

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento correspondiente a un reporte técnico en relación con la solicitud de patente europea No. **15 746 211.0**.

Fecha: Consultar el Formato 1507

Página 1

Solicitud No. 15 746 211.0

El examen se lleva a cabo en relación con los **siguientes documentos de la solicitud**

Descripción, Páginas

1-67 según fueron publicadas

Reivindicaciones, Números

1-15 presentada en formato electrónico el 05-04-2016

Dibujos, Hojas

1 / 12-12 / 12 según fueron publicados

Los siguientes documentos han sido citados en el informe de búsqueda internacional; la numeración se cumplirá en el resto del procedimiento.

D1 WO 201 2/061409 A1 (MARSHALL EDWARDS, INC) 10 de mayo de 2012
(2012-05-1 0)

D2 US 201 2/251 630 A1 (ALVERO ET AL.) 4 de octubre de 2012 (2012-10-04)

D3 WO 2005/049008 A1 (NOVOGEN RESEARCH PTY LTD) 2 de junio de 2005 (2005-06-02)

D4 WO 2006/032086 A1 (NOVOGEN RESEARCH PTY LTD) 30 de marzo de 2006 (2006-03-30)

1. Novedad (Art. 54 CPE)

Los compuestos de fórmula (I) actualmente reivindicados son nuevos en la técnica debido a la presencia de los tres sustituyentes R^{10} , R^{11} y R^{12} en el anillo de fenilo unido en la posición 3 del anillo de benzopiraniolo (ninguno de estos sustituyentes puede ser hidrógeno).

El documento D1 describe una familia de compuestos (los de fórmula (II)) que se solapan con los compuestos actualmente reivindicados. La presencia obligatoria de los tres sustituyentes R^{10} , R^{11} y R^{12} puede considerarse como una nueva selección de los mismos. Los compuestos específicos del documento D1 no poseen los tres sustituyentes mencionados anteriormente.

Fecha: Consultar el Formato 1507

Página 2

Solicitud No. 15 746 211.0

Los documentos D2, D3 y D4 describen compuestos que no tienen tres sustituyentes en el anillo de fenilo unido en la posición 3 del anillo de benzopiraniolo.

2. Nivel Inventivo (Art. 56 CPE)

El documento D1 se considera como la técnica anterior más cercana ya que describe una familia de compuestos que son útiles para el tratamiento del cáncer y cuya estructura química se superpone con la reivindicada en la presente memoria.

Como se ha indicado anteriormente, la presente familia de compuestos se considera como una selección del documento D1. Este documento enseña de hecho que cualquier compuesto de fórmula (II), es decir, también aquellos que tienen tres sustituyentes R_2 , R_5 y R_6 son útiles en el tratamiento del cáncer. Aunque los compuestos específicos citados en D1 tienen sólo un sustituyente en dicho anillo de fenilo, la persona versada en la técnica esperaría el mismo efecto de compuestos que tengan dos o tres sustituyentes. El documento D2 que describe compuestos estructuralmente cercanos útiles para la misma terapéutica proporciona compuestos específicos con dos sustituyentes.

A la luz de esta técnica anterior, sólo se puede reconocer la presencia de un nivel inventivo si se puede demostrar que la característica distintiva, es decir, la presencia de **tres** sustituyentes en el anillo de fenilo unido en la posición 3 del benzopirano, conduce a un efecto inesperado.

La memoria descriptiva contiene datos comparativos en la página 63 pero con un compuesto que tiene sólo un sustituyente en el anillo de fenilo unido en la posición 3 del anillo de benzopiranilo. Se considera que, por ejemplo, los compuestos 3 ó 7 del Documento D2, que sólo difieren de los que se reivindican actualmente en la ausencia de un tercer sustituyente, están estructuralmente más próximos a los reivindicados en la presente memoria. En

consecuencia, se deben proporcionar datos comparativos con este tipo de compuestos para establecer la presencia de un nivel inventivo.

En ausencia de estos datos, los requisitos del art. 56 CPE no se cumplen.

3. Miscelánea (por ejemplo, Art. 83, 84 CPE)

La reivindicación 1 abarca un número indeterminado de compuestos que se definen únicamente por referencia a una actividad funcional deseada, concretamente los compuestos que son “profármacos”. Este término funcional no proporciona una orientación técnica específica para la determinación del alcance de la reivindicación en cuanto a cuáles derivados son “profármaco” adecuados que tienen la función deseada sin imponer una carga irrazonable, y por lo tanto puede ser visto como una mera invitación a las personas versadas en la materia para realizar un programa de investigación con el fin de encontrar (...)

Fecha: Consultar el Formato 1507

Página 3

Solicitud No. 15 746 211.0

(...) variantes adecuadas en contravención del artículo 84 CPE (ver T 279/07, punto 2.1 de la decisión). Además, no existe un conocimiento común general de este tipo disponible para la persona versada en la materia, y la solicitud no proporciona una divulgación suficiente (artículo 83 del CPE).

Las reivindicaciones 9 y 10 incluyen todas las características de la reivindicación 1. Por lo tanto, estas reivindicaciones deben ser reformuladas

como una reivindicación dependiente de la reivindicación 1 (ver Regla 43 (4)
CPE y Directrices F-IV, 3.4)

Formato EPO 1703 01.91 TRI

Barker Brettell
Propiedad Intelectual

Barker Brettell LLP
100 Hagley Road
Edgbaston, Birmingham
B16 8QQ, Inglaterra

Oficina Europea de Patentes
D-80298 Múnich
ALEMANIA

5 de febrero de 2017

Mediante presentación en línea

Estimados señores

Solicitud de Patente Europea No. 15746211.0-1452

Novogen Ltd.

Nuestra referencia: YCJ79790P.EPP

Se hace referencia a la comunicación de conformidad con las Reglas 70 (2) y 70a (2) del CPE de 28 de julio de 2016, que se considera recibida el 7 de agosto de 2016, la cual establece un plazo de seis meses a partir de la notificación de la comunicación para confirmar que el solicitante desea proceder con la solicitud y para responder a las cuestiones planteadas en la opinión de búsqueda europea.

En respuesta, la demandante confirma que desea continuar con esta solicitud y espera con interés recibir los resultados del examen sustantivo a su debido tiempo.

Además, ofrecemos las siguientes observaciones y modificaciones en respuesta a las cuestiones planteadas en la opinión de búsqueda europea.

Modificaciones

Se adjuntan las reivindicaciones 1 a 15 para sustituir las reivindicaciones que se encuentran actualmente en el expediente. También se adjunta una versión de cambios con señalización de las reivindicaciones para facilitar la referencia, para mostrar los cambios hechos a las reivindicaciones que se encuentran actualmente en el expediente.

La reivindicación 1 se ha limitado a cubrir ciertas opciones específicas para los grupos R^{10} - R^{12} , basadas en las reivindicaciones 10 y 11 del PCT. Las reivindicaciones restantes han sido revisadas para que tengan consistencia.

Las nuevas reivindicaciones se basan en gran medida en la solicitud PCT según fue presentada, según se indica a continuación:

Reivindicación	Base
1	Reivindicaciones 1, 10, 11 del PCT
2	Reivindicación 2 del PCT
3	Reivindicación 4 del PCT
4	Reivindicación 5 del PCT
5	Reivindicación 12 del PCT
6	Reivindicación 14 del PCT
7	Reivindicación 15 del PCT
8	Reivindicación 17 del PCT
9	Reivindicación 19 del PCT

10	Reivindicación 30 del PCT
11	Reivindicación 31 del PCT
12	Reivindicación 32 del PCT
13	Reivindicación 35 del PCT
14	Reivindicación 46 del PCT
15	Reivindicación 51 del PCT

También adjuntamos nuevas páginas 1, 3-6, 8, 11-15, 19-21, 28-33, 37, 40 y 67 de la descripción. Las páginas restantes de la descripción mantienen sin cambios.

Se adjunta una copia de los cambios seguidos de la descripción completa para ayudar al examinador a ver los cambios realizados. Las revisiones efectuadas tienen por objeto garantizar que la descripción es coherente con las reivindicaciones y eliminar el término "incorporado por referencia" , así como reconocer la técnica anterior citada D1-D4.

Se declara que no se ha añadido ninguna materia que se extienda más allá del contenido de la solicitud según fue presentada y que por lo tanto las modificaciones cumplen con el artículo 123 (2) CPE.

Además, no se abandona ninguna materia por medio de modificaciones hechas al juego de reivindicaciones original. El solicitante se reserva el derecho de reintroducir la materia suprimida en la presente solicitud y / o de perseguir la protección de esta materia mediante la presentación de solicitudes divisionales.

Comentarios

Nivel Inventivo

En la opinión de búsqueda europea se sugirió que las reivindicaciones eran nuevas en relación con D1-D4 pero que carecía nivel inventivo en relación con D1 a la luz de D2.

La opinión de búsqueda indicó que D1 describe una amplia familia de compuestos indicados como útiles para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, tal como lo señaló el examinador, los compuestos específicos descritos en D1 tienen solamente un sustituyente en el anillo arilo en la posición 3. Por otro lado, D2 describe compuestos que contienen un anillo arilo monosustituido o disustituido en la posición 3.

La invención reivindicada en el presente documento se refiere a compuestos que tienen un anillo arilo trisustituido muy específico unido a la posición 3 de un andamio benzopirano y un anillo arilo adicional en la posición 4.

Específicamente, la presente invención reivindicada requiere un anillo arilo trisustituido en la posición 3 y además requiere que en este anillo trisustituido el (para) sustituyente R^{10} sea OH, y que los (orto/meta) sustituyentes R^{11} y R^{12} sean seleccionados independientemente del grupo que consiste en: OH, OMe, alquilo C1-C4 y F.

Este patrón específico de sustitución no se enseña ni se sugiere en la técnica citada.

No hay razón por la que, sin comprensión retrospectiva, la persona versada en la materia haya modificado las enseñanzas de D1 o D2 para alcanzar la invención reivindicada.

D1 lleva a la persona versada en la materia a la contemplación de productos monosustituídos, ya que éstos son los que se ejemplifican. D1 ciertamente no proporciona ninguna enseñanza con respecto a la relevancia del patrón de sustitución para el anillo de arilo en la posición 3. No hay nada en D1 que incluso indique que puede haber algún significado técnico para el número de grupos sustituyentes.

En general, el experto es conservador y no tiene actividad inventiva. ¿Por qué haría un producto más complejo, con un patrón de sustitución más complicado, a menos que estuviera seguro de que habría una ventaja asociada con esto? De hecho, vería que los compuestos específicamente ejemplificados de D1 tienen solamente un solo grupo sustituyente en el anillo arilo en la posición 3 y se dirigirían hacia esta disposición.

Por lo tanto, la persona versada en la materia al leer D1 no tiene ninguna intención de contemplar genuinamente el uso de un anillo trisustituído, y mucho menos el patrón de sustitución específico de la invención reivindicada.

Por otro lado, D2 conduce a la persona versada en la materia a contemplar productos monosustituídos o disustituídos. D2 define los grupos R_2 , R_5 y R_6 en el anillo arilo en la posición 3 de manera que no se permite la trisustitución; R_6 es hidrógeno.

Así, proporcionar un producto trisustituido va directamente contra las enseñanzas de D2. D2 sólo enseña productos monosustituidos y disustituidos para su uso por ser eficaces contra la recurrencia del cáncer.

Por lo tanto, no hay nada en D2 que de alguna manera indique que podría haber alguna razón para aumentar aún más el número de grupos sustituyentes. No hay indicios de que un patrón de trisustitución podría valer la pena intentarlo. Todo lo contrario. Se le dice a la persona versada en la materia que no debe tener trisustitución. Se le dice que el grupo R_6 debe ser hidrógeno.

Sin duda si un anillo trisustituido fuera obvio, ¿los inventores de D2 habrían pensado en esto? El hecho de que los autores de D2 enseñen explícitamente sólo productos monosustituidos y disustituidos, proporciona a la persona versada en la materia una enseñanza muy clara y directa de que éstos son los que funcionan.

Así, sin comprensión retrospectiva, la persona versada en la materia no tiene ninguna inspiración para tan siquiera pensar en utilizar un anillo trisustituido. Esto sería contrario a las enseñanzas de D2.

Por lo tanto, al evaluar D2 basado en lo que realmente revela y sin uso no permisible de la comprensión retrospectiva, no puede verse como obvio llegar a ningún producto en el que hay tres grupos sustituyentes en el anillo arilo en la posición 3. Ciertamente no sería obvio para la persona versada en la materia alcanzar un producto trisustituido con el patrón de sustitución específico de la invención reivindicada.

Cuando se considera si el objeto reivindicado constituye o no una solución obvia a un problema técnico objetivo, la cuestión a responder es si la persona versada en la materia, con la expectativa de resolver el problema, habría modificado la enseñanza en el documento de la técnica anterior más próximo a la luz de otras enseñanzas de la técnica anterior para llegar a la invención reivindicada (T 1014/07). Por lo tanto, el punto no es si la persona versada en la materia **hubiera podido** llegar a la invención modificando la técnica anterior, o incluso si los cambios requeridos son menores o mayores, sino más bien si, en espera de las ventajas efectivamente alcanzadas (es decir, a la luz del problema técnico abordado), lo hubiera **hecho debido a sugerencias en la técnica anterior** (T 219/87, T 455/94, T 414/98).

Estas sugerencias en la técnica son inexistentes. De hecho, D1 conduce la persona versada en la materia hacia la monosustitución y D2 conduce al experto en la monosustitución o disustitución y explícitamente lo aleja de la trisustitución. Ni D1 ni D2 de ninguna manera inducen a la persona versada en la materia a pensar en el uso de un anillo arilo trisustituido en la posición 3 en la que en este anillo trisustituido el (para) sustituyente R^{10} sea OH, y que los (orto/meta) sustituyentes R^{11} y R^{12} sean seleccionados independientemente del grupo que consiste en: OH, OMe, alquilo C1-C4 y F. Esto no es obvio a partir de las enseñanzas de la técnica citada.

Además, y de manera significativa, el patrón de sustitución específico como se reivindica está asociado con un beneficio técnico inesperado.

Tal como lo indicó el examinador en la opinión de búsqueda, la solicitud de patente presentada incluye datos que muestran el beneficio de los productos trisustituidos en comparación con los productos monosustituidos.

Sin embargo, el examinador observó que no había datos sobre el beneficio de los productos trisustituidos en comparación con un producto disustituido.

El examinador observó que los compuestos 3 y 7 de D2 podrían verse como estructuralmente más cercanos a la invención reivindicada.

En respuesta, en apoyo del efecto técnico para los materiales trisustituidos, presentamos por tanto el **Anexo A**, que expone los resultados cuando se prueban cuatro compuestos disustituidos y se comparan con un compuesto trisustituido de acuerdo con la invención. Los dos primeros de los compuestos disustituidos que se probaron corresponden con los compuestos 3 y 7 de D2.

El Anexo A muestra que los derivados de benzopirano con el patrón de trisustitución reivindicado específico son más eficaces en términos de su actividad frente a un intervalo de tipos de células de cáncer que los productos con un patrón de disustitución. Específicamente, se observan valores bajos de IC50 en las pruebas de actividad a través de un intervalo de tipos de células cancerosas, lo que indica que los compuestos son candidatos fuertes para uso en el tratamiento, porque son eficaces a bajas concentraciones.

En particular, del Anexo A se puede observar que mientras que todos los compuestos ensayados tuvieron algún efecto contra las células cancerosas, para el producto trisustituido de acuerdo con la invención (que es el

compuesto 9 en la presente solicitud) el valor de IC50 era de 0.5 μ m o menos para cada tipo de célula cancerosa. Se probaron siete líneas celulares de cáncer diferentes. En contraste, para los materiales disustituidos, los valores de IC50 oscilaron entre 0.8 a más de 30 μ m. Por lo tanto, ninguno de los productos disustituidos era tan eficaz contra ninguna línea celular individual, ni tampoco ninguno de los productos sustituidos era consistentemente eficaz a través del intervalo de líneas celulares.

De hecho, para cada tipo de célula cancerosa el valor IC50 para el más eficaz de los materiales disustituidos probados era al menos dos veces mayor que el valor IC50 para el producto trisustituido de acuerdo con la invención. Por lo tanto, para todos los tipos de células de cáncer probados, el producto trisustituido siempre fue significativamente más eficaz que los productos disustituidos.

Al comparar los compuestos SBP-391 y SBP-392 que son equivalentes a los compuestos 3 y 7 de D2 con el producto de la invención, puede observarse que para cada tipo de célula cancerosa el valor de IC50 para los materiales disustituidos de acuerdo con D2 era al menos 2.4 veces mayor que el valor de IC50 para el producto trisustituido de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, los derivados de benzopirano con el patrón de trisustitución reivindicado específico son técnicamente beneficiosos en comparación con los materiales monosustituidos (como se muestra en la solicitud tal como se presentó) y los materiales disustituidos (como se muestra en el Anexo A). Por lo tanto, esto respalda el hecho de que los materiales reivindicados no son evidentes a partir de D1 y D2, los cuales no revelan, enseñan ni sugieren los

derivados de benzopirano reivindicados con su patrón de trisustitución reivindicado específico.

Como apreciará el examinador, la jurisprudencia de las Juntas de Apelación ha establecido que, para determinar si la invención reivindicada, a partir de la técnica anterior más cercana y el problema técnico objetivo, habría sido obvia para la persona versada en la materia, es necesario aplicar el “acercamiento podría-habría” . Esto significa no preguntar si la persona versada en la materia **podría** haber llevado a cabo la invención, sino si lo **habría** hecho con la esperanza de resolver el problema técnico subyacente o en espera de alguna mejora o ventaja (T 2/83, DO 1984, 265 T 90/84, T 7/86, OJ 1988, 381, T 200/94, T 885/97).

No hay absolutamente ninguna enseñanza en D1 o D2 que sea tal que la persona versada en la materia hubiera modificado los derivados de benzopirano de la técnica anterior de tal modo que en su lugar hubieran tenido una trisustitución en el anillo arilo en la posición 3. No hay ciertamente ninguna razón por la que la persona versada en la materia hubiera estado motivada para usar trisustitución en este anillo con el patrón de sustitución según se reivindica, en donde el (para) sustituyente R^{10} sea OH, y que los (orto/meta) sustituyentes R^{11} y R^{12} sean seleccionados independientemente del grupo que consiste en: OH, OMe, alquilo C1-C4 y F.

No hay nada en la técnica citada que daría a la persona versada en la materia una expectativa de alguna mejora o ventaja asociada con este patrón de trisustitución reivindicado. Por el contrario, la lectura de D1 y D2 conduce al

experto hacia la monosustitución y la disustitución en el anillo arilo en la posición 3.

No hay ninguna razón a partir de D1 o D2, cuando sean leídos solos o en combinación, para creer que los derivados de benzopirano reivindicados serían notablemente eficaces en términos de su actividad contra una serie de tipos de células cancerosas.

Por supuesto, la jurisprudencia de las Juntas de Recurso establece claramente que debe evitarse un enfoque ex post facto al evaluar la actividad inventiva. Esto se reafirma en las Directrices para el Examen, G-VII, 8. Esto se aplica especialmente a las invenciones que a primera vista parecen evidentes, a las invenciones combinadas y donde la solución propuesta es supuestamente "simple" . La correcta aplicación del enfoque problema y solución evita este análisis inadmisibles a posteriori que se basa en el conocimiento de la invención (T 24/81, DO 1983, 133, T 564/89, T 645/92, T 795/93).

Cuando se hace la evaluación sin comprensión retrospectiva, se puede apreciar que la invención reivindicada no es obvia. Ni D1 ni D2 dirigen a la persona versada en la materia hacia los derivados específicos de benzopirano que se reivindican. No hay ninguna motivación proporcionada para cambiar el patrón de sustitución en el anillo de arilo en la posición 3, y ciertamente no para ser la combinación específica de grupos ahora requerida.

Por consiguiente, hay nivel inventivo en relación con D1 y D2.

Asuntos Formales - Claridad

Se sugirió que la reivindicación 1 no era clara debido al término "profármacos" , que fue mencionado como una definición por referencia a la actividad funcional sin que existiese una definición de los derivados que son "profármacos" .

En la reivindicación 1, el término "profármacos" se ha suprimido y por lo que se aborda esta objeción.

Se sugirió que las reivindicaciones 9 y 10 deberían depender de la reivindicación 1, porque incluyen todas las características de la reivindicación 1.

En las nuevas reivindicaciones, la reivindicación 9 y la reivindicación 10 se presentan como dependientes de la reivindicación 1. Por lo tanto, se aborda esta objeción.

Asuntos Formales – Descripción

La descripción ha sido revisada para ser coherente con las reivindicaciones, para eliminar el término "incorporado por referencia" , así como para reconocer la técnica citada D1-D4.

Conclusión

Se sostiene que la presente respuesta aborda todas las cuestiones planteadas hasta la fecha y que la solicitud se encuentra en una forma aceptable. Por lo tanto, solicitamos la emisión de la Regla 71 (3) de la Comunicación del CPE.

Sin embargo, en caso de que el examinador tenga alguna inquietud pendiente esperamos recibir una primera Comunicación de conformidad con el Artículo 94 (3) CPE.

Si en cualquier momento durante el examen de esta solicitud el examinador contempla la denegación de la solicitud se solicita por medio del presente un Procedimiento Oral como una precaución. Sin embargo, preferiríamos que la solicitud progrese a través de los canales habituales de Comunicaciones de conformidad con el artículo 94 (3) del CPE y/o conversaciones telefónicas informales.

Esperamos con interés los resultados del examen sustantivo a su debido tiempo.

Atentamente,

(Firmado electrónicamente)

Yvonne C. Johnson - Representante Profesional

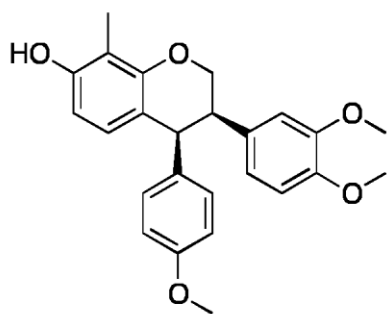
Barker Brettell LLP

Solicitud de Patente Europea No. 15746211.0 – ex PCT AU2015/050040

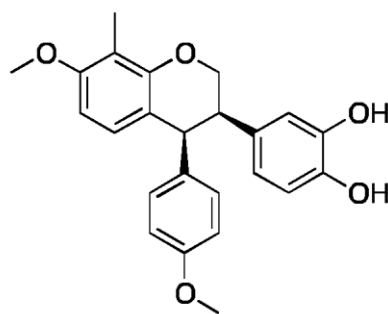
ANEXO A

Un numero de compuestos, tal como se indica a continuación, fueron sintetizados y probados para verificar la actividad antiproliferativa. Estos compuestos se eligieron para comparar la eficacia de benzopiranos que contienen un anillo arilo disustituido en la posición 3 con benzopiranos que contienen un anillo arilo trisustituido en la posición 3.

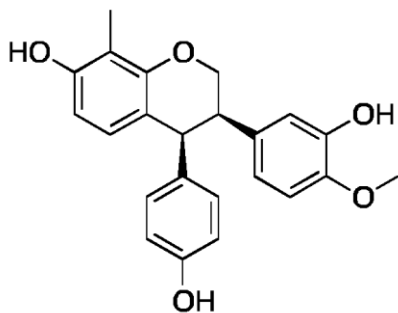
El GAD-305 es el compuesto 9 divulgado en la solicitud de patente PCT AU2015/050040 tal como fue presentada.



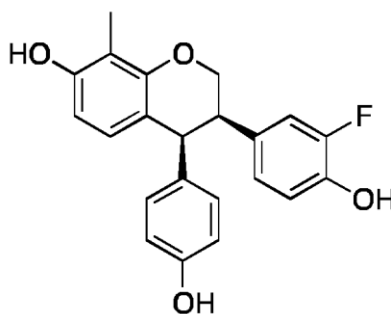
SBP-391



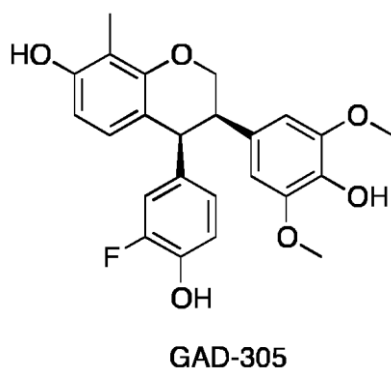
SBP-392



SBP-393

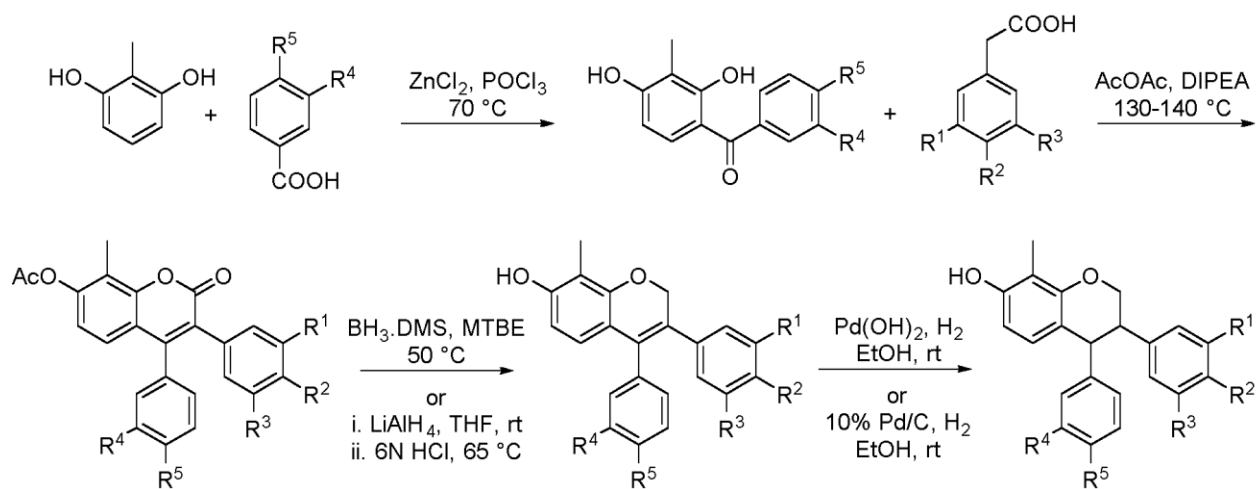


SBP-394



Síntesis del Compuesto

Esquema 1. Preparación de Compuestos SBP-391, SBP-393, SBP-394 y GAD-305



SBP-391: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^5 = \text{OMe}; \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$

SBP-393: $\text{R}^1 = \text{R}^5 = \text{OH}; \text{R}^2 = \text{OMe}; \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$

SBP-394: $\text{R}^1 = \text{F}; \text{R}^2 = \text{R}^5 = \text{OH}; \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$

GAD-305: $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{OMe}, \text{R}^2 = \text{R}^5 = \text{OH}; \text{R}^4 = \text{F}$

Preparación de (2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (4-metoxifenil) metanona

Se agitó una solución de ácido 4-ácido metoxibenzoico (2.45 g, 16.1 mmol) en POCl₃ (10 mL) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se añadió 2-metil resorcinol (2.00 g, 16.1 mmol), seguido de ZnCl₂ (4.83 g, 35.4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 70°C durante 2 h. Después de completar la reacción basada en TLC, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, luego se vertió en hielo triturado y se agitó durante 10 minutos. El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y éter de petróleo y se secó para obtener (2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (4-metoxifenil) metanona (3.50 g, 84%).

LCMS: m/z 259.38 [M + H]⁺

Otros análogos preparados por este método:

(2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (4-hidroxifenil) metanona (91%). LCMS: m/z 245.34 [M + H]⁺

(2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (3-fluoro-4-hidroxifenil) metanona (93%). LCMS: m/z 263.37 [M + H]⁺

Preparación de acetato de 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo

A una solución agitada de (2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (4-metoxifenil) metanona (1.00 g, 3.87 mmol) en AC₂O (5 ml) se le añadió ácido 2- (3,4-dimetoxifenil) acético (760 mg), seguido de DIPEA (3.1 ml, 18 mmol) se añadió gota a gota durante un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 140°C y se agitó durante 16 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato

de etilo. La capa orgánica se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto. El compuesto bruto se purificó por cromatografía en columna sobre 100-200 mallas de gel de sílice, utilizando acetato de etilo al 20-25% en éter de petróleo como eluyente, para proporcionar 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metilo-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo (600 mg, 34%). LCMS: m/z 461.25 $[M + H]^+$

Otros análogos preparados por este método:

4-(7-acetoxi-3-(3-acetoxi-4-metoxifenil)-8-metilo-2-oxo-2H-cromeno-4-ilo) acetato de fenilo (16%). LCMS: m/z 517.29 $[M + H]^+$

4-(7-acetoxi-3-(4-acetoxi-3-fluorofenil)-8-metilo-2-oxo-2H-cromeno-4-ilo) acetato de fenilo (16%). LCMS: m/z 505.30 $[M + H]^+$

3-(4-acetoxi-3,5-dimetoxifenil)-4-(4-acetoxi-3-fluorofenil)-8-metilo-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo) acetato de fenilo (40%). LCMS: m/z 565.43 $[M + H]^+$

Preparación de 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol

A una solución agitada de 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo acetato (0.60 g, 1.3 mmol) en MTBE (12 mL) se le añadió $BH_3 \cdot DMS$ (8.4 mL, 140 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 50°C durante 2 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en

solución de HCl 6 N enfriada en hielo (50 ml). La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol (0.6 g, crudo) que fue utilizado sin ninguna purificación adicional. LCMS: m/z 405.44 $[M + H]^+$

Otros análogos preparados por este método:

3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol (82%).
LCMS: m/z 377.25 $[M + H]^+$

3-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol (91%).
LCMS: m/z 365.21 $[M + H]^+$

Preparación de 4-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol

3-(4-acetoxi-3,5-dimetoxifenil)-4-(4-acetoxi-3-fluorofenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo (10.0 g, 17.7 mmol) en THF (50 mL) se añadió a una solución agitada de LAH (3.36 g, 95.6 mmol) en THF (50 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 8 h. Se añadió lentamente HCl 6 N (80 ml), y después la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 12 h. El progreso de la reacción se controló por TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto. El compuesto bruto se trituroó con etanol para dar 4-(3-fluoro-4 -

hidroxifenil)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol (3.0 g, 40%). LCMS: m/z 425.42 $[M + H]^+$

Preparación de SBP-391, *3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metilcromeno-7-ol*

A solución agitada de 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-7-ol (0.60 g, 1.5 mmol) en etanol (10 mL) se purgó con nitrógeno. Después se añadió 20% de Pd (OH)₂ (200 mg) y la mezcla de reacción se agitó bajo un balón de hidrógeno durante 16 h. El progreso de la reacción se controló mediante LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celita y se lavó con etanol. El filtrado resultante se concentró a presión reducida para dar el producto bruto. El compuesto bruto se purificó mediante Prep-HPLC para proporcionar 3-(3,4-dimetoxifenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metilcromeno-7-ol (62 mg, 10%) en forma de un sólido blanquecino.

¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): delta 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.54-6.48 (m, 3H), 6.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.37-4.18 (m, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.45-3.41 (m, 1H), 2.04 (s, 3H). LCMS: m/z 407.49 $[M + H]^+$

Preparación de SBP-393, *3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-metilcromeno-7-ol*

A solución agitada de 3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-2H-cromeno-7-ol (0.60 g, 1.6 mmol) en etanol (10 mL) se purgó con nitrógeno.

Después se añadió 10% de Pd en carbono (300 mg) y la mezcla de reacción se agitó bajo un hidrógeno (50 psi) durante 16 h. El progreso de la reacción se controló mediante LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celita y se lavó con etanol. El filtrado resultante se concentró a presión reducida para dar el producto bruto. El compuesto bruto se purificó mediante Prep-HPLC para proporcionar 3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-metilcromeno-7-ol (42 mg, 7%) como un sólido anaranjado.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): delta 9.04 (br s, 2H), 8.83 (br s, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.36 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.11 (dd, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.25-4.18 (m, 2H), 4.09 (br d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.39 – 3.34 (m, 1H), 2.03 (s, 3H). LCMS: m/z 379.01 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Otros análogos preparados por este método:

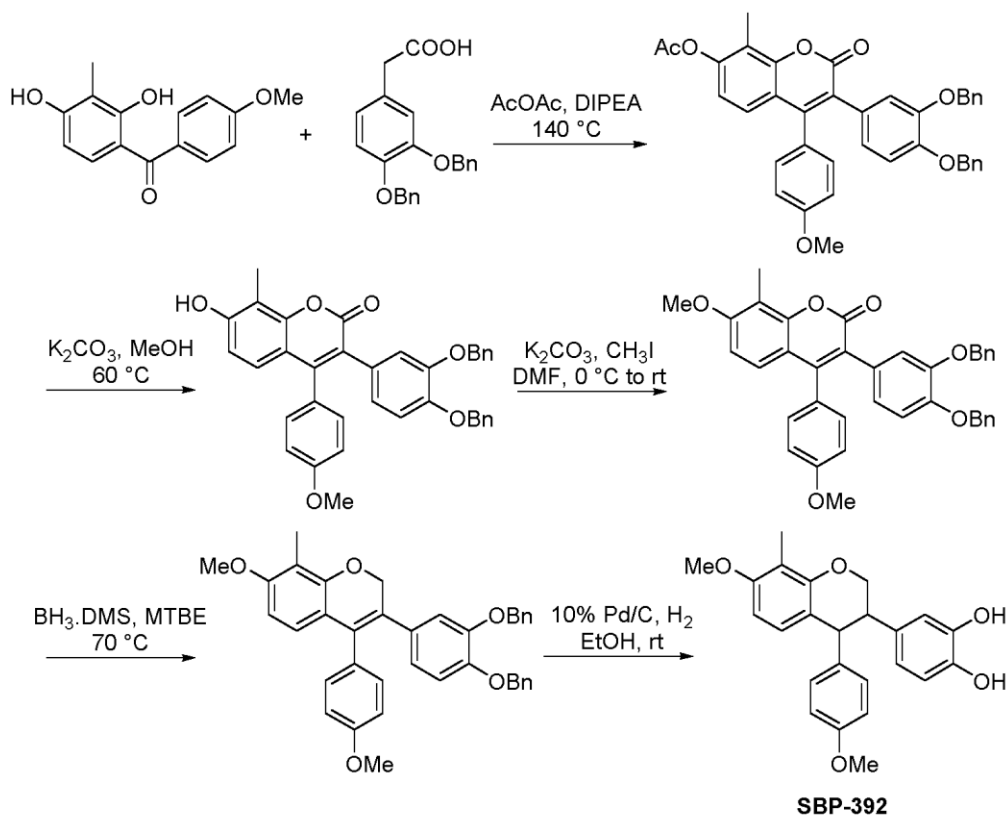
SBP-394, 3-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-4-(4-hidroxifenil)-8-metilcromeno-7-ol (9%)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): delta 9.56 (br s, 1H), 9.05 (br s, 2H), 6.71 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.49-6.31 (m, 8H), 4.27-4.17 (m, 2H), 4.10 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.42-3.36 (m, 1H), 2.03 (s, 3H). LCMS: m/z 367.45 $[\text{M} + \text{H}]^+$

GAD-305, 4-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-8-metilcromeno-7-ol (60%)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.53 (br s, 1H), 9.12 (br s, 1H), 8.13 (br s, 1H), 6.69 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.27-6.23 (m, 2H), 5.67 (s, 2H), 4.29-4.12 (m, 3H), 3.54 (s, 6H), 3.40-3.33 (m, 1H), 2.04 (s, 3H). LCMS: m/z 427.00 [$M + H$] $^+$

Esquema 2. Preparación del Compuesto SBP-392



Preparación de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo acetato

A una solución agitada de (2,4-dihidroxi-3-metilfenil) (4-metoxifenil) metanona (518 mg, 2.01 mmol) en AC_2O (7.5 mL) se le añadió ácido 2-(3,4-bis (benciloxi) fenil) acético (700 mg, 2.01 mmol), seguido de DIPEA (3.0 mL, 17

mmol) se añadió gota a gota durante un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 140°C y se agitó durante 18 h. El progreso de la reacción se monitorizó por TLC y LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para obtener 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo acetato (550 mg, crudo) que se usó sin purificación adicional. LCMS: m/z 613.03 [M + H]⁺

Preparación de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-hidroxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-2-ona

A una solución agitada de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo acetato (500 mg, 0.816 mmol) en metanol (10 mL) se le añadió K₂CO₃ (350 mg, 2.53 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 60°C y se agitó durante 18 h. El progreso de la reacción se monitorizó por TLC y LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución de salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para obtener el producto crudo. El compuesto crudo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-hidroxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-2-ona (100 mg, 21%). LCMS: m/z 571.47 [M + H]⁺

Preparación de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-2-ona

A una solución agitada de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-hidroxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2-oxo-2H-cromeno-7-ilo acetato (600 mg, 1.05 mmol) en DMF (5 mL) a temperatura ambiente se le añadió K_2CO_3 (435 mg, 3.15 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 min. A esta mezcla, se añadió yoduro de metilo (0.20 mL, 3.2 mmol) gota a gota a 0°C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con solución de salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el producto crudo. El compuesto crudo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para proporcionar 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-2-ona (200 mg, 33%). LCMS: m/z 585.34 $[M + H]^+$

Preparación de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno

A una solución agitada de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno-2-ona (0.20 g, 0.34 mmol) en MTBE (5 mL) se le añadió $BH_3 \cdot DMS$ (2.8 mL, 30 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 50°C durante 2 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una solución de HCl 6 N enfriada en hielo (20 mL). La mezcla de reacción se

extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil- 2H-cromeno (0.2 g, crudo) que se usó sin purificación adicional. LCMS: m/z 571.47 $[M + H]^+$

Preparación de SBP - 392, solución de 4-(7- metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metilcromeno-3-ilo) benceno -1,2- diol

Una solución agitada de 3-(3,4-bis (benciloxi) fenil)-7-metoxi-4-(4-metoxifenil)-8-metil-2H-cromeno (40 mg, 0.071 mmol) y ácido sulfónico de metano (0.03 mg, car.) en etanol (10 mL) se purgó con nitrógeno. Después se añadió Pd en Carbono (40 mg) y la mezcla de reacción se agitó bajo un hidrógeno (50 psi) durante 24 h. El progreso de la reacción se controló mediante LCMS. Después del consumo completo del material de partida, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celita y se lavó con etanol. El filtrado resultante se concentró a presión reducida para dar el producto bruto. El compuesto bruto se purificó mediante Prep-HPLC para proporcionar 4-(7- metoxi-4-(4-metoxifenil)-8- metilcromeno-3-ilo) benceno -1,2- diol (5 mg, 12%) como un sólido blanquecino.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): delta 6.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.47 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.07 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.37-4.31 (m, 1H), 4.23-4.19 (m, 2H), 3.79 (s, 3H) , 3.69 (s, 3H), 3.40-3.36 (m, 1H), 2.11 (s, 3H). LCMS: m/z 393.52 $[M + H]^+$

Prueba de actividad anti-proliferativa de los compuestos

Se probó la capacidad de los cinco compuestos (SBP-391 a SBP-394, y GAD-305) para inhibir la proliferación de células cancerosas. A este respecto, se realizaron pruebas para evaluar la inhibición de la proliferación de células cancerosas representativas de:

- Carcinoma de pulmón de células no pequeñas (A549),
- Cáncer de ovario (A2780),
- Cáncer de próstata (DU145 y PC3),
- Cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231),
- Cáncer pancreático (MiaPaCa-2),
- Glioblastoma multiforme (U87-MG).

Se sembró un número predeterminado de células calculado a partir de pruebas de crecimiento celular para cada una de las líneas celulares empleadas en su medio de cultivo respectivo (utilizando parámetros de cultivo ATCC - <http://www.atcc.org>) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en placas de cultivo de 96 pocillos.

Una vez unidas, cada línea celular fue expuesta a concentraciones crecientes de cada análogo respectivo (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μ m para SBP-391-394; 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 μ m para GAD-305), se cultivaron durante otras 72 horas y se expusieron al reactivo luminiscente Cell-Titre (Promega, Cat # G7573, 100 μ L/pocillo) durante 30 minutos adicionales para evaluar la viabilidad celular.

La luminiscencia fue capturada utilizando un lector Multivalor EnVision y los datos para cada concentración analógica se normalizaron, como un porcentaje, al control sin tratamiento.

Se prepararon curvas de respuesta a la dosis y se determinaron los valores de la concentración efectiva máxima media (EC_{50}) utilizando Prisma Graph Pad 6 (pendiente variable de respuesta de dosis sigmoidea de regresión no lineal).

Resultados

Identificación de Compuesto	A549	A2780	DU145	MDA-MB-231	MIA-PACA2	PC3	U87MG
	Valores IC_{50} , μM						
SBP-391	1.6	2.3	0.9	2.1	1.2	6.1	2.7
SBP-392	17.7	22.3	>30	21.4	>30	>30	>30
SBP-393	1.2	0.8	1.0	2.8	0.9	3.0	1.9
SBP-394	1.2	0.7	0.8	2.2	1.0	1.9	1.6
GAD-305	0.5	0.2	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4