H, $J = 2,4$ Hz, H_5). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 22,5 (2 C), 26,8, 31,1, 31,3 (2 C), 37,4, 62,9, 112,4, 126,6, 127,0, 133,4, 138,9, 149,9. EM (IE): 284 $[\text{M}+2]^+$, 282 $[\text{M}]^+$, 267 $[\text{M}-15]^+$, 239 $[\text{M}-43]^+$, 149 (100%). IR (película): 2962, 2932, 2871, 1453, 1462, 1425, 1334, 1247, 1218, 1193, 1063, 865, 691 cm^{-1} .

Ejemplo 4

Procedimiento de síntesis de ásteres derivados de cromanos

El procedimiento general consistió en añadirle gota a gota, a una disolución de 6-bromocromano en THF anhidro (5 mL/mmol de 6-bromocromano) enfriada a 78°C , una disolución de $t\text{BuLi}$ 1,5 M en pentano (2,0 equiv). La mezcla se agitó a 78°C durante 20 minutos, tras los cuales se añadió mediante cánula, sobre una disolución de cloroformiato de etilo (1,5 equiv) en THF anhidro (3 mL/mmol de 6-bromocromano) enfriada también a 78°C . La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos, hasta la completa formación del producto. A continuación, se hidrolizó a baja temperatura con disolución saturada de NH_4Cl (4 mL/mmol). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con Et_2O . La fase orgánica se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró, y concentró a presión reducida para dar un crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice.

Síntesis de 8-isopropil-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de etilo (E1127)

A partir de 6-bromo-8-isopropil-2,2-dimetilcromano (92 mg, 0,32 mmol), disolución de $t\text{BuLi}$ 1,5 M en pentano (0,43 mL, 0,64 mmol) y cloroformiato de etilo (46 μL , 0,48 mmol) siguiendo el procedimiento general se llegó a un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano, 1-10%) condujo a 47 mg (0,17 mmol, 53%) de E1127 como un aceite amarillo y a 17 mg (0,08 mmol, 26%) del producto de protonólisis E155.

Datos de E1127: $R_f = 0,36$ (EtOAc/Hex, 10%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,19 (d, 6 H, $J = 6,9$ Hz), 1,32 (s, 6 H), 1,35 (t, 3 H, $J = 6,9$ Hz), 1,79 (t, 2 H, $J = 6,7$ Hz, H_3), 2,79 (t, 2 H, $J = 6,6$ Hz, H_4), 3,22 (sept, 1 H, $J = 6,9$ Hz), 4,31 (c, 2 H, $J = 7,2$ Hz), 7,62 (s, 1 H, H_5), 7,69 (s, 1 H, H_7). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 14,4, 22,3 (2 C), 22,6, 26,9 (3 C), 32,4, 60,4, 74,9, 120,0, 121,1, 125,5, 128,9, 136,5, 155,4, 167,1 (C=O). EM (API-ES): 299 $[\text{M}+\text{Na}]$, 277 $[\text{M}+\text{H}]^+$. IR (película): 2974, 2932, 2867 1712, 1606, 1464, 1447, 1368, 1284, 1238, 1194, 1157, 1122, 771 cm^{-1} .

Síntesis de 4,4-dimetilcroman-6-carboxilato de etilo (E1113)

A partir de 6-bromo-4,4-dimetilcromano (169 mg, 0,7 mmol), disolución de $t\text{BuLi}$ 1,5 M en pentano (0,9 mL, 1,4 mmol) y cloroformiato de etilo (0,1 mL, 1,05 mmol) siguiendo el procedimiento general, se llegó a un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano, 1-10%) condujo a 87 mg (0,3 mmol, 43%) de E 1113 como un aceite amarillo y 15 mg (0,09 mmol, 13%) del producto de protonólisis.

Datos de E1113: $R_f = 0,33$ (EtOAc/Hex, 10%). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,34 (s, 6 H), 1,34 (t, 3 H, $J = 7,1$ Hz), 1,83 (t, 2 H, $J = 5,5$ Hz, H_3), 4,22 (m, 2 H), 4,32 (m, 2 H), 6,77 (d, 1 H, $J = 8,5$ Hz, H_8), 7,74 (dd, 1 H, $J = 8,7, 2,1$ Hz, H_7), 7,97 (d, 1 H, $J = 2,1$ Hz, H_5). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ 14,4, 30,6, 30,8 (2 C), 37,1, 60,5, 63,4, 116,8, 122,5, 128,7, 129,1, 131,3, 157,6, 166,6. EM (API-ES): 235.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. IR (película): 2932, 2963, 1713, 1611, 1493, 1249, 1192, 1107, 1062, 771 cm^{-1} .

ES 2 335 849 B1

Síntesis de 8-isopropil-4,4-dimetilcroman-6-carboxilato de etilo (E1131B)

A partir de 6-bromo-8-isopropil-4,4-dimetilcromano (86 mg, 0,30 mmol), disolución *t*BuLi 1,5 M en pentano (0,40 mL, 0,61 mmol) y cloroformiato de etilo (58 μ L, 0,61 mmol) siguiendo el procedimiento general, se llegó a un crudo de reacción que tras purificación (usando EtOAc-hexano, 1-10%) condujo a 50 mg (0,18 mmol, 60%) de E 1131B como un aceite amarillo y a 25 mg (0,12 mmol, 40%) del producto de protonólisis.

Datos de E1131B: $R_f = 0,35$ (EtOAc/Hex, 10%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1,19 (d, 6 H, $J = 6,8$ Hz), 1,34 (s, 2 H), 1,36 (t, 3 H, $J = 7,1$ Hz), 1,82 (t, 2 H, $J = 5,5$ Hz, H_3), 3,32 (sept, 1H, $J = 6,9$ Hz), 4,23 (t, 2 H, $J = 5,5$ Hz, H_2), 4,32 (c, 2 H, $J = 6,9$ Hz), 7,69 (d, 1 H, $J = 1,9$ Hz), 7,83 (d, 1 H, $J = 2,1$ Hz). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 14,3, 22,4 (2 C), 26,6, 30,7, 30,9 (2 C), 37,0, 60,3, 63,1, 121,6, 124,9, 126,3, 130,7, 136,2, 154,8, 166,8 (C=O). EM (API-ES): 299 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 277 $[\text{M}+\text{H}]^+$. IR (película): 2962, 2932, 2873, 1713, 1664, 1465, 1322, 1267, 1249, 1220, 1191, 1137, 1064, 1035, 771 cm^{-1} .

Ejemplo 5

Determinación de la capacidad del compuesto E379 como inhibidor de UCP1

Para determinar si un compuesto dado inhibe la actividad de una UCP1 se determina su efecto sobre la velocidad de respiración de mitocondrias aisladas que contengan UCP1 activa, y se compara dicho efecto sobre el que tiene lugar en mitocondrias control sin UCP, para discriminar posibles efectos inespecíficos [Rial E, González-Barroso MM, *et al.* (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. EMBO J. 18: 5827-5833; Patente ES9800225],

La obtención de mitocondrias que contengan UCP1 se inició por transformación de la cepa W303 de *Saccharomyces cerevisiae* con el vector pYeDP-1/8-10, que inserta la secuencia de UCP1 en el genoma de la levadura bajo el control del promotor gal-cyc [Arechaga I, Raimbault S, *et al.* (1993) Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. Biochem. J. 296: 693-700]. Con este sistema, la expresión de UCP1 se reprime en presencia de glucosa y se activa en presencia de galactosa. La UCP1 expresada en estas levaduras recombinantes retiene sus propiedades características: transporte de protones activado por ácidos grasos e inhibido por nucleótidos. Como mitocondrias control se usaron las aisladas de la misma cepa de levadura transformada con un vector pYeDP en el que el ADN que codifica por la UCP1 se inserta en sentido inverso, lo que impide la síntesis de dicha proteína. La comparación de los efectos de un compuesto dado sobre la velocidad de respiración de ambos tipos de mitocondrias permite discriminar efectos inespecíficos de dicho compuesto sobre UCP1 [Rial E, González-Barroso MM, *et al.* (1999) Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. EMBO J. 18: 5827-5833; Patente ES9800225],

La medida de la actividad de la UCP1 en las mitocondrias se realizó de acuerdo a Rial E y Jiménez-Jiménez J (2001) Procedimiento para la determinación de la actividad de las proteínas desacoplantes (UCP) mediante la monitorización del consumo de NAD(P)H (Patente de invención ES2177404). En los ensayos realizados, la concentración inicial de NADH fue de 0.3 mM y, puesto que para determinar la posible inhibición de la actividad de la UCP1, hay que asegurarse de que se encuentra activada, se añadió palmitato 9 μM al medio de ensayo [Arechaga I, Raimbault S, *et al.* (1993) Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. Biochem. J. 296:693-700], La medida de la actividad de la UCP1 se realizó determinando la fluorescencia del NADH, usando placas de 96 pocillos y un lector de placas, ajustado a una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 460 nm. En los pocillos de las placas conteniendo las mitocondrias se añade el compuesto cuya actividad inhibidora de la UCP se quiere determinar.

La Figura 1 muestra el efecto de la adición de 100 μM de GDP, inhibidor de la actividad de UCP1, así como de 20 μM de E379 (6-fenil-8-isopropil-2,2-dimetilcromano, sintetizado según se describe en el Ejemplo 2 de la presente memoria). En el panel A se muestran el efecto del GDP y del E379 determinado por la disminución de la fluorescencia y en el panel B la velocidad de consumo de NADH una vez transformados los valores de fluorescencia en concentración de NADH por comparación con una curva patrón del mismo. En ambas figuras se representan los resultados obtenidos en situación basal en presencia del activador palmitato (círculos), tras la adición del inhibidor GDP a una concentración de 100 μM (triángulos negros hacia abajo) y tras la adición de compuesto E379 a una concentración de 20 μM (triángulos blancos hacia arriba).

Se demuestra, por tanto, la capacidad del compuesto E379 como inhibidor de la actividad UCP1, que es equivalente a la mostrada por el GDP.

Ejemplo 6

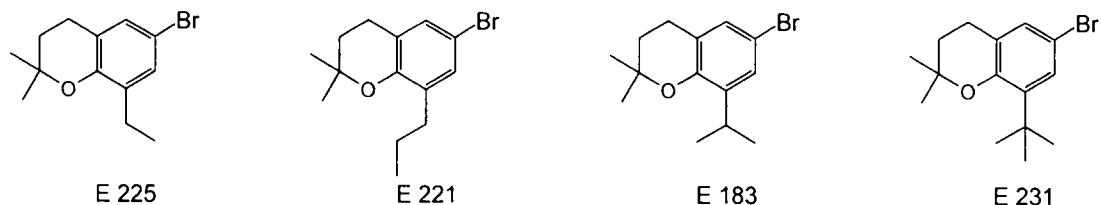
Actividad inhibidora de compuestos derivados de cromo sobre la actividad de la proteína UCP1

Utilizando la metodología descrita en el ejemplo anterior se ha caracterizado el efecto de los derivados de cromo descritos en la Tabla 1, sintetizados según se ha descrito en los ejemplos 1 a 4 de la presente memoria. La Figura 2

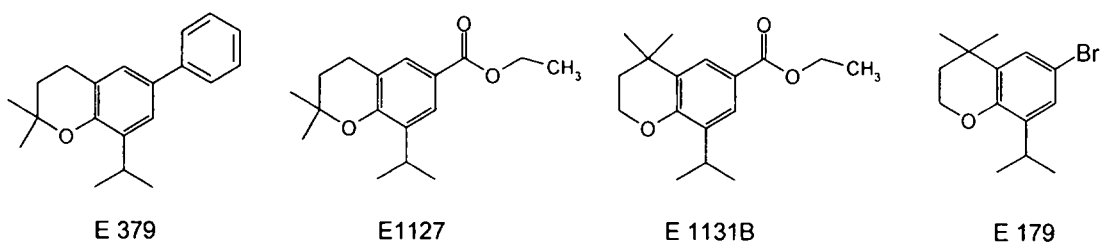
ES 2 335 849 B1

muestra los resultados obtenidos con 14 compuestos derivados de cromano. La Figura 3 muestra la EC_{50} correspondiente a cada uno de dichos compuestos para la inhibición de la actividad de la UCP1. Los derivados de cromano analizados tienen las siguientes fórmulas:

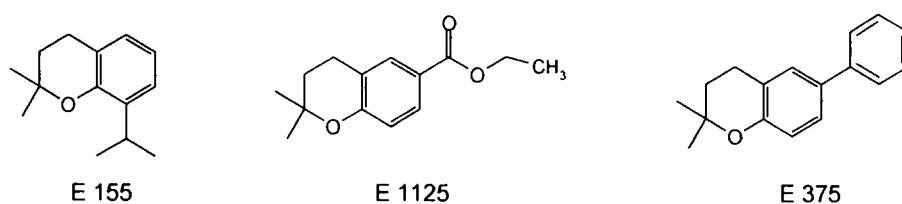
5



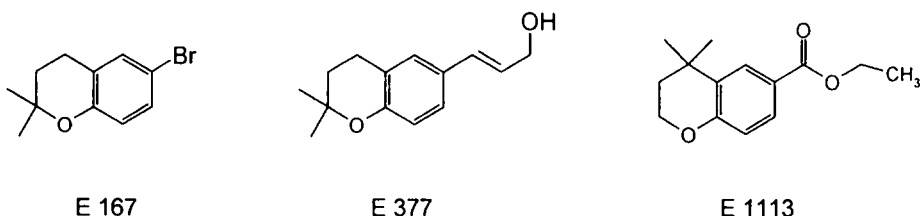
15



25



35



45

50

Para la determinación de las constantes de inhibición, a los valores de velocidad de respiración obtenidos con mitocondrias que expresan UCP1 se les sustrajo los obtenidos con mitocondrias control que no la expresan. El cálculo de los parámetros cinéticos se llevó a cabo con el programa de regresión de SigmaPlot (Systat Software, Erkrath, Alemania) que realiza el ajuste de los datos utilizando el algoritmo Marquart-Levenberg. En todos los casos, las concentraciones de inhibidor usadas para el cálculo de la EC_{50} fueron 0, 2, 20, 125 y 250 μM . En aquellos compuestos en los que sus EC_{50} son tan altas que quedan fuera del rango de los datos, se indica que la misma es "mayor de 200" (>200), considerándose por tanto que dichos compuestos no tienen capacidad inhibitoria de la actividad de UCP1 (Figura 3 y Tabla 1).

55

Los resultados mostraron la capacidad inhibitoria de varios de los compuestos, en particular de E379, E1127, E1131B, E225, E231 y E221, con EC_{50} de 20, 27, 32, 34, 39 y 54 μM , respectivamente.

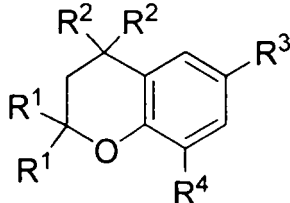
60

Por el contrario, es importante destacar que ensayos realizados con compuestos de fórmula general (I), en los que R^3 es $-\text{COOR}^5$, siendo R^5 hidrógeno, es decir, en los que R^3 es un grupo carboxi ($-\text{COOH}$), tales como E137, no presentan efecto inhibitorio.

65

TABLA I

Datos de actividad inhibidora de UCP1 de derivados de cromano de fórmula (I)

Compuesto					EC ₅₀ (μM)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	
E225	Me	H	Br	Et	34
E221	Me	H	Br	Pr	54
E183	Me	H	Br	i-Pr	111
E231	Me	H	Br	t-Bu	39
E379	Me	H	Ph	i-Pr	20
E1127	Me	H	CO ₂ Et	i-Pr	27
E1131B	H	Me	CO ₂ Et	i-Pr	32
E179	H	Me	Br	i-Pr	132
E155	Me	H	H	i-Pr	98
E1125	Me	H	CO ₂ Et	H	135
E375	Me	H	Ph	H	109
E167	Me	H	Br	H	>200
E377	Me	H	CH ₂ =CHCH ₂ OH	H	>200
E1113	H	Me	CO ₂ Et	H	>200
E137	Me	H	COOH	i-Pr	>200

Donde Me = metilo, Et = etilo, Pr = propilo, i-Pr = iso-propilo, t-Bu = terc-butilo

Ejemplo 7

Efecto del compuesto E379 sobre la viabilidad de células Caco-2 sometidas a estrés oxidativo

Con el fin de estudiar el efecto de los compuestos de la invención en células tumorales, se seleccionó la línea celular Caco-2 de adenocarcinoma colorectal humano (ATCC HTB-37), en la que se confirmó previamente la presencia de UCP2 mediante inmunodetección en extractos mitocondriales. Para la preparación de los extractos ricos en mitocondrias, se cultivaron las células en medio completo (MEM Alpha, Gibco, Invitrogen) suplementado con 20% de suero fetal bovino, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μg/ml hasta que llegaron a un 70-80% de confluencia en frascos de cultivo de 75 cm² (Falcon) a 37°C y 5% de CO₂. Las células se lavaron con solución tampón PBS fría y se recogieron con un raspador en 1 ml de tampón 250 mM sacarosa, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.4. Se lavaron

ES 2 335 849 B1

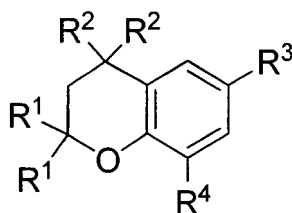
a 4°C una vez en este medio y se centrifugaron a 2000 g 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml del mismo medio conteniendo inhibidores de proteasas (protease inhibitor cocktail Sigma P8340) y se sometieron a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido durante 5 minutos y descongelación a 37°C durante 10 minutos, para romper las células. Se centrifugaron las muestras a 750 g, 10 minutos para eliminar las células que no se habían roto y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000 g, 20 minutos. El sedimento mitocondrial se resuspendió en 10-20 µl de medio conteniendo inhibidores de proteasas. Los extractos mitocondriales se sometieron a electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a membrana de nitrocelulosa. La membrana se trató 2 horas con PBS/Tween 0.1% y 5% de leche en polvo y, a continuación, se incubó toda la noche con anticuerpo policlonal contra UCP2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EEUU). Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS/Tween 0.1% y se incubó 2 horas con un anticuerpo anti-goat IgG conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, EEUU). Para asegurar una carga similar de proteína y de riqueza mitocondrial se utilizó un anticuerpo policlonal anti-porina (Sigma-Aldrich). La señal de quimioluminiscencia se reveló con el kit ECL (GE Healthcare, Reino Unido) y se detectó con la cámara CCD de un Fujifilm LAS-3000 analyzer. La Figura 4 muestra la presencia de la UCP2 en extractos mitocondriales de las células Caco-2, mostrándose como control la señal obtenida con mitocondrias aisladas de bazo de ratón.

Como la UCP2 aumenta la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia basada en agentes antitumorales que provocan estrés oxidativo, se estudió el efecto del compuesto E379 (que había demostrado su gran capacidad de inhibición de la actividad de la UCP1) sobre la viabilidad de las células Caco-2 sometidas a estrés oxidativo. Como agente antitumoral que provoca estrés oxidativo se utilizó el trióxido de arsénico [Laparra JM *et al.* (2008) *As₂O₃-induced oxidative stress and cycle progression in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2)*. *Toxicol In Vitro* 22:444-449]. La viabilidad se determinó *in vitro* por el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio), que se basa en que las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables rompen el anillo de tetrazolio del MTT dando lugar a cristales de formazán que, tras la solubilización de las células, dan un color morado. Para este ensayo, se sembraron 50000 células por pocilio en placas de 96 pocilios en MEM Alpha (Gibco, Invitrogen) suplementado con 20% de suero fetal bovino (v/v) inactivado por calor, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Tras 24 horas, se trataron las células con concentraciones crecientes de trióxido de arsénico en presencia o ausencia del inhibidor E379 (50 µM). Después de 24 horas, se añadió a cada pocilio 0.5 mg/ml de MTT y se incubó durante 40 minutos hasta la aparición de cristales de formazán. Se añadió una solución de isopropanol ácido (0.1 N HCl) con 10% de tritón X-100, que permite disolver dichos cristales, y se midió por espectrofotometría la absorbancia de los extractos obtenidos a una longitud de onda de 595 nm.

La Figura 4 muestra que, aunque el tratamiento con trióxido de arsénico provoca muerte de las células tumorales, incluso a concentraciones del mismo de 10 µM, la supervivencia era superior al 70%. En las mismas condiciones, la adición del compuesto E379 a una concentración de 50 µM redujo la supervivencia a aproximadamente el 50%. La misma concentración del compuesto E379 cuando la concentración de trióxido de arsénico es de 0,5 µM logra reducir la supervivencia a menos del 70%, frente a una supervivencia de aproximadamente el 95% en ausencia de dicho compuesto.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

sus enantiómeros, así como sus sales aceptables farmacéuticamente, donde:

R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno o alquilo (C₁-C₈);

R³ es hidrógeno, un halógeno, arilo o -COOR⁵, donde R⁵ es alquilo (C₁-C₄) o alquilarilo; y

R⁴ es hidrógeno, alquilo (C₁-C₈) o alquilarilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R¹ es un grupo alquilo (C₁-C₄) y R² es H.

3. Compuesto según la reivindicación 1, donde R¹ es H y R² es un grupo alquilo (C₁-C₄).

4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de la lista que comprende:

- a. 8-isopropil-2,2-dimetilcromano;
- b. 6-bromo-8-etil-2,2-dimetilcromano;
- c. 6-bromo-2,2-dimetil-8-propil-cromano;
- d. 6-bromo-8-isopropil-2,2-dimetilcromano;
- e. 6-bromo-8-terc-butil-2,2-dimetilcromano;
- f. 6-bromo-8-isopropil-4,4-dimetilcromano;
- g. 6-fenil-8-isopropil-2,2-dimetilcromano;
- h. 8-isopropil-2,2-dimetilcroman-6-carboxilato de etilo; ó
- i. 4,4-dimetilcroman-8-isopropil-6-carboxilato de etilo.

5. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la elaboración de una composición farmacéutica.

6. Uso del compuesto según la reivindicación 5, donde la composición farmacéutica es capaz de inhibir la actividad desacoplante de las proteínas desacoplantes (UCP).

7. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades y dolencias en las que hay un aumento en los niveles y/o actividad de las proteínas UCP.

8. Uso según reivindicación 7 donde las enfermedades y dolencias con aumento en los niveles y/o actividad de las proteínas UCP se seleccionan de la lista que comprende el cáncer, la caquexia tumoral, la diabetes no dependiente de insulina, las infecciones o la fiebre.

9. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

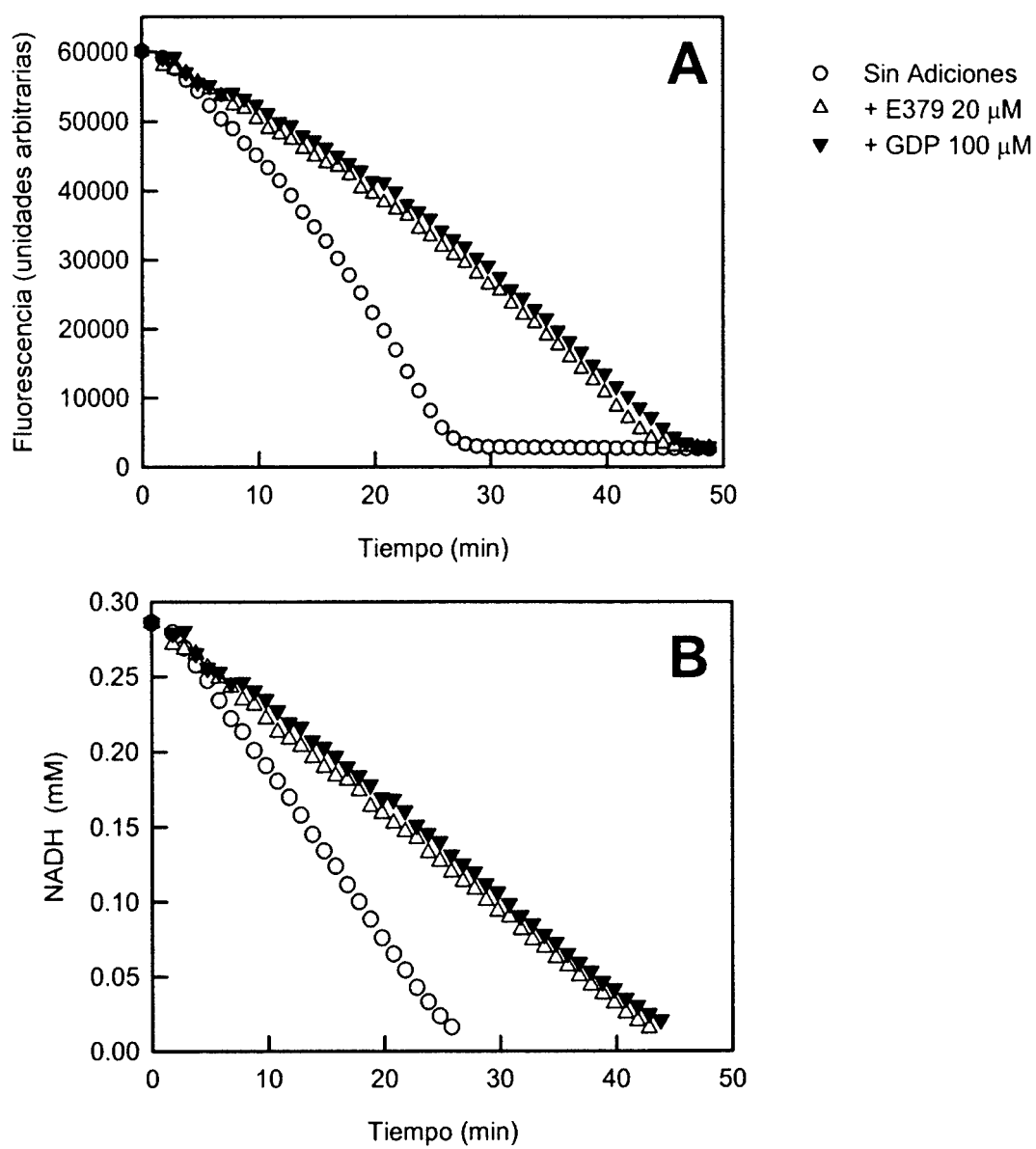


FIG. 1

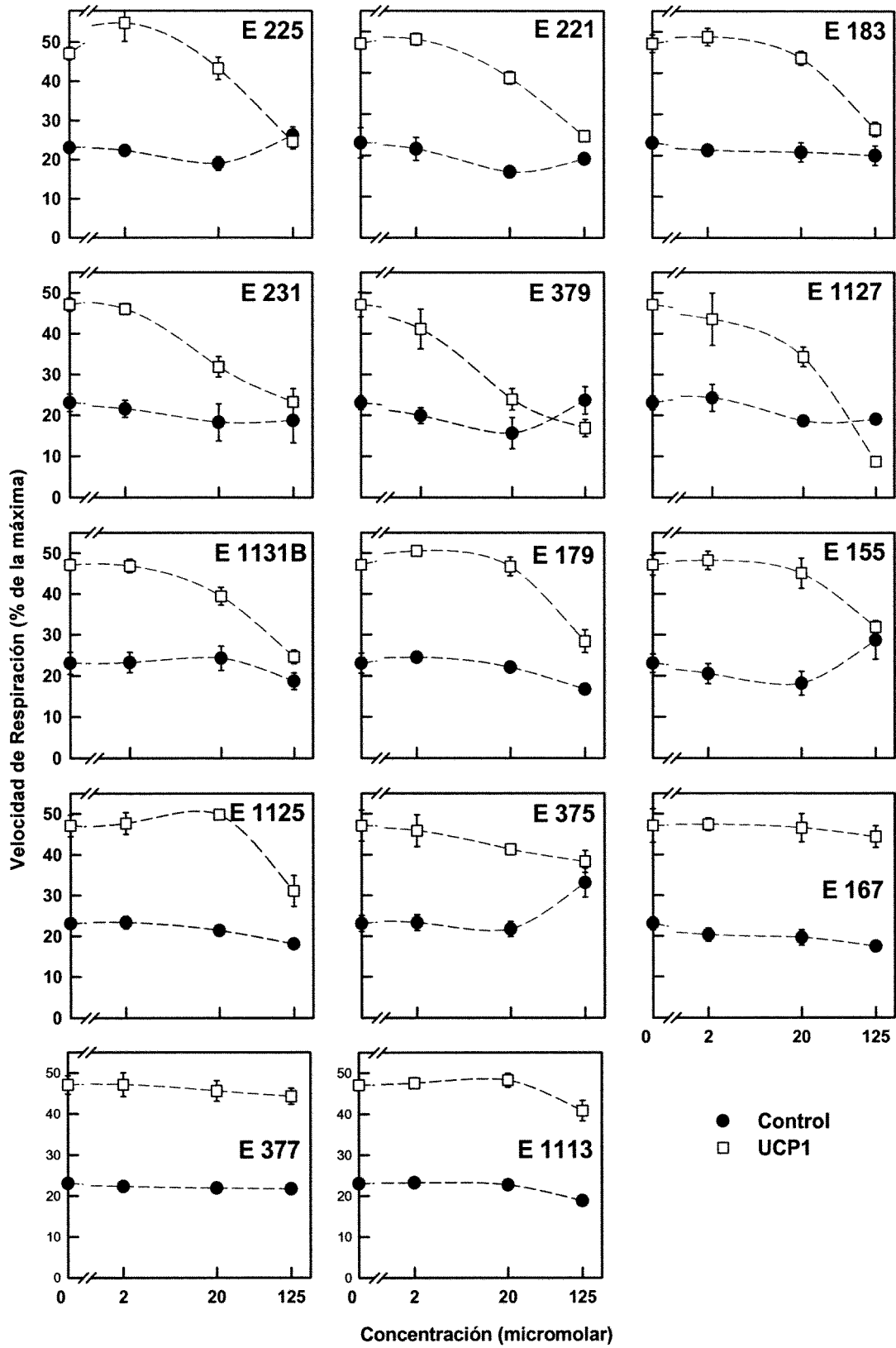


FIG. 2

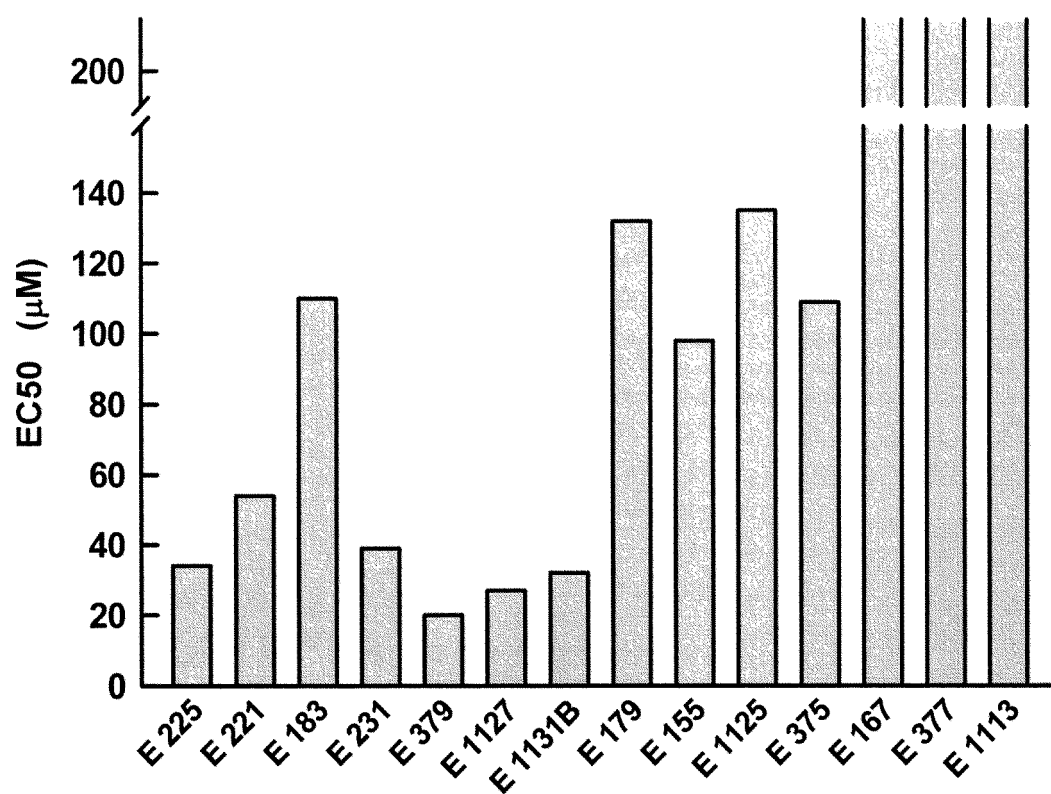


FIG. 3

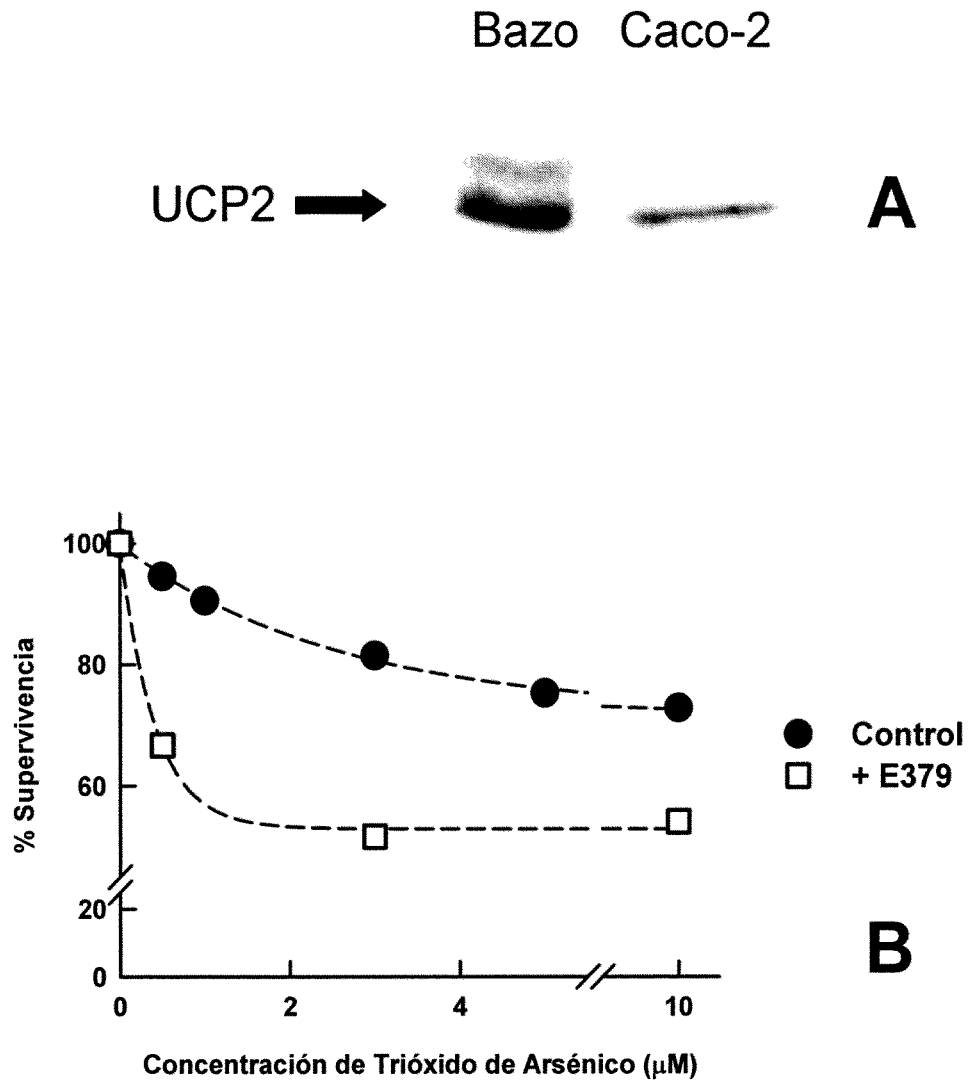


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 335 849

② Nº de solicitud: 200802811

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.10.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ISHINO, Y. et al. "An improved method for synthesis of 1-benzopyrans from unsaturated alcohols and phenols using a catalytic amount of acids". Synthetic Communications 2001, Volumen 31, Número 3, páginas 439-448. Ver página 442, tabla 2, compuestos 3a-3e.	1,2
X	WO 1997046548 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY) 11.12.1997, página 10, esquema 1; páginas 13,15.	1,3
X	WO 2005058798 A2 (ALLERGAN, INC.) 30.06.2005, página 76, esquema 6, compuestos 25 y 27; página 80, esquema 7, compuesto 31; página 85, esquema 9, intermedio 36.	1
X	YUS, M. et al. "Reductive lithiation of cyclic benzofused ethers: a source of oxygen-functionalised organolithium compounds". Tetrahedron 2002, Volumen 58, páginas 4907-4915. Ver página 4909, esquema 4, compuesto 7; página 4908, esquema 3; página 4909, tabla 2, compuesto 6h.	1,2
X	WO 2007070433 A2 (MERCK & CO., INC.) 21.06.2006, página 58, ejemplo 13, paso C.	1,3
X	US 6235771 B1 (SHIRAISHI, M. et al.) 22.05.2001, columna 85, ejemplo de referencia 74.	1,2
X	BROWN, C.W. et al. "Novel Heteroarotinoides as Potential Antagonists of Mycobacterium bovis BCG". Journal of Medicinal Chemistry 2004, Volumen 47, páginas 1008-1017. Ver página 1009, compuesto 23.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.12.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 311/74 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, PUBMED, WOK

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-9	SÍ
	Reivindicaciones	1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-9	SÍ
	Reivindicaciones	1-3	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Synthetic Communications 2001, Vol. 31, N° 3, pp. 439-448	2001
D02	WO 1997/046548 A1	11-12-1997
D03	WO 2005/058798 A2	30-06-2005
D04	Tetrahedron 2002, Vol. 58, pp. 4907-4915	2002
D05	WO 2007/070433 A2	21-06-2006
D06	US 6235771 B1	22-05-2001
D07	Journal of Medicinal Chemistry 2004, Vol. 47, pp. 1008-1017	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un compuesto derivado de cromano de fórmula general (I), el uso de dicho compuesto para la elaboración de una composición farmacéutica y la composición farmacéutica que comprende el compuesto (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga una serie de compuestos con estructura de benzopirano, entre los que se encuentran los compuestos 3a-3d, que se engloban dentro de la fórmula general (I) de la invención (ver página 442, tabla 2), que son exactamente 2,2-dimetilcromano (3a; R1=Metilo, R2=R3=R4=H), 2,2,6-trimetilcromano (3b; R1=R3=Metilo, R2=R4=H), 6-tert-butil-2,2-dimetilcromano (3c; R1=Metilo, R2=R4=H, R3=t-Butilo), 6-fenil-2,2-dimetilcromano (3d; R1=Metilo, R2=R4=H, R3= Fenilo) y 6-cloro-2,2-dimetilcromano (3e; R1=Metilo, R2=R4=H, R3=Cloro).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicaciones 1 y 2 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga compuestos derivados de benzopirano con actividad antiinflamatoria y analgésica (ver página 4), así como una serie de intermedios útiles para la síntesis de los mismos (ver página 10, esquema 1). Entre dichos intermedios, que responden a la fórmula general (I) de la invención, se encuentran el 6-bromo-8-tert-butil-4,4-dimetil-2,3-dihidrobencopirano (página 13, siendo R1=H, R2=Metilo, R3=Br, R4=tert-Butilo) y el 8-tert-butil-4,4-dimetil-2,3-dihidrobencopirano (página 13, siendo R1=R3=H, R2=Metilo, R4=tert-Butilo) y el 8-tert-butil-2,3-dihidrobencopirano (página 15, siendo R1=R2=R3=H, R4=tert-Butilo).

En consecuencia, se considera que el objeto de la reivindicaciones 1 y 3 no presenta novedad según lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga una serie de derivados de cromano útiles como intermedios para la síntesis de compuestos con actividad inhibitoria selectiva de citocromo P450RAI-1 o de citocromo P450RAI-2 (ver página 1, líneas 11-13; página 6, fórmula 1). Entre dichos derivados de cromano, que responden a la fórmula general (I) de la invención, se encuentran los intermedios 25 (6-bromo-2,2-dietil-4,4-dimetilcromano; en el que R1=Etilo, R2=Metilo, R3=Br, R4=H) y 27 (6-bromo-2,2-dietil-8-isopropil-4,4-dimetilcromano; en el que R1=Etilo, R2=Metilo, R3=Br, R4=i-Propilo) (ver página 76, esquema 6), además del 6-bromo-2,2,4,4-tetrametilcromano (R1=R2=Metilo, R3=Br, R4=H) y el intermedio 31 (6-bromo-8-isopropil-2,2,4,4-tetrametilcromano; en el que R1=R2=Metilo, R3=Br, R4=i-Propilo) (ver página 80, esquema 7), el intermedio 36 (2,2,4,4-tetrametilcromano-6-carboxilato de etilo; siendo R1=R2=Metilo, R3=COOEt, R4=H) (ver página 85, esquema 9).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación 1 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 recoge un estudio sobre la litación reductora de éteres cíclicos benzocondensados, en el que se divulgan compuestos que podrían englobarse en la fórmula general (I) de la invención, como son el cromano (7) (página 4909, esquema 4; siendo R1=R2=R3=R4=H) y el 2,2-dietilcromano (6h) (páginas 4908, esquema 3; página 4909, tabla 2; siendo R1=Etilo, R2=R3=R4=H).

Hoja adicional

Por tanto, se considera que el objeto de la invención recogida en las reivindicaciones 1 y 2 no es nuevo según lo divulgado en el documento D04.

El documento D05 divulga el compuesto 8-t-butil-4,4-dimetilcromano-6-carboxilato de metilo (ver página 58, ejemplo 13, paso C; R1=H, R2=Metilo, R3=CO2Me, R4=H), que se engloba dentro de la fórmula general (I) de la invención, como intermedio para la preparación de los compuestos de fórmula I, que son moduladores del receptor de quemoquinas CXCR3 (ver página 3, líneas 17-24).

Por consiguiente, el objeto de la reivindicaciones 1 y 3 no presenta novedad según lo divulgado en el documento D05.

El documento D06 divulga derivados de anilida de fórmula (I) con diversas aplicaciones farmacológicas derivadas de su actividad antagonista CCR5 (ver columna 1, línea 58-columna 2, línea 13). Entre los intermedios empleados en la síntesis de estos compuestos se divulga el 6-bromo-2,2-dimetil-3,4-dihidro-1H-benzopirano (columna 85, ejemplo de referencia 74), que responde a la fórmula general (I) de la invención, cuando R1 es Metilo, R3 es Br y R2 y R4 son H).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicaciones 1 y 2 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D06.

El documento D07 divulga una serie de compuestos con potencial actividad antagonista de Mycobacterium bovis GCG (ver página 1010, tabla 1) y un procedimiento de síntesis de los mismos a partir de los intermedios adecuados, entre los que se encuentra el 2,2,4,4-tetrametilcromano 23 (página 1009; siendo R1=R2=Metilo, R3=R4=H).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación 1 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D07.

Sin embargo, ninguno de los documentos D01-D07, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia la invención recogida en la reivindicación 4, que se refiere a compuestos concretos de fórmula general (I), ni tampoco hacia las reivindicaciones 5-9, relativas al uso del compuesto de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica y a la propia composición que comprende el compuesto (I).

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones 4-9 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.