

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 339 450**

⑯ Int. Cl.:

**C07J 41/00** (2006.01)

**C07J 43/00** (2006.01)

**A61K 31/56** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **04713124 .8**

⑯ Fecha de presentación : **20.02.2004**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1608671**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

⑭ Título: **Derivados de estrógenos como inhibidores de esteroide sulfatasa.**

⑯ Prioridad: **24.03.2003 GB 0306717**  
**07.07.2003 GB 0315885**

⑬ Titular/es: **Sterix Limited**  
**190 Bath Road**  
**Slough, Berkshire SL1 3XE, GB**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.05.2010**

⑯ Inventor/es: **Leese, Mathew;**  
**Purohit, Alan;**  
**Reed, Michael John;**  
**Newman, Simon Paul;**  
**Chander, Surinder K.;**  
**Jourdan, Fabrice y**  
**Potter, Barry V. L.**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.05.2010**

⑯ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados de estrógenos como inhibidores de esteroide sulfatasa.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto.

10 En particular, la presente invención se refiere a un compuesto y a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto. La presente invención se refiere asimismo a la utilización del compuesto o la composición en aplicaciones de terapia.

### Antecedentes de la invención

15 Las pruebas sugieren que los estrógenos son los principales mitógenos implicados en la estimulación del crecimiento de tumores en tejidos endocrino-dependientes, tales como las mamas y el endometrio. Aunque las concentraciones plasmáticas de estrógenos son similares en mujeres con o sin cáncer de mama, los niveles de estradiol y estrona en el tumor de mama son significativamente superiores que en la sangre o el tejido de mama normal. Se piensa que la síntesis *in situ* de estrógeno realiza una contribución importante a los altos niveles de estrógenos en tumores y por tanto los inhibidores, en particular inhibidores específicos, de la biosíntesis de estrógenos presentan un valor potencial para el tratamiento de tumores endocrino-dependientes.

20 A lo largo de las últimas dos décadas, ha habido un considerable interés en el desarrollo de inhibidores de la ruta de la aromatasa, que convierte el precursor de andrógenos androstendiona en estrona. Sin embargo, ahora hay pruebas de que la ruta de la estrona fosfatasa (E1-STS), es decir, la hidrólisis de sulfato de estrona para dar estrona (E1S en E1), y la aromatasa (es decir, la conversión de androstendiona en estrona) explican la producción de estrógenos en tumores de mama.

25 Las figuras 1 y 2 son diagramas esquemáticos que muestran algunas de las enzimas implicadas en la síntesis *in situ* de estrona a partir de sulfato de estrona, estradiol y androstendiona.

30 En la figura 2, que muestra esquemáticamente el origen de los esteroides estrogénicos en mujeres posmenopáusicas, "RE" indica receptor de estrógeno, "DHA-S" indica sulfato de dehidroepiandrosterona, "Adiol" indica androstendiol, "E1-STS" indica estrona sulfatasa, "DHA-STS" indica DHA-sulfatasa, "Adiol-STS" indica Adiol sulfatasa y "17B-HSD" indica estradiol 17B-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

35 Tal como puede observarse, las dos principales enzimas que están implicadas en la síntesis de estrógenos periférica son la enzima aromatasa y la enzima estrona sulfatasa.

40 En resumen, la enzima aromatasa convierte la androstendiona, que la secreta en grandes cantidades la corteza suprarrenal, en estrona. Recientes informes han sugerido que algunas flavonas podrían inhibir la actividad aromatasa.

45 Sin embargo, mucha de la estrona formada de este modo se convierte en sulfato de estrona (E1S) y hay ahora un considerable conjunto de pruebas que muestran que el E1S en el plasma y el tejido actúa como un depósito para la formación de estrona mediante la acción de la estrona sulfatasa.

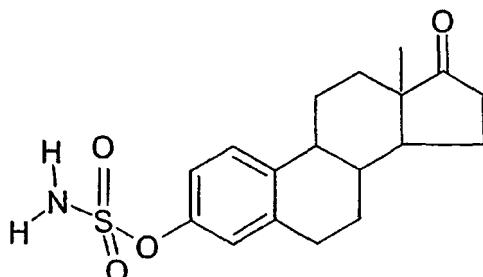
50 En este sentido, actualmente se cree que la ruta de la estrona sulfatasa (E1-STS), es decir, la hidrólisis del sulfato de estrona para dar estrona (E1S en E1) es una fuente de estrógeno principal en tumores de mama. Esta teoría está apoyada por una modesta reducción de la concentración plasmática de estrógenos en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama tratadas mediante inhibidores de aromatasa, tales como aminoglutetimida y 4-hidroxiandrostendiona y también por el hecho de que la concentración plasmática de E1S en estas pacientes tratadas con inhibidores de aromatasa permanece relativamente alta. La larga semivida de E1S en la sangre (10-12 h) en comparación con los estrógenos no conjugados (20 min.) y los altos niveles de actividad esteroide sulfatasa en el hígado y en tejidos de mama malignos y normales, también apoyan a esta teoría.

55 Por tanto, la formación de estrógenos en tejidos endometriales y de mama malignos a través de la ruta de la sulfatasa realiza una importante contribución a la alta concentración de estrógenos que están presentes en estos tumores.

60 El documento PCT/GB92/01587 enseña nuevos inhibidores de esteroide sulfatasa y composiciones farmacéuticas que los contienen para su utilización en el tratamiento de tumores dependientes de estrona, especialmente cáncer de mama. Estos inhibidores de esteroide sulfatasa son ésteres de sulfamato, tales como N,N-dimetilestrona-3-sulfamato y, preferentemente, estrona-3-sulfamato (conocido de otra forma como "EMATE"). El EMATE presenta la siguiente estructura:

5

10



Es conocido que el EMATE es un potente inhibidor de E1-STS puesto que muestra más del 99% de inhibición de la actividad E1-STS en células MCF-7 intactas a 0,1 nM. El EMATE también inhibe la enzima E1-STS de una manera dependiente de la concentración y del tiempo, lo que indica que actúa como un inactivador activo dirigido al sitio. Aunque el EMATE se diseñó originalmente para la inhibición de E1-STS, también inhibe la dehidroepiandrosterona sulfatasa (DHA-STS), que es una enzima que se cree que presenta un papel central en la regulación de la biosíntesis del esteroide estrogénico androstendiol. Además, hay ahora pruebas que sugieren que el androstendiol puede ser de importancia incluso mayor como promotor del crecimiento de tumores de mama. El EMATE es también activo *in vivo* puesto que resultó una inhibición casi completa de las actividades E1-STS (99%) y DHA-STS (99%) en el hígado de rata cuando se administró o bien por vía oral o bien por vía subcutánea. Además, se ha demostrado que el EMATE presenta un efecto de potenciación de la memoria en las ratas. Estudios en ratones han sugerido una asociación entre la actividad DHA-STS y la regulación de parte de la respuesta inmunitaria. Se piensa que esto también puede producirse en seres humanos. El átomo de O puente del resto sulfamato en el EMATE es importante para la actividad inhibidora. Por tanto, cuando se sustituye el átomo de 3-O por otros heteroátomos como en estrona-3-N-sulfamato y estrona-3-S-sulfamato, estos análogos son inactivadores no dependientes del tiempo más débiles.

Además de la estrona, el otro esteroide importante con propiedades estrogénicas que producen las mujeres posmenopáusicas es el androstendiol (véase la figura 2).

El androstendiol, aunque es un andrógeno, puede unirse al receptor de estrógenos (RE) y puede estimular el crecimiento de células de cáncer de mama positivas para RE y el crecimiento de tumores mamarios inducidos por carcinógenos en la rata. De manera importante, en mujeres posmenopáusicas el 90% del androstendiol producido se origina a partir del andrógeno sulfato de dehidroepiandrosterona (DHA-S) que secreta en grandes cantidades la corteza suprarrenal. El DHA-S se convierte en DHA mediante la DHA sulfatasa, que puede ser igual que, o diferente de, la enzima estrona sulfatasa, que es responsable de la hidrólisis de E1S.

Durante los últimos 10-15 años, se ha llevado a cabo una considerable investigación para desarrollar potentes inhibidores de aromatasa, algunos de los cuales se comercializan actualmente. Sin embargo, en tres recientes informes de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama que recibieron terapia con inhibidores de aromatasa, las concentraciones plasmáticas de E1S permanecieron entre 400-1000 pg/ml.

Por tanto, en resumen, se cree que la síntesis *in situ* de estrógeno realiza una importante contribución a los altos niveles de estrógenos en tumores y por tanto los inhibidores específicos de la biosíntesis estrógenos son de valor potencial para el tratamiento de tumores endocrino-dependientes.

Además, aún cuando la formación de estrógenos en tejidos endometriales y de mama malignos a través de la ruta de la sulfatasa realiza una contribución importante a la alta concentración de estrógenos, hay todavía otras rutas enzimáticas que contribuyen a la síntesis *in vivo* de estrógeno.

### Sumario de aspectos de la presente invención

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los compuestos esteroideos que portan un grupo en el anillo D que se selecciona de grupos que son o que comprenden un grupo nitrilo podrían utilizarse como inhibidores de esteroide sulfatasa (STS) eficaces; moduladores del ciclo celular; moduladores de la apoptosis; moduladores del crecimiento celular; agentes de prevención y/o supresión de la captación de glucosa; inhibidores o agentes de prevención de la angiogénesis tumoral; agentes de alteración de los microtúbulos; y/o inductores de la apoptosis.

Los compuestos de la presente invención pueden comprender otros sustituyentes. Estos otros sustituyentes, por ejemplo, pueden aumentar adicionalmente la actividad de los compuestos de la presente invención y/o aumentar la estabilidad (*ex vivo* y/o *in vivo*).

### Aspectos detallados de la presente invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende i) un compuesto tal como se define en las reivindicaciones y ii) un modificador de la respuesta biológica.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, y (b) un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, para su utilización en medicina.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o inhibir el crecimiento tumoral.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de actividad esteroide sulfatasa (STS); ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de actividad esteroide sulfatasa (STS) adversa; ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para uno o más de inhibir la actividad esteroide sulfatasa (STS); modular el ciclo celular; modular la apoptosis; modular el crecimiento celular; prevenir y/o inhibir la captación de glucosa por un tumor; prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral; alterar los microtúbulos; e inducir la apoptosis.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad esteroide sulfatasa (STS).

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para modular el crecimiento celular.

Según un aspecto de la presente invención, está previsto un compuesto identificado mediante el procedimiento de la presente invención.

La presente invención también abarca los nuevos compuestos de la presente invención (tales como los presentados en la presente memoria), así como procedimientos para preparar los mismos (tales como los presentados en la presente memoria) así como nuevos productos intermedios (tales como los presentados en la presente memoria) para su utilización en los esos procedimientos.

### Aspectos generales

Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis; comprendiendo la composición

i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y  
ii) un modificador de la respuesta biológica.

Según otro aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de ciclo celular adverso; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

ES 2 339 450 T3

Según otro aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de ciclo celular adverso; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis;

## 5 comprendiendo la composición

- 10 i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y  
ii) un modificador de la respuesta biológica.

15 Según un aspecto general adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para uno o más de modular el ciclo celular; modular la apoptosis; modular el crecimiento celular; prevenir y/o suprimir la captación de glucosa por un tumor; prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral; alterar los microtúbulos; e inducir la apoptosis; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto general adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para uno o más de modular el ciclo celular; modular la apoptosis; modular el crecimiento celular; prevenir y/o suprimir la captación de glucosa por un tumor, prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral; alterar los microtúbulos; e inducir la apoptosis, comprendiendo la composición

- 25 i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y  
ii) un modificador de la respuesta biológica.

30 Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para modular el crecimiento celular; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para modular el crecimiento celular, comprendiendo la composición

35 i) un compuesto tal como se define en reivindicación 1; y  
ii) un modificador de la respuesta biológica.

40 Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con la anhidrasa carbónica; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

45 Según un aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con la anhidrasa carbónica; comprendiendo la composición

- 50 i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y  
ii) un modificador de la respuesta biológica.

55 Según otro aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con actividad anhidrasa carbónica adversa; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según otro aspecto general de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con actividad anhidrasa carbónica adversa; comprendiendo la composición

60 i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y  
ii) una difusión de la reivindicación 1.

Según un aspecto general adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto en la fabricación de un medicamento para modular la actividad anhidrasa carbónica; siendo el compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto general adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de una composición en la fabricación de un medicamento para modular la actividad anhidrasa carbónica, comprendiendo la composición

- i) un compuesto tal como se define en la reivindicación 1; y
  - ii) un modificador de la respuesta biológica.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se tratan ahora bajo los encabezamientos de sección apropiados. Sin embargo, las enseñanzas bajo cada sección no se limitan necesariamente a cada sección particular.

## Algunas ventajas

15 Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden inhibir la actividad esteroide sulfatasa (STS).

Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden modular el ciclo celular.

20 Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden modular la apoptosis.

Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden modular el crecimiento celular.

Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden prevenir y/o suprimir la captación de glucosa por un tumor.

30 Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral.

Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden alterar los microtúbulos.

35 En este sentido, los microtúbulos, junto con los microfilamentos y los filamentos intermedios forman parte del sistema citoesquelético de una célula. Los microtúbulos son responsables de muchos de los movimientos celulares, incluyendo los ejemplos el batido de los cilios y los flagelos y el transporte de vesículas de membrana en el citoplasma. 40 Todos estos movimientos resultan de la polimerización y despolimerización de microtúbulos o de las acciones de las proteínas motoras de microtúbulos, dineína y kinesinas. Algunos otros movimientos celulares, tales como la alineación y separación de los cromosomas durante la meiosis y mitosis resultan de ambos mecanismos. Los microtúbulos también dirigen el movimiento celular pero en algunos casos los microtúbulos sirven meramente para funciones estructurales.

45 Un microtúculo está compuesto por subunidades que son heterodímeros de monómeros de  $\beta$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Hay dos poblaciones de microtúculos: microtúculos estables, de vida larga y microtúculos dinámicos, de vida corta. Los microtúculos dinámicos se encuentran cuando las estructuras de microtúculos necesitan ensamblarse y desensamblarse rápidamente. Por ejemplo, durante la mitosis, la red de microtúculos citosólicos, característica de las células en interfase, desaparece y la tubulina de la misma se utiliza para formar el huso acromático que divide los cromosomas equitativamente entre las células hijas. Cuando finaliza la mitosis, el huso se desensambla y vuelve a formarse la red de microtúculos en interfase.

50

Los fármacos que inhiben la mitosis proporcionan un medio útil para manipular los microtúbulos en una célula. Tres fármacos: colchicina, vinblastina y taxol (todos purificados a partir de plantas) han demostrado ser sondas muy poderosas de la función de los microtúbulos debido parcialmente a que se unen sólo a tubulina o microtúbulos y no a otras proteínas y también debido a que sus concentraciones en las células pueden controlarse fácilmente.

60 Debido a sus efectos sobre la mitosis, los inhibidores de microtúbulos se han utilizado ampliamente para tratar enfermedades y más recientemente como agentes anticancerígenos, dado que el bloqueo de la formación del huso inhibirá preferentemente células que se dividen rápidamente como las células cancerosas. Un agente contra el cáncer de ovario sumamente eficaz es el taxol. En células de cáncer de ovario, que experimentan divisiones celulares rápidas, la mitosis se bloquea mediante el tratamiento con taxol mientras que otras funciones llevadas a cabo por microtúbulos intactos no se ven afectadas. Puede encontrarse una revisión exhaustiva de los microtúbulos en "Molecular Cell Biology" (Ed: Lodish *et al* 1995 WH Freeman y Co. Nueva York págs. 1051-1122).

Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos de la presente invención pueden inducir la apoptosis.

# ES 2 339 450 T3

La apoptosis se induce mediante fármacos que seleccionan como diana los MT, un proceso que puede implicar la fosforilación (e inactivación) del regulador de la apoptosis, la proteína bcl-2 (Halder, Cancer Res. 57: 229, 1997).

5 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el compuesto proporciona un tratamiento eficaz del cáncer.

Otra ventaja de los compuestos de la presente invención es que pueden ser potentes *in vivo*.

10 Algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser compuestos no estrogénicos. En la presente memoria, la expresión "no estrogénico" significa que no muestra o sustancialmente no muestra actividad estrogénica. En la presente memoria, mediante la expresión "no estrogénico" quiere decirse que no muestra o sustancialmente no muestra actividad estrogénica sistémica, tal como se determina mediante el protocolo 4.

15 Para algunas aplicaciones, los compuestos presentan un efecto estrogénico.

Otra ventaja es que algunos de los compuestos pueden no ser capaces de metabolizarse para dar compuestos que muestran o inducen actividad hormonal.

20 Para algunas aplicaciones, preferentemente los compuestos presentan una acción reversible.

Para algunas aplicaciones, preferentemente los compuestos presentan una acción irreversible.

25 Algunos de los compuestos de la presente invención son también ventajosos porque pueden ser activos por vía oral.

30 Algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, tal como cáncer de mama, así como (o como alternativa) estados no malignos, tales como la prevención y/o el tratamiento de estados inflamatorios, tales como estados asociados con uno o más de: autoinmunidad, incluyendo por ejemplo artritis reumatoide, diabetes tipo I y II, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, tiroditis, vasculitis, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, trastornos cutáneos, por ejemplo acné, psoriasis y dermatitis por contacto; enfermedad de injerto contra huésped; eccema; asma y rechazo de órganos tras el trasplante. Los compuestos de la presente invención son particularmente útiles cuando puede necesitarse que se administren productos farmacéuticos a una edad temprana.

35 En una forma de realización, los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer de mama.

40 Por tanto, se cree también que algunos de los compuestos de la presente invención presentan usos terapéuticos distintos del tratamiento de cánceres endocrino-dependientes, tales como el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

45 Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se tratan ahora bajo los encabezamientos de sección apropiados. Sin embargo, las enseñanzas bajo cada sección no se limitan necesariamente a cada sección particular.

## Aspectos preferibles

### *Compuesto*

50 Tal como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

55 En un aspecto preferido, el compuesto es capaz de uno o más de inhibir la actividad esteroide sulfatasa (MTS); modular el ciclo celular; modular la apoptosis; modular el crecimiento celular; prevenir y/o suprimir la captación de glucosa por un tumor, prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral; alterar los microtúbulos; e inducir la apoptosis.

### *Sistema de anillos esteroideos*

60 El compuesto de la presente invención presenta un componente de anillo esteroideo, es decir, un esqueleto de ciclopentanofenantreno, o bioésteres del mismo.

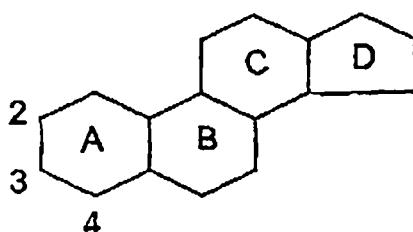
# ES 2 339 450 T3

Tal como se conoce bien en la técnica, una estructura de anillo esteroideo clásico presenta la fórmula genérica de;

17

5

10



15

En la fórmula anterior, los anillos se han marcado y numerado de manera convencional.

20

En un aspecto, la estructura de anillo esteroideo puede contener uno o más de C, H, O, N, P, halógeno (incluyendo Cl, Br y I), S y P.

25

Por lo menos uno de los grupos cíclicos de la estructura de anillo esteroideo puede ser un grupo heterocíclico (un heterociclo) o un grupo no heterocíclico.

25

Por lo menos uno de los grupos cíclicos de la estructura de anillo esteroideo puede ser una estructura de anillo saturado o una estructura de anillo insaturado (tal como un grupo arilo).

Preferentemente, por lo menos uno de los grupos cíclicos de la estructura de anillo esteroideo es un anillo de arilo.

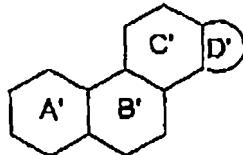
30

Un ejemplo de un bioéster es cuando uno cualquiera o más de los anillos A, B, C y D es un anillo heterocíclico y/o cuando uno cualquiera o más de los anillos A, B, C y D se ha sustituido y/o cuando uno cualquiera o más de los anillos A, B, C y D se ha modificado; pero presentando el bioéster propiedades esteroideas.

En este sentido, la estructura de una estructura de anillo esteroideo preferida puede presentarse como:

35

40



en la que cada anillo A', B', C' y D' representa independientemente un anillo heterocíclico o un anillo no heterocíclico, anillos que pueden estar independientemente sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados.

45

A modo de ejemplo, uno cualquiera o más de los anillos A', B', C' y D' puede estar independientemente sustituido con grupos adecuados, tales como un grupo alquilo, un grupo alilo, un grupo hidroxilo, un grupo halo, un grupo hidrocarbilo, un grupo oxihidrocarbilo, etc.

50

55

La expresión "grupo hidrocarbilo" tal como se utiliza en la presente memoria significa un grupo que comprende por lo menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más de otros de sustituyentes adecuados. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo hidrocarburo, un grupo N-acilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan necesariamente estar unidos entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden unirse a través un grupo o elemento adecuado. Por tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo hidrocarbilo es un grupo hidrocarburo.

60

65

En la presente memoria, el término "hidrocarburo" significa cualquiera de entre un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo acilo, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cílicos, o un grupo arilo. El término hidrocarburo también incluye esos grupos pero en los que se han producido opcionalmente sustituciones. Si el hidrocarburo es una estructura ramificada que presenta sustituyente(s) sobre la misma, entonces la sustitución puede ser o bien en la estructura principal del hidrocarburo o bien en la ramificación; alternativamente las sustituciones pueden ser en la estructura principal del hidrocarburo y en la ramificación.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo hidrocarbilo es un grupo oxihidrocarbilo.

## ES 2 339 450 T3

La expresión “grupo oxihidrocarbilo” tal como se utiliza en la presente memoria significa un grupo que comprende por lo menos C, H y O y puede comprender opcionalmente uno o más de otros sustituyentes adecuados. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo oxihidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan necesariamente estar unidos entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden unirse a través de un grupo o elemento adecuado. Por tanto, el grupo oxihidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, azufre y nitrógeno.

10 En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo oxihidrocarbilo es un grupo oxihidrocarburo.

En la presente memoria, el término “oxihidrocarburo” significa cualquiera de entre un grupo alcoxilo, un grupo oxialquenilo, un grupo oxialquinilo, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cílicos, o un grupo oxiarilo. El término oxihidrocarburo también incluye esos grupos pero en los que se han producido opcionalmente sustituciones. Si el oxihidrocarburo es una estructura ramificada que presenta sustituyente(s) sobre la misma, entonces la sustitución puede ser o bien en la estructura principal del hidrocarburo o bien en la ramificación; alternativamente las sustituciones pueden ser en la estructura principal del hidrocarburo y en la ramificación.

20 Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo es un grupo alcoxilo. Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo es de fórmula  $C_{1-6}O$  (tal como un  $C_{1-3}O$ ).

Un ejemplo de D' es un anillo no heterocíclico de cinco o seis miembros que presenta por lo menos un sustituyente.

25 En una forma de realización preferida, el anillo D' está sustituido con un grupo etinilo.

Si cualquiera de entre los anillos A', B', C' y D' es un anillo heterocíclico, entonces preferentemente ese anillo heterocíclico comprende una combinación de átomos de C y por lo menos un átomo de N y/o por lo menos un átomo de O. Pueden estar presentes en el anillo otros átomos heterocíclicos.

30 Los ejemplos de anillos con núcleos esteroideos preferidos, adecuados, A'-D' de los compuestos de la presente invención incluyen anillos A-D de estrona y dehidroepiandrosterona.

35 Los anillos con núcleos esteroideos preferidos A'-D' de los compuestos de la presente invención incluyen anillos A-D de:

estronas y estronas sustituidas, a saber:

40 estrona

2-OH-estrona

2-alcoxi-estrona (tal como alcoxi-estrona  $C_{1-6}$ , tal como 2-metoxi-estrona)

45 4-OH-estrona

6 $\alpha$ -OH-estrona

7 $\alpha$ -OH-estrona

50 16 $\alpha$ -OH-estrona

16 $\beta$ -OH-estrona

55

estradioles y estradioles sustituidos, a saber:

2-OH-17 $\beta$ -estradiol

60 2-alcoxi-17 $\beta$ -estradiol (tal como alcoxi-17 $\beta$ -estradiol  $C_{1-6}$ , tal como 2-metoxi-17 $\beta$ -estradiol)

4-OH-17 $\beta$ -estradiol

6 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

65 7 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

2-OH-17 $\alpha$ -estradiol

# ES 2 339 450 T3

2-alcoxi-17 $\alpha$ -estradiol (tal como alcoxi-17 $\alpha$ -estradiol C<sub>1-6</sub>, tal como 2-metoxi-17 $\alpha$ -estradiol)

4-OH-17 $\alpha$ -estradiol

5 6 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

7 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

10 16 $\alpha$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

16 $\alpha$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

16 $\beta$ -OH-17 $\alpha$ -estradiol

15 16 $\beta$ -OH-17 $\beta$ -estradiol

17 $\alpha$ -estradiol

17 $\beta$ -estradiol

20 17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -estradiol

17 $\beta$ -etinil-17 $\alpha$ -estradiol

25 estriol y estrioles sustituidos, a saber:

estriol

30 2-OH-estriol

2-alcoxi-estriol (tal como alcoxi-estriol C<sub>1-6</sub>, tal como 2-metoxi-estriol)

4-OH-estriol

35 6 $\alpha$ -OH-estriol

7 $\alpha$ -OH-estriol

40 dehidroepiandrosteronas y dehidroepiandrosteronas sustituidas, a saber:

dehidroepiandrosteronas

45 6 $\alpha$ -OH-dehidroepiandrosterona

7 $\alpha$ -OH-dehidroepiandrosterona

50 16 $\alpha$ -OH-dehidroepiandrosterona

16 $\beta$ -OH-dehidroepiandrosterona

55 En términos generales, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener una variedad de sustituyentes no interiores. En particular, el sistema de anillos A'B'C'D' puede contener uno o más sustituyentes de hidroxilo, alquilo especialmente alquilo inferior (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros de pentilo, y n-hexilo y otros isómeros de hexilo, alcoxilo especialmente alcoxilo inferior (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo metoxilo, etoxilo, propoxilo, etc., alquinilo, por ejemplo etinilo, o halógeno, por ejemplo flúor.

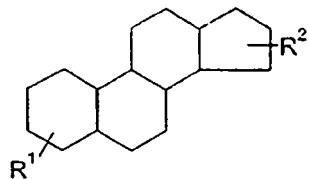
60 En una forma de realización alternativa, el compuesto policíclico puede no contener o no basarse en un núcleo esteroideo. En este sentido, el compuesto policíclico puede contener o basarse en un sistema de anillos no esteroideos, tales como dietilestilbestrol, estilbestrol, cumarinas y otros sistemas de anillos. Otros compuestos no esteroideos adecuados para su utilización en o como la composición de la presente invención pueden encontrarse en el documento 65 US-A-5567831.

55  $R^1$  y  $R^2$ 

En un aspecto preferido, el compuesto es de fórmula I

5

10

**Fórmula I**

15

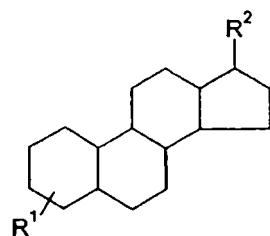
en la que  $R^1$  es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida.

20

En un aspecto preferido, el compuesto es de fórmula II

25

30

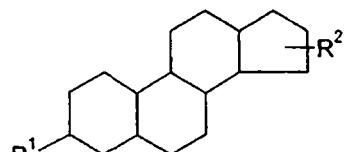
**Fórmula II**en la que  $R^1$  es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida.

35

En un aspecto preferido, el compuesto es de fórmula III

40

45

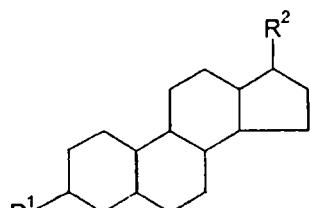
**Fórmula III**en la que  $R^1$  es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida.

50

En un aspecto preferido, el compuesto es de fórmula IV

55

60

**Fórmula IV**en la que  $R^1$  es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida.

# ES 2 339 450 T3

Se entenderá fácilmente que el anillo A del sistema de anillos esteroideos en las fórmulas I a IV está adicionalmente sustituido en la posición 2 ó 4 con un grupo R<sup>4</sup>.

R<sup>1</sup>

5

Un experto en la materia apreciará que R<sup>1</sup> es un grupo opcional que puede estar presente o no. En un aspecto preferido, R<sup>1</sup> está presente. En este aspecto, R<sup>1</sup> es un grupo seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida.

## 10 Grupo sulfamato

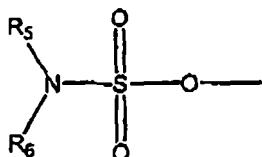
En un aspecto, R<sup>1</sup> es un grupo sulfamato opcional.

15 El término "sulfamato" incluye un éster de ácido sulfámico, o un éster de un derivado N-sustituido de ácido sulfámico, o una sal del mismo.

En un aspecto, R<sup>1</sup> es un grupo sulfamato. En este aspecto, el compuesto de la presente invención puede denominarse compuesto de sulfamato.

## 20 El grupo sulfamato de R<sup>1</sup>, es un grupo sulfamato de fórmula

25



30

en la que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de H o un grupo hidrocarbilo.

35 Preferentemente, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo y arilo, o combinaciones de los mismos, o juntos representan alquieno, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero.

40 Cuando están sustituidos, los compuestos N-sustituidos de esta invención pueden contener uno o dos sustituyentes N-alquilo, N-alquenilo, N-cicloalquilo, N-acilo o N-arilo, que contienen preferentemente o que contienen cada uno un máximo de 10 átomos de carbono. Cuando R<sup>5</sup> y/o R<sup>6</sup> es alquilo, los valores preferidos son aquellos en los que R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo inferiores que contienen desde 1 hasta 5 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc. Preferentemente, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son ambos metilo. Cuando R<sup>5</sup> y/o R<sup>6</sup> es arilo, los valores típicos son fenilo y tolilo (-PhCH<sub>3</sub>; o-, m- o p-). Cuando R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. Cuando se unen entre sí, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> representan normalmente un grupo alquieno que proporciona una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, interrumpida opcionalmente por uno o más heteroátomos o grupos hetero, por ejemplo -O- o -NH- para proporcionar un heterociclo de 5, 6 ó 7 miembros, por ejemplo morfolino, pirrolidino o piperidino.

50 Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo y arilo, se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasas del compuesto en cuestión. Sustituyentes no interferentes a modo de ejemplo incluyen hidroxilo, amino, halo, alcoxilo, alquilo y arilo. Un ejemplo no limitativo de un grupo hidrocarbilo es un grupo acilo.

55 En algunas formas de realización, el grupo sulfamato puede formar una estructura de anillo condensándose a (o asociándose con) uno o más átomos en o sobre el sistema de anillos esteroideos.

En algunas formas de realización, puede haber más de un grupo sulfamato. A título de ejemplo, puede haber dos sulfamatos (es decir, compuestos de bis-sulfamato).

60 En algunas formas de realización preferidas, por lo menos uno de entre R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es H.

En algunas formas de realización preferidas, cada uno de R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> es H.

65 En algunas formas de realización preferidas, R<sup>1</sup> es un grupo sulfamato y el compuesto es adecuado para su utilización como inhibidor de la estrona sulfatasa (E.C. 3.1.6.2).

## ES 2 339 450 T3

En algunas formas de realización preferidas, si el grupo sulfamato sobre el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, entonces el compuesto de sulfato podría hidrolizarse mediante una enzima esteroide sulfatasa (E.G.3.1.6.2).

5 En algunas formas de realización preferidas, si el grupo sulfamato sobre el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato y se incubase con una enzima esteroide sulfatasa (E.C.3.1.6.2) a un pH de 7,4 y 37°C, proporcionaría un valor de  $K_m$  inferior a 50 mM.

10 En algunas formas de realización preferidas, si el grupo sulfamato sobre el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato y se incubase con una enzima esteroide sulfatasa (EC.3.1.6.2) a un pH de 7,4 y 37°C, proporcionaría un valor de  $K_m$  inferior a 50 mM.

### *Grupo fosfonato*

15 Si el compuesto de la presente invención comprende un grupo fosfonato, entonces el compuesto de la presente invención se denomina compuesto de fosfonato.

El grupo fosfonato presenta la fórmula:

20  $(R^{16})\text{-P(O)(OH)-O-}$

en la que preferentemente  $R^{16}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero.

25 Cuando  $R^{18}$  es alquilo,  $R^{18}$  puede ser un grupo alquilo inferior que contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc. A modo de ejemplo,  $R^{18}$  puede ser metilo. Cuando  $R^{18}$  es arilo, los valores típicos son fenilo y tolilo ( $\text{PhCH}_3$ ; O-, m-, p-). Cuando  $R^{18}$  representa cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.  $R^{18}$  puede comprender incluso un grupo alquíleno que proporciona una cadena 4 a 6 átomos de carbono, interrumpida opcionalmente por uno o más heteroátomos o grupos hetero, por ejemplo para proporcionar un heterociclo de 5 miembros, por ejemplo morfolino, pirrolidino o piperidino.

30 Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo y arilo se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasas del compuesto en cuestión. Los sustituyentes no interferentes a modo de ejemplo incluyen hidroxilo, amino, halo, alcoxilo, alquilo y arilo.

35 En algunas formas de realización, el grupo fosfonato puede formar una estructura de anillo condensándose a (o asociándose con) uno o más átomos en o sobre el sistema de anillos esteroideos.

40 En algunas formas de realización, puede haber más de un grupo fosfonato. A modo de ejemplo, puede haber dos fosfonatos (es decir, compuestos de bis-fosfonato). Si estos compuestos se basan en un núcleo esteroideo, preferentemente el segundo grupo fosfonato (o por lo menos uno de los adicionales) está ubicado en la posición 17 del núcleo esteroideo. Estos grupos no necesitan ser iguales.

### *Grupo tiofosfonato*

45 Si el compuesto de la presente invención comprende un grupo tiofosfonato, entonces el compuesto de la presente invención se denomina compuesto de tiofosfonato.

El grupo tiofosfonato presenta la fórmula:

50  $(R^{19})\text{-P(S)(OH)-O-}$

en la que preferentemente  $R^{19}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero.

55 Cuando  $R^{19}$  es alquilo,  $R^{19}$  puede ser un grupo alquilo inferior que contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, es decir metilo, etilo, propilo, etc. A modo de ejemplo,  $R^{19}$  puede ser metilo. Cuando  $R^{19}$  es arilo, los valores típicos son fenilo y tolilo ( $\text{PhCH}_3$ ; O-, m-, p-). Cuando  $R^{19}$  representa cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.  $R^{19}$  puede comprender incluso un grupo alquíleno que proporciona una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, interrumpida opcionalmente por uno o más heteroátomos o grupos hetero, por ejemplo para proporcionar un heterociclo de 5 miembros, por ejemplo morfolino, pirrolidino o piperidino.

# ES 2 339 450 T3

Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo y arilo se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasas del compuesto en cuestión. Los sustituyentes no interferentes a modo de ejemplo incluyen hidroxilo, amino, halo, alcoxilo, alquilo y arilo.

5

En algunas formas de realización, el grupo tiofosfonato puede formar una estructura de anillo condensándose a (o asociándose con) uno o más átomos en o sobre el sistema de anillos esteroideos.

10 En algunas formas de realización, puede haber más de un grupo tiofosfonato. A modo de ejemplo, puede haber dos tiofosfonatos (es decir, compuestos de bis-tiofosfonato). Si estos compuestos se basan en un núcleo esteroideo, preferentemente el segundo grupo tiofosfonato (o por lo menos uno de los adicionales) está ubicado en la posición 17 del núcleo esteroideo. Estos grupos no necesitan ser iguales.

## Grupo sulfonato

15

Si el compuesto de la presente invención comprende un grupo sulfonato, a continuación el compuesto de la presente invención se denomina compuesto de sulfonato.

20

El grupo sulfonato presenta la fórmula:



25 en la que preferentemente  $R^{20}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero.

30 Cuando  $R^{20}$  es alquilo,  $R^{20}$  puede ser un grupo alquilo inferior que contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc. A modo de ejemplo,  $R^{20}$  puede ser metilo. Cuando  $R^{20}$  es arilo, los valores típicos son fenilo y tolilo ( $PhCH_3$ ; O-, m-, p-). Cuando  $R^{20}$  representa cicloalquilo, los valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc.  $R^{20}$  puede comprender incluso un grupo alquenilo que proporciona una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, interrumpida opcionalmente por uno o más heteroátomos o grupos hetero, por ejemplo para proporcionar un heterociclo de 5 miembros, por ejemplo morfolino, pirrolidino o piperidino.

35

Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo y arilo se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasas del compuesto en cuestión. Los sustituyentes no interferentes a modo de ejemplo incluyen hidroxilo, amino, halo, alcoxilo, alquilo y arilo.

40

En algunas formas de realización, el grupo sulfonato puede formar una estructura de anillo condensándose a (o asociándose con) uno o más átomos en o sobre el sistema de anillos esteroideos.

45 En alguna forma de realización, puede haber más de un grupo sulfonato. A modo de ejemplo, puede haber dos sulfonatos (es decir, compuestos de bis-sulfonato). Si estos compuestos se basan en un núcleo esteroideo, preferentemente el segundo grupo sulfonato (o por lo menos uno de los adicionales) está ubicado en la posición 17 del núcleo esteroideo. Estos grupos no necesitan ser iguales.

## Otros sustituyentes

50

El compuesto de la presente invención puede presentar sustituyentes distintos de los de fórmula I. A modo de ejemplo, estos otros sustituyentes pueden ser uno o más de entre: uno o más grupo(s) sulfamato, uno o más grupo(s) fosfonato, uno o más grupo(s) tiofosfonato, uno o más grupo(s) sulfonato, uno o más grupo(s) sulfonamida, uno o más grupos halo, uno o más grupos O, uno o más grupos hidroxilo, uno o más grupos amino, uno o más grupo(s) que contiene(n) azufre, uno o más grupo(s) hidrocarbilo, tal como un grupo oxihidrocarbilo.

$R^2$

60 El anillo D del sistema de anillos esteroideos del presente compuesto está sustituido con un grupo  $R^2$  de fórmula  $-L-R^3$ , en la que L es un grupo conector opcional y  $R^3$  se selecciona de grupos que son o que comprenden uno de un grupo nitrilo, un alcohol, un éster, un éter, una amina y un alqueno.

En algunas formas de realización preferidas,  $R^2$  es de fórmula  $-R^3$ . En otras palabras, no está presente el grupo L.

65 En algunos aspectos preferidos, el grupo  $R^2$  está en una conformación a. Preferentemente, el grupo  $R^2$  está en una conformación a en la posición 17 del anillo D.

## ES 2 339 450 T3

L es un grupo hidrocarbilo. En algunas formas de realización, L es un grupo hidrocarburo, tal como un grupo alquíleno.

5 L puede ser normalmente un alquíleno C<sub>1-10</sub>, un alquíleno C<sub>1-5</sub>, un alquíleno C<sub>1</sub> o C<sub>2</sub>.

R<sup>3</sup>

Tal como se trató anteriormente, R<sup>3</sup> se selecciona de grupos que son o que comprenden un grupo nitrilo. Preferentemente, R<sup>3</sup> es un grupo nitrilo.

10 10 R<sup>3</sup> puede ser un grupo cíclico o un grupo acíclico.

Cuando R<sup>3</sup> es un grupo cíclico, puede formar un anillo que se condensa con el anillo D del esteroide o que no se condensa con el anillo D del esteroide. Cuando R<sup>3</sup> forma un grupo cíclico que se condensa con el anillo D del esteroide, preferentemente R<sup>3</sup> forma un anillo que se une a miembros adyacentes del anillo D, más preferentemente R<sup>3</sup> forma un anillo que se une a las posiciones 16 y 17 del anillo D.

En algunos aspectos preferidos, R<sup>3</sup> se selecciona de entre grupos de fórmula =C(CN)<sub>2</sub>, =C(CH<sub>3</sub>)(CN), y -(R<sup>7</sup>)<sub>n</sub>(CR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>)<sub>p</sub>R<sup>8</sup>, en la que n es 0 ó 1, p es un número entero, R<sup>7</sup> se selecciona de =CH-, -O- y MR<sup>13</sup>; R<sup>6</sup> es -C≡N, R<sup>13</sup> se selecciona de entre H e hidrocarbilo, R<sup>14</sup> y R<sup>16</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H e hidrocarbilo.

En algunos aspectos preferidos, R<sup>3</sup> es un grupo de fórmula -(R<sup>7</sup>)<sub>n</sub>(CR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>)<sub>p</sub>R<sup>8</sup>, en la que n es 0 ó 1, p es un número entero, R<sup>7</sup> se selecciona de =CH-, -O- y NR<sup>13</sup>; R<sup>8</sup> es -C≡N; R<sup>13</sup> se selecciona de entre H e hidrocarbilo, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo, hidrocarbilo:

25 25 En algunos aspectos preferidos, R<sup>3</sup> es un grupo de fórmula -(CR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>)<sub>p</sub>R<sup>8</sup>, p es un número entero; R<sup>8</sup> es -C≡N, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H e hidrocarbilo.

En algunos aspectos preferidos, R<sup>3</sup> es un grupo de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>R<sup>8</sup>, p es un número entero; R<sup>8</sup> es -C≡N.

30 30 En algunos aspectos preferidos, R<sup>3</sup> es un grupo de fórmula -(R<sup>7</sup>)<sub>n</sub>R<sup>8</sup>, en la que n es 0 ó 1, R<sup>7</sup> se selecciona de =CH-, -O- y NR<sup>13</sup>; R<sup>8</sup> es -C≡N; R<sup>13</sup> se selecciona de H e hidrocarbilo.

p puede ser cualquier número entero, p puede ser desde 0 hasta 20. p puede ser desde 0 hasta 10. Normalmente, p es desde 0 hasta 5. En un aspecto, p es 0, 1 ó 2.

q puede ser cualquier número entero, q puede ser desde 0 hasta 20. q puede ser desde 0 hasta 10. Normalmente, q es desde 0 hasta 5. En un aspecto, q es 0, 1 ó 2.

40 R<sup>13</sup> se selecciona de entre H e hidrocarbilo. En una forma de realización preferida de la presente invención, R<sup>13</sup> se selecciona de uno de H, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, grupos hidrocarburo, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, grupos alquilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

45 En un aspecto, R<sup>13</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1-10</sub>. En un aspecto, R<sup>13</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1-5</sub>. En un aspecto, R<sup>13</sup> se selecciona de H y alquilo C<sub>1-3</sub>. En un aspecto, R<sup>13</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>. Preferentemente, R<sup>13</sup> es -H.

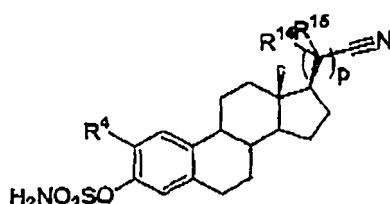
50 R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H e hidrocarbilo. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> son cada uno independientemente hidrocarbilo. En una realización preferida de la presente invención, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de uno de H, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, grupos hidrocarburo, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, hidrocarburo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, grupos alquilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

55 En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo C<sub>1-10</sub>. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-10</sub>. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>13</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo C<sub>1-5</sub>. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>18</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-5</sub>. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo C<sub>1-3</sub>. En un aspecto, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>1-3</sub>. Preferentemente, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan independientemente de -H y -CH<sub>3</sub>.

60 60 En un aspecto sumamente preferido, R<sup>3</sup> es un grupo seleccionado de -CH<sub>2</sub>C≡N, =CHC≡N.

Se seleccionan grupos R<sup>3</sup> particularmente preferidos de las sustituciones del anillo D facilitadas a continuación

5



10

15

R<sup>4</sup>

Tal como se mencionó anteriormente, el anillo A del sistema de anillos esteroideos está sustituido con un grupo R<sup>4</sup>, siendo R<sup>4</sup> un grupo hidrocarbilo.

En un aspecto preferido, R<sup>4</sup> es un grupo oxihidrocarbilo.

Tal como se trató anteriormente, la expresión “grupo oxihidrocarbilo” tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a R<sup>4</sup> significa un grupo que comprende por lo menos C, H y O y puede comprender opcionalmente uno o más de otros sustituyentes adecuados. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo oxihidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan necesariamente estar unidos entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden unirse a través de un grupo o elemento adecuado. Por tanto, el grupo oxihidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, azufre y nitrógeno.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el R<sup>4</sup> es un grupo oxihidrocarburo.

35

En la presente memoria, el término “oxihidrocarburo” significa, o R<sup>4</sup> es, uno cualquiera de un grupo alcoxilo, un grupo oxialquenilo, un grupo oxalquinilo, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cílicos, o un grupo oxiarilo. El término oxihidrocarburo también incluye esos grupos pero en los que se han producido opcionalmente sustituciones. Si el oxihidrocarburo es una estructura ramificada que presenta sustituyente(s) sobre la misma, entonces la substitución puede ser o bien en la estructura principal del hidrocarburo o bien en la ramificación; alternativamente las sustituciones pueden ser en la estructura principal del hidrocarburo y en la ramificación.

Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es un grupo alcoxilo. Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es de fórmula C<sub>1-6</sub>O (tal como un C<sub>1-3</sub>O). Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es de fórmula -O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>CH<sub>3</sub>. En un aspecto sumamente preferido, R<sup>4</sup> es metoxilo.

Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es un grupo éter. Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es de fórmula C<sub>1-6</sub>OC<sub>1-6</sub> (tal como un C<sub>1-3</sub>OC<sub>1-3</sub>). Preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo R<sup>4</sup> es de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>CH<sub>3</sub>. En un aspecto sumamente preferido, R<sup>4</sup> es -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

En una forma de realización preferida de la presente invención, R<sup>4</sup> es un grupo hidrocarburo. Preferentemente, R<sup>4</sup> es un grupo alquilo. Preferentemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C<sub>1-6</sub> (tal como un grupo alquilo C<sub>1-3</sub>). Preferentemente, el grupo hidrocarbilo R<sup>4</sup> es de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-2</sub>CH<sub>3</sub>. En un aspecto muy preferido, R<sup>4</sup> es etilo.

55

En una forma de realización preferida de la presente invención, R<sup>4</sup> se selecciona de uno de hidrocarbilo C<sub>1-C<sub>10</sub></sub>, hidrocarbilo C<sub>1-C<sub>5</sub></sub>, hidrocarbilo C<sub>1-C<sub>3</sub></sub>, grupos hidrocarburo, hidrocarburo C<sub>1-C<sub>10</sub></sub>, hidrocarburo C<sub>1-C<sub>5</sub></sub>, hidrocarburo C<sub>1-C<sub>3</sub></sub>, grupos alquilo, alquilo C<sub>1-C<sub>10</sub></sub>, alquilo C<sub>1-C<sub>5</sub></sub> y alquilo C<sub>1-C<sub>3</sub></sub>.

60

En una forma de realización preferida de la presente invención, el R<sup>4</sup> es un grupo hidrocarbilsulfanilo.

65

El término “hidrocarbilsulfanilo” significa un grupo que comprende por lo menos un grupo hidrocarbilo (tal como se define en la presente memoria) y azufre. El grupo azufre puede oxidarse opcionalmente. Preferentemente, el hidrocarbilsulfanilo es de fórmula -S-hidrocarbilo en la que el hidrocarbilo es tal como se describe en la presente memoria.

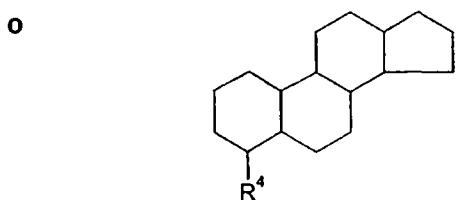
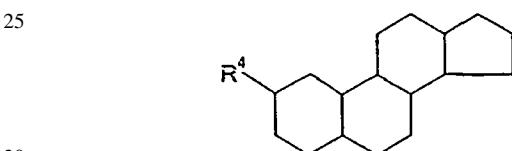
# ES 2 339 450 T3

La expresión "grupo hidrocarbilsulfanilo" tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a  $R^4$  significa un grupo que comprende por lo menos C, H y S y puede comprender opcionalmente uno o más de otros sustituyentes adecuados. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilsulfanilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan necesariamente estar unidos entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden unirse a través de un grupo o elemento adecuado. Por tanto, el grupo hidrocarbilsulfanilo puede contener heteroátomos adicionales. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, nitrógeno.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el  $R^4$  es un grupo hidrocarburosulfanilo. La expresión "grupo hidrocarburosulfanilo" tal como se utiliza en la presente memoria con respecto a  $R^4$  significa un grupo que consiste en C, H y S. Preferentemente, el hidrocarburosulfanilo es de fórmula -S-hidrocarburo en la que el hidrocarburo es tal como se describe en la presente memoria.

Preferentemente, el grupo hidrocarburosulfanilo  $R^4$  es de fórmula  $C_{1-6}S$  (tal como un  $C_{1-3}S$ ). Preferentemente, el grupo oxihidrocárgilo  $R^4$  es de fórmula  $-S(CH_2)_{1-10}CH_3$ ,  $-S(CH_2)_{1-5}CH_3$ ,  $-S(CH_2)_{1-2}CH_3-$ . En un aspecto sumamente preferido,  $R^4$  es  $-S-Me$ .

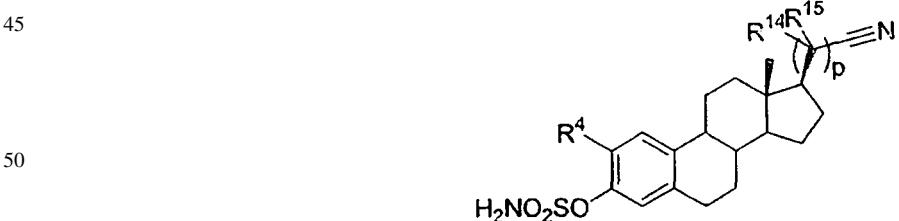
Tal como se mencionó anteriormente,  $R^4$  está en la posición 2 ó 4 del anillo A. Por tanto, el compuesto puede presentar la fórmula



35 Preferentemente,  $R^4$  está en la posición 2 del anillo A.

En un aspecto preferido adicional, cuando el anillo A está sustituido con  $R^1$  y  $R^4$ ,  $R^4$  está en orto con respecto a  $R^1$ .

40 En una forma de realización preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:



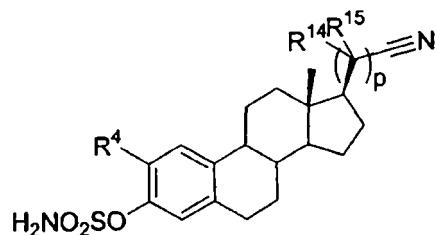
55 en la que  $R^4$  es un grupo hidrocárgilo y  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de H e hidrocárgilo y p es un número entero.

60

65

# ES 2 339 450 T3

En una forma de realización preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:



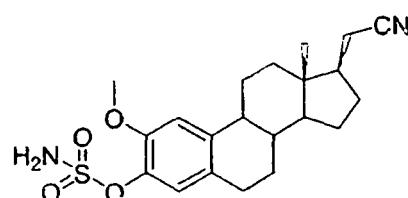
en la que R<sup>4</sup> es un grupo oxihidrocarburo o un grupo hidrocarburo y R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo C<sub>1-10</sub> y p es un número entero desde 0 hasta 5.

20 En este aspecto, preferentemente R<sup>4</sup> es un grupo alcoxilo, tal como un grupo C<sub>1-6</sub>O o un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>. Preferentemente, R<sup>4</sup> es metoxilo o etilo.

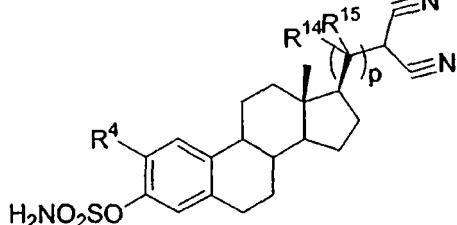
25 En este aspecto, preferentemente R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de H y CH<sub>3</sub>, más preferentemente R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> son ambos H.

En este aspecto, preferentemente p es 0, 1 ó 2. Más preferentemente p es 1.

30 En una forma de realización muy preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:

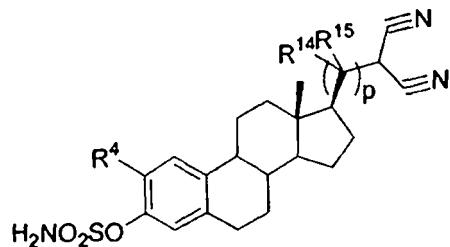


En una forma de realización preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:



60 en la que R<sup>4</sup> es un grupo hidrocarbilo y R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo y p es un número entero.

En una forma de realización preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:



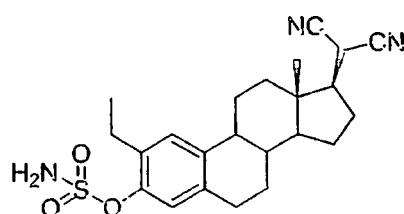
en la que  $R^4$  es un grupo oxihidrocarburo o un grupo hidrocarburo y  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de H y alquilo  $C_{1-10}$  y p es un número entero desde 0 hasta 5.

20 En este aspecto, preferentemente  $R^4$  es un grupo alcoxilo, tal como un grupo  $C_{1-6}O$  o un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo  $C_{1-6}$ . Preferentemente,  $R^4$  es metoxilo o etilo.

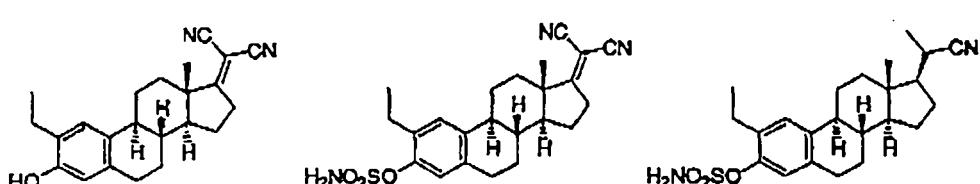
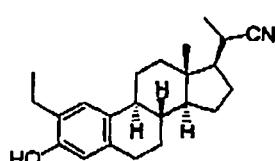
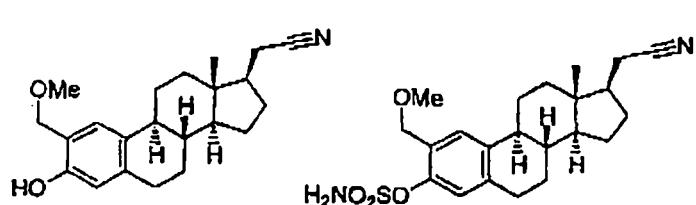
25 En este aspecto, preferentemente  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de H y  $CH_3$ , más preferentemente  $R^{14}$  y  $R^{15}$  son ambos H.

En este aspecto, preferentemente p es 0, 1 ó 2. Más preferentemente p es 1.

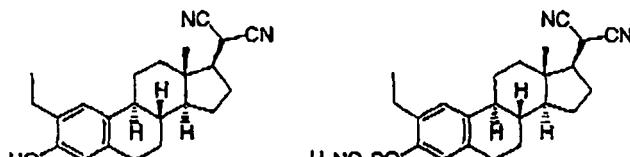
25 En una forma de realización sumamente preferida, el compuesto de la presente invención presenta la fórmula:



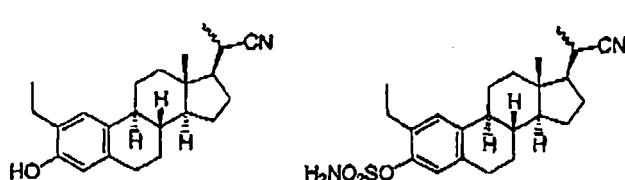
Se muestran a continuación compuestos sumamente preferidos de la presente invención y pueden seleccionarse de entre:



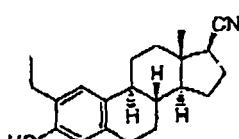
5



10

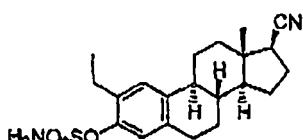


15

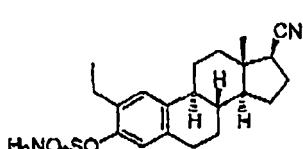


20

25



30



35

### Composición

Tal como se describió anteriormente según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) (i) un compuesto tal como se define en la presente memoria, o (ii) una composición tal como se define en la presente memoria, y (b) un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Según la presente invención, la composición de la presente invención puede comprender más de un modificador de la respuesta biológica.

45

El término modificador de la respuesta biológica (“BRM”) incluye citocinas, moduladores inmunitarios, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimulantes de colonias, factores quimiotácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de superficie celular, ligandos, moléculas de adhesión de leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de la matriz extracelular, fibronectina, etc.

Los BRM pueden desempeñar un papel en la modulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria en trastornos. Ejemplos de los BRM incluyen: factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interferones (IFN), interleucinas, activadores de plasminógeno tisular, selectinas P, E o L, ICAM-1, VCAM, selectinas, adresinas, etc.

Preferentemente, el modificador de la respuesta biológica es una citocina.

Una citocina es una molécula (a menudo una proteína soluble) que permite a las células inmunitarias comunicarse entre ellas. Estas moléculas ejercen sus funciones biológicas a través de receptores específicos expresados sobre la superficie de células diana. La unión de los receptores desencadena la liberación de una cascada de señales bioquímicas que afectan profundamente el comportamiento de la célula que porta el receptor (Poole, S 1995 TibTech 13: 81-82). Se han identificado muchas citocinas y sus receptores a un nivel molecular (Paul y Sedar 1994, Cell 76:241-251) y producen moléculas adecuadas de valor terapéutico, así como también dianas terapéuticas.

Pueden encontrarse más detalles sobre las citocinas en Molecular Biology and Biotechnology (Pub. VCH, Ed. Meyers, 1995, páginas 202, 203, 394, 390, 475, 790).

# ES 2 339 450 T3

Ejemplos de citocinas incluyen: interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-19; factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- $\alpha$ ; interferón alfa, beta y gamma; TGF- $\beta$ .

Para la presente invención, preferentemente la citocina es el factor de necrosis tumoral (TNF).

5       Más preferentemente, la citocina es TNF- $\alpha$ .

El TNF es una citocina producida por macrófagos y linfocitos que media respuestas inflamatorias e inmunopatológicas. El TNF se ha implicado en la progresión de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos 10 de modulación inmunitaria, infección, proliferación celular, angiogénesis (neovascularización), metástasis tumoral, apoptosis, septicemia y endotoxemia.

La acción necrotizante del TNF *in vivo* se refiere principalmente a la lesión capilar. El TNF provoca necrosis, no sólo en tejido tumoral, sino también en tejido de granulación. Esto provoca cambios morfológicos en la inhibición 15 del crecimiento de y en la citotoxicidad frente a células endoteliales vasculares en cultivo (Haranka *et al.* 1987, Ciba Found Symp 131: 140-153).

Para el aspecto preferido de la presente invención, el TNF puede ser cualquier tipo de TNF, tal como TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  incluyendo derivados o mezclas de los mismos.

20       Pueden encontrarse enseñanzas sobre el TNF en la técnica, tal como en el documento WO-A-98/08870 y en el documento WO-A-98/13348.

El TNF puede prepararse químicamente o puede extraerse de fuentes. Preferentemente, el TNF se prepara mediante 25 la utilización de técnicas de ADN recombinante.

Con este aspecto de la presente invención, las composiciones de la presente invención son más potentes *in vivo* que los compuestos solos o el TNF sólo. Además, en algunos aspectos, la combinación de los compuestos y el TNF es más potente de lo que uno podría esperar de la potencia del compuesto sólo, es decir, ésta es una relación sinérgica 30 entre ellos.

Además, la presente invención considera la composición de la presente invención que comprende además un inductor del modificador de la respuesta biológica, tal como el inductor *in vivo* del modificador de la respuesta biológica.

35       Según la presente invención, pueden añadirse los componentes de la composición en mezcla, de manera simultánea o secuencial. Además, según la presente invención, puede ser posible formar por lo menos una parte de la composición *in situ* (tal como *in vivo*) induciendo de la expresión de, o aumentando de la expresión de, uno de los componentes. Por ejemplo, puede ser posible inducir la expresión de, o aumentar la expresión de, el modificador de la respuesta 40 biológica, tal como el TNF. A modo de ejemplo, puede ser posible inducir la expresión de, o aumentar la expresión de, TNF añadiendo lipopolisacárido (LPS) bacteriano y dipéptido de muramilo (MDP). Con respecto a esto, el LPS bacteriano y el MDP en combinación pueden estimular la producción de TNF de células murinas de bazo *in vitro* y la regresión del tumor *in vivo* (Fuks *et al.* Biull Eksp Biol Med 1987, 104: 497-499).

45       La presente invención también cubre nuevos productos intermedios que son útiles para preparar los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención cubre nuevos precursores de alcohol para los compuestos. A modo de ejemplo adicional, la presente invención cubre precursores bis protegidos para los compuestos. Ejemplos de cada uno de estos precursores se presentan en la presente memoria. La presente invención también abarca un procedimiento que comprende cada uno o ambos de estos precursores para la síntesis de los compuestos de la presente 50 invención.

## *Esteroide sulfatasa*

La esteroide sulfatasa, que algunas veces se denomina esteroide sulfatasa o esteril sulfatasa o "STS" para abreviar, 55 hidroliza varios esteroides sulfatados, tales como sulfato de estrona, sulfato de dehidroepiandrosterona y sulfato de colesterol. Se ha asignado para la STS el número de enzima EC 3.1.6.2.

La STS se ha clonado y expresado. Por ejemplo, véase Stein *et al.* (J. Biol. Chem. 264: 13865-13872) (1989) y Yen *et al.* (Cell 49:443-454 (1987)).

60       La STS es una enzima que se ha implicado en varios estados patológicos.

A modo de ejemplo, los expertos han encontrado que una deficiencia total en STS produce ictiosis. Según algunos expertos, la deficiencia de STS es bastante prevalente en Japón. Los mismos expertos (Sakura *et al.* J. Inherit Metab. Dis 1997 Nov; 20 (6): 807-10) también han notificado que las enfermedades alérgicas, tales como asma bronquial, rinitis alérgica, o dermatitis atópica, pueden asociarse con la deficiencia de esteroide sulfatasa.

# ES 2 339 450 T3

Además de los estados patológicos provocados por una carencia total de la actividad STS, un aumento del nivel de la actividad STS también puede producir estados patológicos. A modo de ejemplo, y tal como se indicó anteriormente, existen pruebas sólidas que apoyan un papel de la STS en el crecimiento y la metástasis del cáncer de mama.

5 También se ha implicado la STS en otros estados patológicos. A modo de ejemplo, Le Roy *et al.* (Behav Genet 1999 Mar; (29): 131-16 han determinado que puede haber una correlación genética entre la concentración de esteroide sulfatasa y el inicio del comportamiento de ataque en ratones. Los autores concluyen que la sulfatación de esteroideos puede ser el primer motor de una red compleja, incluyendo genes que muestran que están implicados en la agresión mediante mutagénesis.

## 10 *Inhibición de STS*

Se cree que algunos estados patológicos asociados con la actividad STS se deben a la conversión de una estrona sulfatada, no activa, en una estrona no sulfatada, activa. En estados patológicos asociados con la actividad STS, sería 15 deseable inhibir la actividad STS.

En la presente memoria, el término “inhibir” incluye reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o impedir la acción nociva del STS.

## 20 *Inhibidor de STS*

Según la presente invención, el compuesto de la presente invención puede actuar como un inhibidor de STS.

En la presente memoria, el término “inhibidor” tal como se utiliza en la presente memoria con respecto al com-25 puesto de la presente invención significa un compuesto que puede inhibir la actividad STS, de modo que redu-  
ca y/o elimine y/o enmascare y/o impida la acción nociva de STS. El inhibidor de STS puede actuar como un antagonista.

30 Puede evaluarse la capacidad de los compuestos para inhibir la actividad estrona sulfatasa utilizando células de coriocarcinoma JEG3 intactas en éter o microsomas de placenta. Además, puede utilizarse un modelo animal. Detalles sobre los protocolos de ensayo adecuados se presentan en las siguientes secciones. Debe observarse que podrían utilizarse otros ensayos para determinar la actividad STS y por tanto, la inhibición de STS. Por ejemplo, también puede hacerse referencia a las enseñanzas del documento WO-A-99/50453.

35 En un aspecto, para algunas aplicaciones, el compuesto está caracterizado además porque presenta la característica de que si el grupo sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un derivado de sulfato, entonces el derivado de sulfato podría hidrolizarse por una enzima que presenta actividad esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), es decir, cuando se incuba con esteroide sulfatasa E.C. 3.1.6.2) a pH 7,4 y 37°C.

40 En una forma de realización preferida, si el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato entonces ese compuesto de sulfato podría hidrolizarse por una enzima que presenta actividad esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) y proporcionaría un valor de  $K_m$  inferior a 200 mmolar, preferentemente inferior a 150 mmolar, preferentemente inferior a 100 mmolar, preferentemente inferior a 75 molar, preferentemente inferior a 50 mmolar, cuando se incuba con esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) a pH 7,4 y 37°C.

45 En una forma de realización preferida, el compuesto de la presente invención no se hidroliza por una enzima que presenta actividad esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2).

50 Para algunas aplicaciones, preferentemente el compuesto de la presente invención presenta por lo menos una selectividad de 100 veces por la diana deseada (por ejemplo, STS y/o aromatasa), preferentemente por lo menos aproximadamente una selectividad de 150 veces por la diana deseada, preferentemente por lo menos aproximadamente una selectividad de 200 veces por la diana deseada, preferentemente por lo menos aproximadamente una selectividad de 250 veces por la diana deseada, preferentemente por lo menos aproximadamente una selectividad de 300 veces por la diana deseada, preferentemente por lo menos aproximadamente una selectividad de 350 veces por la diana deseada.

55 Debe observarse que el compuesto de la presente invención puede presentar otras propiedades beneficiosas además de o en alternativa a su capacidad de inhibir la actividad STS y/o aromatasa.

## 60 *Ensayo para determinar la actividad STS utilizando células cancerosas (Protocolo 1)*

### *Inhibición de la actividad esteroide sulfatasa en células JEG3*

65 La actividad esteroide sulfatasa se mide *in vitro* utilizando células de coriocarcinoma JEG3 intactas. Esta línea celular puede utilizarse para estudiar el control del crecimiento de células de cáncer de mama humano. Presenta actividad esteroide sulfatasa significativa (Boivin *et al.*, J. Med. Chem., 2000, 43: 4465-4478) y está disponible a partir la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

## ES 2 339 450 T3

Las células se mantienen en medio esencial mínimo (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Escocia) que contiene HEPES 20 mM, suero bovino fetal al 5%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y bicarbonato de sodio al 0,075%. Se sembraron hasta 30 duplicados en matraces de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> con aproximadamente 1 x 10<sup>5</sup> células/matrás utilizando el medio anterior. Las células se hicieron crecer hasta el 80% de confluencia y se cambió el medio cada tres días.

Se lavaron las monocapas intactas de células JEG3 por triplicado en matraces de cultivo tisular de 25 cm<sup>2</sup> con solución salina equilibrada de Earle (EBSS de ICN Flow, High Wycombe, R.U.) y se incubaron durante 3-4 horas a 37°C con 5 pmol (7 x 10<sup>5</sup> dpm) de sulfato de 3-[6,7-3H]estrona (actividad específica 60 Ci/mmol de New England Nuclear, Boston, Mass., E.E.UU.) en MEM libre de suero (2,5 ml) junto con sulfamato de 3-estrona (5 concentraciones: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM y 10 μM). Tras la incubación, se enfrió cada matrás y se pipeteó el medio (1 ml) en tubos separados que contenían [14C]estrona (7 x 10<sup>3</sup> dpm) (actividad específica 97 Ci/mmol de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, R.U.). La mezcla se agita vigorosamente durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que se elimina > el 90% [14C]estrona y < el 0,1% de sulfato de 3-[3H]estrona de la fase acuosa mediante este tratamiento. Una parte (2 ml) de la fase orgánica se elimina, se evapora y el contenido en 3H y 14C del residuo se determina mediante espectrometría de centelleo. Se calculó la masa del hidrolizado de sulfato de 3-estrona a partir de los recuentos de 3H obtenidos (corregido para los volúmenes del medio y la fase orgánica utilizados, y para la recuperación de [14C]estrona añadida) y la actividad específica del sustrato. Cada lote de experimentos incluye incubaciones de microsomas preparados a partir de placenta humana positiva para sulfatasa (control positivo) y matraces sin células (para evaluar la hidrólisis no enzimática aparente del sustrato). El número de núcleos celulares por matrás se determina utilizando un contador Coulter tras tratar las monocapas de células con Zaponin. Para evaluar el estado y la viabilidad de la membrana celular, se utiliza un matrás de cada lote, utilizando el procedimiento de exclusión con azul de tripano (Philips, H.J. (1973) En: *Tissue culture and applications*, [eds: Kruse, D.F. & Patterson, M.K.]; págs. 406-408; Academic Press, Nueva York).

Los resultados para la actividad esteroide sulfatasa se expresan como la media ± 1 D.E. del producto total (estrona + estradiol) formado durante periodo de incubación (3-4 horas) calculado para 10<sub>6</sub> células y, para valores que muestran la significación estadística, como una reducción del porcentaje (inhibición) sobre las incubaciones que no contienen sulfamato de 3-estrona. Se utilizó la prueba de la t de Student para datos independientes para someter a prueba la significación estadística de los resultados.

### *Ensayo para determinar la actividad STS utilizando microsomas de placenta (Protocolo 2)*

#### *Inhibición de la actividad esteroide sulfatasa en microsomas de placenta*

Se corta con tijeras meticulosamente placenta humana positiva para sulfatasa de embarazos a término normales, y se lava una vez con tampón de fosfato frío (pH 7,4, 50 mM), luego se resuspenden en tampón de fosfato frío (5 ml/g de tejido). Se logra la homogeneización con un homogeneizador Ultra-Turrax, utilizando tres lapsos de 10 segundos separados por periodos de enfriamiento en hielo de 2 minutos. Se eliminan los núcleos y los residuos celulares mediante centrifugación (4°C) a 2000 g durante 30 minutos y se almacenan partes (2 ml) del sobrenadante a 20°C. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determina mediante el procedimiento de Bradford (Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976)).

Se llevan a cabo incubaciones (1 ml) utilizando una concentración de proteínas de 100 mg/ml, concentración de sustrato de sulfato de 3-[6,7-3H]estrona 20 mM (actividad específica 60 Ci/mmol de New England Nuclear, Boston, Mass., EE.UU.) y un tiempo de incubación de 20 minutos a 37°C. Si es necesario, se emplean seis concentraciones de compuestos: 0,1 nM, 1,0 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM y 10 μM. Tras la incubación, cada muestra se enfriá y el medio (1 mL) se pipetea en tubos separados que contienen [14C]estrona (7 x 10<sup>3</sup> dpm) (actividad específica 97 Ci/mmol de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, R.U.). La mezcla se agita vigorosamente durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que se elimina > el 90% de [14C]estrona y < el 0,1% de sulfato de 3-[3H]estrona de la fase acuosa mediante este tratamiento. Una parte (2 ml) de la fase orgánica se elimina, se evapora y se determina el contenido en 3H y 14C del residuo mediante espectrometría de centelleo. Se calcula la masa del sulfato de 3-estrona hidrolizado a partir de los recuentos de 3H obtenidos (corregidos para los volúmenes del medio y la fase orgánica utilizados, y para la recuperación de [14C]estrona añadida) y la actividad específica del sustrato.

### *Modelo de ensayo animal para determinar la actividad STS (Protocolo 3)*

#### *Inhibición de la actividad estrona sulfatasa in vivo*

Los compuestos de la presente invención pueden estudiarse utilizando modelo animal, en particular en ratas sometidas a ovarioectomía. En este modelo, los compuestos que son estrogénicos estimulan el crecimiento uterino.

Se administra oralmente a las ratas el compuesto (0,1 mg/Kg/día durante 5 días), recibiendo otro grupo de animales sólo el vehículo (propilenglicol). Al final del estudio, se obtuvieron muestras de tejido de hígado y sometió a ensayo la actividad estrona sulfatasa utilizando sulfato de 3H-estrona como el sustrato, tal como se describió previamente (véase el documento PCT/GB95/02638).

*Modelo de ensayo de animal para determinar la actividad estrogénica (Protocolo 4)*

Los compuestos de la presente invención pueden estudiarse utilizando un modelo animal, en particular ratas sometidas a ovarioectomía. En este modelo, los compuestos que son estrogénicos estimulan el crecimiento uterino.

5 El compuesto se administró por vía oral a las ratas (0,1 mg/Kg/día durante cinco días), recibiendo otro grupo de animales sólo el vehículo (propilenglicol). Al final del estudio, se obtuvieron úteros y se pesaron, expresándose los resultados como peso uterino/peso corporal total x 100.

10 Los compuestos que no presentan efecto significativo en el crecimiento uterino no son estrogénicos.

*Ensayos biotecnológicos para determinar la actividad STS (Protocolo 5)*

15 También puede evaluarse la capacidad de los compuestos de inhibir la actividad estrona sulfatasa utilizando secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos que codifican para STS, o fragmentos activos, derivados, homólogos o variantes de los mismos, por ejemplo, en exploraciones de alto rendimiento.

20 Puede utilizarse cualquiera o más de las dianas apropiadas (tales como una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos) para identificar un agente que puede modular STS en cualquiera de una variedad de técnicas de selección de fármacos. La diana empleada en una prueba de este tipo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, soportada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. Puede medirse la supresión de la actividad diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente que está sometiéndose a prueba.

25 El ensayo de la presente invención puede ser una exploración para seleccionar, mediante el cual se someten a prueba varios agentes. En un aspecto, el procedimiento de ensayo de la presente invención es una exploración de alto rendimiento.

30 Las técnicas para la selección de fármacos pueden basarse en el procedimiento descrito por Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de prueba de péptidos pequeños sobre un sustrato sólido, tal como husillos de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos de prueba de péptidos con una diana adecuada o fragmento de la misma mismo y se lavan. A continuación, se detectan las entidades unidas, tal como mediante procedimientos que se adaptan apropiadamente bien conocidos en la técnica. También puede cubrirse una diana purificada directamente sobre placas para su utilización en una técnica de selección de fármacos. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

35 La presente invención también contempla la utilización de ensayos de selección de fármacos competitivos en el que anticuerpos neutralizantes que pueden unirse específicamente a una diana compiten con un compuesto de prueba para la unión a una diana.

40 Otra técnica para la selección permite una exploración de alto rendimiento (HTS) de agentes que presentan afinidad de unión apropiada con las sustancias y se basa en el procedimiento descrito en detalle en el documento WO 84/03564.

45 Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención serán adecuados tanto para la exploración a gran escala como a pequeña escala de compuestos de prueba así como en ensayos cuantitativos.

50 En un aspecto preferido, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de agentes que modulan STS de manera selectiva, compuestos que presentan la fórmula (I).

50 *Indicadores*

55 Pueden utilizarse una amplia variedad de indicadores en los procedimientos de ensayo (así como en las exploraciones) de la presente invención proporcionando los indicadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo, mediante espectroscopía). A modo de ejemplo, un gen indicador puede codificar para una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de la luz.

60 Otros protocolos incluyen ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Incluso puede utilizarse un inmunoensayo a base de anticuerpos monoclonales de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos frente a dos epítopos que no interfieren. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R. *et al.* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, San Paul MN) y en Maddox D.E. *et al.* (1983, J. Exp. Med, 158:121/1).

65 Ejemplos de moléculas indicadoras incluyen, pero no se limitan a,  $\beta$ -galactosidasa, invertasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa,  $\beta$ -glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Alternativamente, pueden incorporarse nucleótidos marcados con etiquetas fluorescentes o radiomarcados en los transcritos nacientes que entonces se identifican cuando se unen a las sondas de oligonucleótidos.

# ES 2 339 450 T3

A modo de ejemplos adicionales, varias compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) suministran kits y protocolos comerciales para los procedimientos de ensayo. Marcadores o moléculas indicadoras adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

- 5 Las patentes que enseñan la utilización de tales marcadores incluyen los documentos US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 y US-A-4366241.

## *Células huésped*

- 10 La expresión “célula huésped” en relación con la presente invención incluye cualquier célula que puede comprender la diana para el agente de la presente invención.

Por tanto, una forma de realización adicional de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o expresa la diana de la presente invención. Preferentemente dicho polinucleótido se lleva en un vector para la replicación y expresión de polinucleótidos que van a ser la diana o que van a expresar la diana. Se elegirán las células para que sean compatibles con dicho vector y por ejemplo pueden ser células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

20 La bacteria gram negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como un huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La posterior purificación de la proteína deseada a partir de la masa de proteínas intracelulares de *E. coli* a veces puede ser difícil.

25 A diferencia de *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos debido a su capacidad de secretar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

30 Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica para el polipéptido de la presente invención, y/o la conveniencia de un procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren células de levadura sobre las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas o bien se secretan peor a partir de las células de levadura, o bien en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levaduras). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

35 Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como especies de *Aspergillus* (tales como aquellos descritos en los documentos EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especies de *Trichoderma*; bacterias tales como especies de *Bacillus* (tales como aquellos descritos en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), especies de *Streptomyces* y Especies de *Pseudomonas*; y levaduras tales como especies de *Kluveromyces* (tales como aquellas descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y especies de *40 Saccharomyces*. A modo de ejemplo, pueden seleccionarse huéspedes de expresión típicos de entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigens*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reseei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus lincheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

45 La utilización de células huésped adecuadas (tales como células huésped de levaduras, fúngicas o de planta) pueden permitir modificaciones postraduccionales (por ejemplo, miristoilación, glicosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según pueda ser necesario para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante de la presente invención.

50 *Organismo*

El término “organismo” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos a partir del mismo. Ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, una levadura o una planta.

55 La expresión “organismo transgénico” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana según la presente invención y/o productos obtenidos.

## *Transformación de células huésped/Organismos huésped*

60 Tal como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota. Ejemplos de huéspedes procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas sobre la transformación de huéspedes procariotas se documenta bien en la técnica, por ejemplo véase Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariota, puede necesitarse modificar adecuadamente la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como mediante eliminación de intrones.

En otra forma de realización el organismo transgénico puede ser una levadura: con respecto a esto, también se han utilizado ampliamente levaduras como vehículos para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* presenta una larga historia de utilización industrial, incluyendo su utilización para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey *et al.* (1987, 5 Yeast Biotechnology, D.R. Berry *et al.* eds, págs. 401-429, Allen and Unwin, Londres) y por King *et al.* (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, EF Walton y GT Yarrington, eds, págs. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones *Saccharomyces cerevisiae* es muy adecuado para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patógeno para seres humanos y no puede producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, presenta una larga 10 historia de utilización segura tras siglos de explotación comercial para diversos fines. Esto ha conducido a su amplia aceptabilidad pública. En tercer lugar, la utilización comercial extensa y la investigación dedicada al microorganismo dieron como resultado una gran cantidad de conocimiento sobre la genética y fisiología así como características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de productos génicos se proporciona en E. Hinchcliffe E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicle of heterologous genes", Yeast, vol 5, Anthony H Rose y J. Stuart Harrison, eds, 2.<sup>a</sup> edición, Academic Press Ltd.).

20 Varios tipos de vectores están disponibles, incluyendo vectores integrativos, que requieren la combinación con el genoma del huésped para su mantenimiento, y vectores plasmídicos que se replican autónomamente.

25 Con el fin de preparar el *Saccharomyces* transgénico, se preparan constructos de expresión insertando la secuencia de nucleótidos en un constructo diseñado para la expresión en levaduras. Se han desarrollado varios tipos de constructos utilizados para la expresión heteróloga. Los constructos contienen un promotor activo en levaduras fusionado a la secuencia de nucleótidos, habitualmente se utiliza un promotor de origen de levadura, tal como el promotor GAL1. Habitualmente, se utiliza una secuencia señal de origen de levadura, tal como la secuencia que codifica para el péptido señal SUC2. Un terminador activo en levadura finaliza el sistema de expresión.

30 Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención puede prepararse siguiendo las enseñanzas de Hinnen *et al.* (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, JD (1978, Nature, Londres 275, 104); e Ito, H *et al.* (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

35 Se seleccionan las células de levadura transformadas utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación hay varios marcadores auxotróficos tales como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia antibiótica dominante tales como marcadores de antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

40 Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas modificadas genéticamente es el de insertar la información genética en el genoma de la planta de modo que se obtiene un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los dos principios principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante la utilización de un sistema de vectores. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/Abril 45 1994 17-27). Pueden encontrarse enseñanzas adicionales sobre la transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

50 Por tanto, la presente invención también proporciona un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que va a ser la diana o va a expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína codificada. La proteína producida mediante una célula recombinante puede presentarse en la superficie de la célula. Si se desea, y tal como entenderán por los expertos en la materia, pueden diseñarse vectores de expresión que contienen secuencias codificantes con secuencias señal, que dirigen la secreción de las secuencias codificantes a través de una membrana de célula procariota o eucariota particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia codificante a la secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles (Kroll DJ *et al.* (1993) DNA Cell Biol 12: 441-53).

#### *Variantes/homólogos/derivados*

60 Además de las secuencias de aminoácidos específicas y las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente memoria, la presente invención también abarca la utilización de variantes, homólogos y derivados de las mismas. En este caso, el término "homología" puede igualarse con "identidad".

65 En el presente contexto, se entiende que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica en por lo menos el 75, el 85 o el 90%, preferentemente idéntica en por lo menos el 95 o el 98%. Aunque homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que presentan funciones/propiedades químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

## ES 2 339 450 T3

Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

- 5 El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir se alinea una secuencia con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada la vez. Esto se denomina alineación “sin huecos”. Normalmente, tales alineaciones sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente corto de residuos.
- 10 Aunque, éste es un procedimiento muy simple y compatible, no logra tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección provocará que los siguientes residuos de aminoácidos queden desalineados, dando por tanto posiblemente como resultado una gran reducción en el % de homología cuando se realiza la alineación global. Por consiguiente, la mayoría de los procedimientos de comparación se diseñan para producir alineaciones óptimas que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la 15 puntuación de homología global. Esto se logra mediante la inserción de “huecos” en la alineación de secuencia para tratar de maximizar la homología local.

- 20 Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan “penalizaciones de huecos” para cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con el menor número de huecos posible (rechazando una mayor capacidad de relación entre las dos secuencias comparadas) logrará una puntuación mayor que una con muchos huecos. Normalmente se utilizan los “costes por huecos afines” que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una menor penalización para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos utilizado más comúnmente. Por supuesto, altas penalizaciones de huecos producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas 25 de alineación permiten modificar las penalizaciones de huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza tal software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 por cada extensión.
- 30 Por tanto, el cálculo del % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones de huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo una alineación de este tipo es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Deveraux *et al.* 1984, Nucleic Acid Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 citado anteriormente - capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y la serie de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA 35 están disponibles para búsqueda en línea y fuera de línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 citado anteriormente, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

- 40 Una referencia adicional útil es la que se encuentra en FEMS Microbiol Lett. 15 de mayo de 1999; 174(2): 247-50 (y una fe de erratas publicada aparece en FEMS Microbiol Lett 1 de agosto de 1999; 177(1): 187-8).

- 45 Aunque puede medirse el % de homología final en términos de identidad, el procedimiento de alineación por sí mismo normalmente no se basa en una comparación por parejas de todo o nada. En cambio, generalmente se utiliza una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo comúnmente utilizada es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para la serie de programas de BLAST. Generalmente, los programas GCG Wisconsin utilizan o bien los valores por defecto públicos o bien una tabla de comparación de símbolos personalizada si se le suministra (véase el manual del usuario para mayores detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto 50 públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

- 55 Una vez que el software ha producido una alineación óptima, puede calcularse el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. Normalmente el software realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

- 60 Las secuencias también pueden presentar delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o naturaleza antípatica de los residuos siempre que se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que presentan valores de hidrofilicidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

# ES 2 339 450 T3

Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo según la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre ellos:

5	<b>ALIFÁTICO</b>	No polar	HUECO
			I L V
10		Polar no cargado	C S T M
			N Q
		Polar cargado	D E
			K R
15	<b>AROMÁTICO</b>		H F W Y

## *Vectores de expresión*

20 Puede incorporarse la secuencia de nucleótidos para su utilización como diana o para expresar la diana en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o desde una célula huésped compatible. Puede controlarse la expresión utilizando secuencias control que incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procariotas y promotores funcionales en células eucariotas. Pueden utilizarse promotores específicos de estímulos o específicos 25 de tejido. Asimismo, pueden utilizarse promotores químicos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

30 La proteína producida por una célula recombinante huésped mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. Pueden 35 diseñarse las secuencias codificantes con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias que codifican para la sustancia a través de una membrana de célula procariota o eucariota particular.

## *Proteínas de fusión*

35 La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Ejemplos de componentes de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de activación transcripcional y/o de unión a ADN) y  $\beta$ -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre el componente de la proteína de fusión y la secuencia de 40 proteína de interés que permite eliminar las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

45 La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico fusionado a la sustancia de la presente invención. En esta forma de realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión que no se produce de manera natural que comprende una sustancia que puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario. El antígeno o determinante antigénico puede unirse o bien al extremo amino-terminal o bien al extremo carboxi-terminal de la sustancia.

50 En otra forma de realización de la invención, puede ligarse la secuencia de aminoácido a una secuencia heteróloga que codifica para una proteína de fusión. Por ejemplo, para examinar bibliotecas de péptidos para seleccionar agentes que pueden afectar a la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia química que expresa un epítopo heterólogo que se reconoce por un anticuerpo comercialmente disponible.

## *Terapia*

55 Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse como agentes terapéuticos (es decir, en aplicaciones terapéuticas).

El término “terapia” incluye efectos curativos, efectos de alivio y efectos profilácticos.

60 La terapia puede ser en seres humanos o animales, preferentemente en animales hembra.

## *Composiciones farmacéuticas*

65 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un compuesto según la presente invención y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

- Las composiciones farmacéuticas pueden ser para utilización en seres humanos o animales en medicina humana y veterinaria y normalmente comprenderán uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para su utilización terapéutica son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante adecuado.
- 10 Pueden proporcionarse en la composición farmacéutica conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sóblico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.
- 15 Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o mediante una vía mucosa, por ejemplo, como un pulverizador o aerosol nasal para la inhalación o solución que pueda ingerirse, o por vía parenteral en la que se formula la composición mediante una forma inyectable, para su suministro, mediante, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para suministrarse por ambas vías.
- 20 Cuando el agente va a suministrarse por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debe poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.
- 25 Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en forma de un supositorio u óvulo vaginal, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo medicinal para uso externo, mediante la utilización de un parche dérmico, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos ya sea solas o en mezcla con excipientes, o en forma de elíxires, soluciones o suspensiones que contienen agentes colorantes o aromatizantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse de la mejor manera en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para preparar la solución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar que pueden formularse de manera convencional.
- 35 *Producto farmacéutico de combinación*
- El compuesto de la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más agentes activos, tales como uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos.
- 40 A modo de ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en combinación con otros inhibidores de STS y/u otros inhibidores tales como un inhibidor de aromatasa (tal como por ejemplo, 4-hidroxiandrostenediona (4-OHA)) y/o esteroides (tales como los neuroesteroideos que se producen de manera natural sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) y sulfato de pregnenolona (PS) y/u otros compuestos orgánicos estructuralmente similares). Ejemplos de otros inhibidores de STS pueden encontrarse en las referencias anteriores. A modo de ejemplo, los inhibidores de STS para su utilización en la presente invención incluyen uno cualquiera o ambos de los compuestos 2-etyl- y 2 metoxi-17-desoxi que son análogos al compuesto 5 presentado en la presente memoria.
- 45 Además, o como alternativa, el compuesto de la presente invención, el compuesto de la presente invención puede utilizarse en combinación o con un modificador de la respuesta biológica.
- 50 El término modificador de la respuesta biológica ("BRM") incluyen citocinas, inmunomoduladores, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimulantes de colonias, factores quimiotácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de superficie celular, ligandos, moléculas de adhesión de leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de la matriz extracelular, fibronectina, etc.
- 55 Para algunas aplicaciones, preferentemente, el modificador de la respuesta biológica es una citocina. Ejemplos de citocinas incluyen: interleucinas (IL) (tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL12, IL-19); factor de necrosis tumoral (TNF) (tal como TNF- $\alpha$ ); interferón alfa, beta y gamma; TGF- $\beta$ . Para algunas aplicaciones, preferentemente la citocina es el factor de necrosis tumoral (TNF). Para algunas aplicaciones, el TNF puede ser cualquier tipo de TNF (tales como TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , incluyendo derivados y mezclas de los mismos). Más preferentemente la citocina es TNF- $\alpha$ . Las enseñanzas sobre TNF puede encontrarse en la técnica (tal como en los documentos WO-A-98/08870 y WO-A-08/13348).
- 60 *Administración*
- 65 Normalmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones a continuación se muestran a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se necesiten mayores o menores intervalos de dosificación.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante inyección directa. La composición puede formularse para administración parenteral, mucosa, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica. Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis de desde 0,01 hasta 30 mg/kg de peso corporal, tal como desde 0,1 hasta 10 mg/kg, más preferentemente desde 0,1 hasta 1 mg/kg de peso corporal.

5 A modo de ejemplo adicional, los agentes de la presente invención pueden administrarse de acuerdo con un régimen de 1 a 4 veces al día, preferentemente una vez o dos veces al día. El nivel de dosis específica y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variar y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, 10 edad, peso corporal, salud general, género, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad del estado particular y el huésped que está sometiéndose a terapia.

Además de los modos típicos de suministro (indicados anteriormente) el término “administrado” también incluye 15 suministrado mediante técnicas tales como transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de los mismos. Las vías de tales mecanismos de suministro incluyen, pero no se limitan a las vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

El término “administrado” incluye, pero no se limita al suministro por una vía mucosa, por ejemplo, como un 20 pulverizador o aerosol nasal para inhalación o como una solución que puede ingerirse; una vía parenteral en la que el suministro es mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Por tanto, para la administración farmacéutica, los inhibidores de STS de la presente invención pueden formularse de cualquier manera adecuada utilizando técnicas de formulación farmacéutica convencionales y vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, etc. farmacéuticos y habitualmente para administración parenteral. Las tasa de dosis 25 eficaces aproximadas pueden estar en el intervalo de desde 1 hasta 1000 mg/día, tal como desde 10 hasta 900 mg/día e incluso desde 100 hasta 800 mg/día dependiendo de las actividades individuales de los compuestos en cuestión y para un paciente de peso corporal (70 kg) promedio. Tasas de dosificación más habituales para los compuestos preferidos y más activos estarán en el intervalo de 200 a 800 mg/día, más preferentemente, de 200 a 500 mg/día, lo más preferentemente desde 200 hasta 250 mg/día. Pueden administrarse en regímenes de dosis única, regímenes de dosis divididas 30 y/o en regímenes de dosis múltiples que duran más de varios días. Para la administración oral, pueden formularse en comprimidos, cápsulas, solución o suspensión que contienen desde 100 hasta 500 mg de compuesto por dosis unitaria. Alternativa y preferentemente, se formularán los compuestos para administración parenteral en un vehículo adecuado que puede administrarse por vía parenteral y proporcionando tasas de dosificación diaria única en el intervalo de 200 a 800 mg, preferentemente de 200 a 500 mg, más preferentemente de 200 a 250 mg. Sin embargo, tales dosis diarias 35 eficaces variarán dependiendo de la actividad inherente del principio activo y del peso corporal del paciente, estando tales variaciones dentro de la habilidad y el juicio del médico.

#### *Ciclo celular*

40 Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el método de tratamiento de un trastorno del ciclo celular.

Tal como se discutió en “Molecular Cell Biology” 3<sup>a</sup> Ed. Lodish *et al.* páginas 177-181, diferentes células eucariotas pueden crecer y dividirse a velocidades bastante diferentes. Las células de levaduras, por ejemplo, pueden 45 dividirse cada 120 min., y las primeras divisiones de los huevos fertilizados en las células embrionarias de erizo de mar e insectos tardan sólo 1530 min. porque se subdivide una célula preexistente grande. Sin embargo, la mayoría de las células de animales y plantas en crecimiento tardan 10-20 horas en duplicarse en número, y algunas se duplican a una tasa mucho más lenta. Muchas células en adultos, tales como las células nerviosas y las células del músculo estriado, no se dividen en absoluto; otras, como los fibroblastos que ayudan en la curación de las heridas, crecen en 50 caso de demanda pero lo demás son quiescentes.

Todavía, cada célula eucariota que se divide debe estar lista para donar igual cantidad de material genético a dos células hijas. La síntesis de ADN en eucariotas no se produce en todo el ciclo de división celular sino que se restringe a una parte del mismo antes de la división celular.

55 La relación entre la síntesis de ADN en eucariotas y la división celular se ha analizado exhaustivamente en cultivos de células de mamíferos que podían todas crecer y dividirse. A diferencia de las bacterias, se ha encontrado, las células eucariotas gastan sólo un parte de su tiempo en la síntesis de ADN, y ésta se completa horas antes de la división celular (mitosis). Por tanto, transcurre un intervalo de tiempo tras la síntesis de ADN y antes de la división celular; se encontró 60 que transcurre otro intervalo tras la división y antes de la siguiente ronda de síntesis de ADN. Este análisis condujo a la conclusión que el ciclo celular eucariótico consiste en una fase M (mitótica), una fase G<sub>1</sub> (el primer intervalo), la fase S (síntesis de ADN), un fase G<sub>2</sub> (el segundo intervalo) y de nuevo la fase M. Las fases entre las mitosis (G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>) se conocen colectivamente como la interfase.

65 Muchas células que no se dividen en tejidos (por ejemplo, todos los fibroblastos quiescentes) suspenden el ciclo tras la mitosis y justo antes de la síntesis de ADN; se dice que tales células “en reposo” han salido del ciclo celular y que están en el estado G<sub>0</sub>.

## ES 2 339 450 T3

Es posible identificar las células cuando están en una de los tres estadios de interfase del ciclo celular, utilizando un separador de células activadas por fluorescencia (FACS) para medir su contenido en ADN relativo: una célula que está en  $G_1$  (antes de la síntesis de ADN) presenta una cantidad  $x$  definida de ADN; durante  $S$  (replicación de ADN), ésta presenta entre  $x$  y  $2x$ ; y cuando está en  $G_2$  (o  $M$ ), presenta  $2x$  de ADN.

5

Los estadios de la mitosis y la citocinesis en una célula animal son tal como siguen

10

(a) Interfase. El estadio  $G_2$  de interfase precede inmediatamente el inicio de la mitosis. El ADN cromosómico se ha replicado y unido a la proteína durante la fase  $S$ , pero los cromosomas aún no se observan como estructuras diferenciadas. El nucleolo es la única subestructura nuclear que es visible con microscopio óptico. En una célula diploide, antes de la replicación de ADN hay dos cromosomas morfológicos para cada tipo, y se dice que la célula es  $2n$ . En  $G_2$ , tras la replicación de ADN, la célula es  $4n$ . Existen cuatro copias de cada ADN cromosómico. Dado que los cromosomas hermanos aún no se han separado los unos de los otros, se denominan cromátidas hermanas.

15

(b) Profase temprana. Los centriolos, cada uno con un centriolo hijo recién formado, empiezan a moverse hacia polos opuestos de la célula; pueden observarse los cromosomas como hebras largas. La membrana nuclear comienza a disgregarse en pequeñas vesículas.

20

(c) Profase intermedia y tardía. Se completa la condensación del cromosoma; cada estructura de cromosoma visible se compone de dos cromátidas unidas entre sí en sus centrómeros. Cada cromátida contiene una de las dos moléculas de ADN hijas recién replicadas. El huso microtubular comienza a salir de forma radial de las regiones justo adyacentes a los centriolos, que se mueven más cerca a sus polos. Algunas fibras del huso alcanzan de polo a polo; la mayoría van a las cromátidas y se unen a los cinetocoros.

25

(d) Metafase. Los cromosomas se mueven hacia el ecuador de la célula, en el que se alinean en el plano ecuatorial. Las cromátidas hermanas aún no se han separado.

30

(e) Anafase. Las dos cromátidas hermanas se separan en cromosomas independientes. Cada una contiene un centrómero que está unido mediante una fibra del huso a un polo, al que se mueve. Por tanto, se dona una copia de cada cromosoma a cada célula hija. Simultáneamente, la célula se alarga, tal como lo hacen los husos de polo a polo. La citocinesis comienza a medida que empieza a formarse el surco de escisión.

35

(f) Telofase. Se forman nuevas membranas alrededor de los núcleos hijos; los cromosomas se desenrollan y pasan a estar menos diferenciados, el nucleolo pasa a ser visible de nuevo, y la membrana nuclear se forma alrededor de cada núcleo hijo. La citocinesis está casi completa, y el huso desaparece a medida que los microtúbulos y otras fibras se despolimerizan. En toda la mitosis, el centriolo "hijo" en cada polo crece hasta su longitud completa. En la telofase, se completa la duplicación de cada uno de los centriolos originales, y se generarán nuevos centriolos hijos durante la siguiente interfase.

40

(g) Interfase. Tras la finalización de la citocinesis, las células entran en la fase  $G_1$  del ciclo celular y proceden de nuevo alrededor del ciclo.

45

Se apreciará que el ciclo celular es un proceso celular extremadamente importante. Las desviaciones del ciclo celular normal pueden dar como resultado varios trastornos médicos. El ciclo celular aumentado y/o sin restricción puede dar como resultado cáncer. El ciclo celular reducido puede dar como resultado estados degenerativos. La utilización de los compuestos de la presente invención puede proporcionar medios para tratar tales trastornos y estados.

50

Por tanto, el compuesto de la presente invención puede ser adecuado para su utilización en el tratamiento de trastornos del ciclo celular tales como cánceres, incluyendo cánceres dependientes de hormonas e independientes de hormonas.

55

Además, el compuesto de la presente invención puede ser adecuado para el tratamiento de cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, sarcomas, melanomas, cáncer de próstata, cáncer pancreático, etc. y otros tumores sólidos.

60

Para algunas aplicaciones, se inhibe y/o se impide y/o se detiene el ciclo celular, preferentemente en las que el ciclo celular se impide y/o detiene. En un aspecto, el ciclo celular puede inhibirse y/o impedirse y/o detenerse en la fase  $G_2/M$ . En un aspecto, el ciclo celular puede impedirse y/o inhibirse y/o detenerse de manera irreversible, preferentemente en las que el ciclo celular se impide y/o se detiene de manera irreversible.

65

Con la expresión "se impide y/o se inhibe y/o se detiene de manera irreversible" se hace referencia a que tras la aplicación de un compuesto de la presente invención, al retirar el compuesto, los efectos del compuesto, concretamente el impedimento y/o la inhibición y/o la detención del ciclo celular, aún pueden observarse. Más particularmente, con la expresión "se impide y/o se inhibe y/o se detiene de manera irreversible" se hace referencia a que cuando se someten a ensayo de acuerdo con el protocolo de ensayo del ciclo celular presentado en la presente memoria, las células tratadas con un compuesto de interés muestran menos crecimiento tras el estadio 2 del protocolo I que las células control. Detalles sobre este protocolo se presentan a continuación.

# ES 2 339 450 T3

Por tanto, la presente invención proporciona compuestos que: provocan inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama positivas para receptor de estrógeno (RE+) y negativas para RE (RE-) *in vitro* impidiendo y/o inhibiendo y/o deteniendo el ciclo celular; y/o provoca regresión de los tumores de mama inducidos por nitroso-metilurea (NMU) en animales intactos (es decir, no ovariectomizados), y/o impide y/o inhibe y/o detiene el ciclo celular en células cancerosas; y/o actúa *in vivo* impidiendo y/o inhibiendo y/o deteniendo y/o deteniendo el ciclo celular y/o actúa como un agonista del ciclo celular.

## 5 *Ensayo de ciclo celular (Protocolo 7)*

### 10 *Procedimiento*

#### Estadio 1

15 Se siembran las células de cáncer de mama MCF-7 en placas de cultivo de múltiples pocillos a una densidad de  $10^5$  células/pocillo. Se permite que las células se adhieran y crezcan hasta aproximadamente el 30% de confluencia cuando se tratan tal como sigue:

Control - sin tratamiento

20 Compuesto de interés (COI) 20  $\mu$ M

Se hacen crecer las células durante 6 días en medio de crecimiento que contiene el COI con cambios de medio/COI cada 3 días. Al final de este periodo, se contó el número de células utilizando un contador de células Coulter.

### 25 Estadio 2

30 Tras el tratamiento de las células durante un periodo de 6 días con el COI, se siembran nuevamente las células a una densidad de  $10^4$  células/pocillo. No se añadieron tratamientos adicionales. Se permitió que las células continuaran creciendo durante 6 días más en presencia de medio de crecimiento. Al final de este periodo, se contó de nuevo el número de células.

#### Cáncer

35 Tal como se indicó, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de un trastorno del ciclo celular. Un trastorno del ciclo celular particular es el cáncer.

40 El cáncer sigue siendo una causa principal de mortalidad en la mayoría de países occidentales. Las terapias contra el cáncer desarrolladas hasta ahora han incluido bloquear la acción o síntesis de hormonas para inhibir el crecimiento de tumores dependientes de hormonas. Sin embargo, actualmente se emplea quimioterapia más agresiva para el tratamiento de tumores independientes de hormonas.

45 Por tanto, el desarrollo de un producto farmacéutico para el tratamiento contra el cáncer de tumores dependientes de hormonas y/o independientes de hormonas, pero que carezca de algunos o todos los efectos secundarios asociados a la quimioterapia, representaría un avance terapéutico importante.

50 Se conoce que los estrógenos experimentan varias reacciones de hidroxilación y conjugación tras su síntesis. Hasta hace poco, se pensaba que tales reacciones formaban parte de un proceso metabólico que al final convertía los estrógenos en solubles en agua y potenciaba su eliminación del organismo. Ahora resulta evidente que algunos metabolitos hidroxilados (por ejemplo 2-hidroxi y 16-alfa-hidroxi) y conjugados (por ejemplo, sulfato de estrona, E1S) son importantes en la determinación de algunos de las acciones complejas que los estrógenos presentan en el organismo.

55 Los expertos han investigado la formación de estrógenos 2- y 16-hidroxilados en relación con las condiciones que alteran el riesgo de cáncer de mama. Actualmente existen evidencias de que los factores que aumentan la actividad 2-hidroxilasa se asocian con un riesgo de cáncer reducido, mientras que aquellos que aumentan la 16-alfa-hidroxilación pueden potenciar el riesgo de cáncer de mama. Se ha estimulado un interés adicional por el papel biológico de los metabolitos de estrógenos con la creciente evidencia de que el 2-metoxiestradiol es un metabolito endógeno con propiedades antimitóticas. El 2-MeOE2 se forma a partir del 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) mediante la catecol estrógeno metil transferasa, una enzima que se distribuye ampliamente por todo el cuerpo.

60 Los expertos han demostrado que el 2-MeOE2 *in vivo* inhibe el crecimiento de tumores que surgen de la inyección subcutánea de sarcoma de Meth A, melanoma B16 o células de cáncer de mama negativas para receptor de estrógeno (RE-) MDA-MB-435. También inhibe la proliferación y la migración de células endoteliales, y la angiogénesis *in vitro*. Se sugirió que la capacidad del 2-MeOE2 para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* puede deberse a su capacidad de inhibir la angiogénesis inducida por tumores en vez de la inhibición directa de la proliferación de células tumorales.

## ES 2 339 450 T3

El mecanismo mediante el cual 2-MeOE2 ejerce sus efectos antimitógenos y antiangiogénicos potentes aún está determinándose. Existe evidencia de que a altas concentraciones puede inhibir la polimerización de microtúbulos y puede actuar como un inhibidor débil de la unión de colchicina a la tubulina. Recientemente, sin embargo, a concentraciones que bloquean la mitosis, no se encontró que los filamentos de tubulina en las células se despolimerizaran sino que presentan una morfología idéntica a la observada tras el tratamiento con taxol. Por tanto, es posible, que como el taxol, un fármaco que se utiliza para la terapia contra el cáncer de mama y cáncer de mama y ovario, el 2-MeOR2 actúe estabilizando la dinámica de los microtúbulos.

Aunque la identificación de 2-MeOE2 como una nueva terapia para el cáncer representa un avance importante, la biodisponibilidad de los estrógenos administrados por vía oral es pobre. Además, pueden experimentar metabolismo extensivo durante su primer paso a través del hígado. Como parte de un programa de investigación para desarrollar un inhibidor de esteroide sulfatasa para la terapia contra el cáncer de mama, se identificó 3-estrona-O-sulfamato (EMATE) como un potente inhibidor activo dirigido al sitio. Inesperadamente, EMATE demostró presentar potentes propiedades estrogénicas con su actividad uterotrófica oral en ratas que son 100 veces más altas que la del estradiol. Se cree que su estrogenicidad potenciada resulta de su absorción por los glóbulos rojos (rbc) que lo protegen de la inactivación durante su paso a través del hígado y que actúa como un depósito para su lenta liberación durante un periodo de tiempo prolongado. Se sintetizaron varios análogos modificados del anillo A y se sometieron a prueba, incluyendo 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato. Mientras que este compuesto fue igual de potente que EMATE como un inhibidor de esteroide sulfatasa, carecía de estrogenicidad.

Se cree que el compuesto de la presente invención proporciona un medio para el tratamiento de cánceres y, especialmente, cáncer de mama.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser útil en el bloqueo del crecimiento de cánceres que incluyen leucemias y tumores sólidos tales como tumores de mama, de endometrio, de próstata, de ovario y pancreáticos.

### *Terapia relacionada con estrógenos*

Se cree que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el control de los niveles de estrógeno en el cuerpo (en particular en mujeres). Por tanto, algunos de los compuestos pueden ser útiles al proporcionar un medio de control de fertilidad (tal como un comprimido, una píldora, una solución o una pastilla para chupar anticonceptivo/a oral). Alternativamente, el compuesto puede estar en forma de un implante o como un parche.

Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de estados hormonales asociados con estrógeno.

Además o como alternativa, el compuesto de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de estados hormonales además de los asociados con estrógenos. Por tanto, el compuesto de la presente invención también puede afectar a la actividad hormonal y también puede afectar a una respuesta inmunitaria.

### *Enfermedades neurodegenerativas*

Se cree que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, y estados similares.

A modo de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS pueden ser útiles en la potenciación de la función de memoria de los pacientes que sufren de enfermedades tales como amnesia, lesiones en la cabeza, enfermedad de Alzheimer, demencia epiléptica, demencia presenil, demencia postraumática, demencia senil, demencia vascular y demencia posterior a accidente cerebrovascular o individuos que de otra manera buscan mejorar de la memoria.

### *TH1*

Se cree que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en las implicaciones de TH1.

A título de ejemplo, se cree que la presencia de inhibidores de STS dentro del macrófago u otras células presentadoras de antígeno puede conducir a una disminución de la capacidad de células T sensibilizadas para montar una respuesta de TH1 (alta IL-2, IFN $\gamma$ , baja IL-4). Por tanto, predominaría la influencia de regulación normal de otros esteroides tales como glucocorticoides.

### *Estados inflamatorios*

Se cree que algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de estados inflamatorios (tales como estados asociados con uno cualquiera o más de: autoinmunidad, incluyendo por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes tipo I y tipo II, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, tiroiditis, vasculitis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, trastornos cutáneos por ejemplo, psoriasis y dermatitis por contacto, enfermedad de injerto contra huésped; eccema, asma y rechazo de órganos tras el transplante).

A modo de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS pueden impedir el efecto fisiológico normal de DHEA o esteroides relacionados con las respuestas inmunitarias y/o inflamatorias.

Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en la fabricación de un medicamento para revelar un efecto de tipo glucocorticoide endógeno.

*Otras terapias*

También ha de entenderse que el compuesto/la composición de la presente invención puede presentar otras implicaciones médicas importantes.

Por ejemplo, el compuesto o la composición de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-99/52890-viz:

Además, o como alternativa, el compuesto o la composición de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, a continuación se proporciona parte de aquella lista: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina; crecimiento, invasión y propagación tumoral, angiogénesis, metástasis, ascitis maligna y efusión pleural maligna; isquemia cerebral, cardiopatía isquémica, artrosis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, ateroesclerosis, accidente cerebrovascular, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; psoriasis, dermatitis atópica, ulceras crónicas, epidermolisis bullosa; ulceración de la córnea, retinopatía y curación de herida quirúrgica; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anaflaxia; reestenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, ateroesclerosis o endoesclerosis.

Además, o como alternativa, el compuesto o la composición de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, a continuación se proporciona parte de esa lista: citocina y actividad de proliferación/diferenciación celular; actividad immunosupresora o inmunoestimulante (por ejemplo, para tratar inmunodeficiencia, incluyendo infección con el virus de inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratamiento de cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias; y para impedir el rechazo de trasplantes o inducir la inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides; promover el crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo, para curación de heridas, tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona foliculoestimulante (modulación de fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo, para movilizar tipos de células específicos a los sitios de lesión o infección); actividad hemostática y trombolítica (por ejemplo, para tratar hemofilia y accidente cerebrovascular); actividad antiinflamatoria (para tratar por ejemplo, choque séptico o enfermedad de Crohn); como antimicrobianos; moduladores de por ejemplo, metabolismo o comportamiento; como analgésicos; para tratar trastornos de deficiencia específica; en el tratamiento de por ejemplo, psoriasis, en medicina humana o veterinaria.

Además, o como alternativa, la composición de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de trastornos enumerados en el documento WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, a continuación se proporciona parte de esa lista: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de células T y por tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con inflamación; inhibir la capacidad de los macrófagos y células T de adherirse a los componentes de la matriz extracelular y fibronectina, así como regular por incremento la expresión del receptor fas en células T; inhibir la reacción inmunitaria no deseada e inflamación incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoidea, inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades de colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada con ateroesclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de dificultad respiratoria u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epididimorquitis, infertilidad, traumatismo testicular u otras enfermedades testiculares relacionadas con la inmunidad, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, pre-eclampsia y otras enfermedades ginecológicas relacionadas con la inmunidad y/o inflamación, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveoretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular quístico, oftalmía simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunes e inflamatorios de la enfermedad degenerativa de fondo, componentes inflamatorios del traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, retinopatías proliferativas del humor vítreo, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo, tras la cirugía de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o inflamatoria contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas relacionadas con la inmunidad e inflamación, inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias o condiciones o trastornos en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, sería beneficiosa la supresión inmunitaria y/o inflamatoria, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en-

cefalopatía relacionada con VIH, complejo de demencia relacionado con SIDA, enfermedad de Devic, enfermedad de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, estados o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de accidentes cerebrovasculares, síndrome pospolio, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, 5 neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Sydenham, miastenia grave, pseudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofias y distrofias musculares, y enfermedades relacionadas con la inmunidad e inflamación, condiciones o trastornos del sistema nervioso central y periférico, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, 10 complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de medula ósea u otras complicaciones de trasplante y/o efectos secundarios, complicaciones inflamatorias y/o inmunes y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo, debido a la infección con un portador viral, o inflamación asociada con SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, para tratar o mejorar las enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo, leucemia, reduciendo la cantidad de monocitos o linfocitosis, para la prevención y/o 15 el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células, tejidos y órganos naturales o artificiales tales como córnea, medula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial.

#### *Preparación de compuestos*

20 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro adecuado. A modo de ejemplo, los compuestos de sulfamatos de la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro de sulfamoilo adecuado, de fórmula  $R^5R^6NSO_2Cl$ .

Las condiciones típicas para llevar a cabo la reacción son tal como siguen:

25 Se añaden hidruro de sodio y un cloruro de sulfamoilo a una disolución agitada del alcohol en dimetilformamida anhidra a 0°C. Posteriormente, se permite que la reacción se caliente a temperatura ambiente después de lo cual se continúa la agitación durante 24 horas más. La mezcla de reacción se vierte en una disolución saturada fría de bicarbonato de sodio y la fase acuosa resultante se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos se secan sobre  $MgSO_4$  anhidro. La filtración seguida por la evaporación del disolvente a vacío y co-evaporado con tolueno proporciona un residuo bruto que se purifica adicionalmente por cromatografía ultrarrápida.

30 Preferentemente, se derivatiza el alcohol, según sea apropiado, antes de la reacción con el cloruro de sulfamoilo. Cuando sea necesario, pueden protegerse los grupos funcionales en el alcohol de manera conocida y el grupo o grupos protector(es) se elimina(n) al final de la reacción.

35 Preferentemente, los compuestos de sulfamato se preparan según las enseñanzas de Page *et al.* (1990 *Tetrahedron* 46; 2059-2068).

40 Los compuestos de fosfonato pueden prepararse combinando adecuadamente las enseñanzas de Page *et al.* (1990 *Tetrahedron* 46; 2059-2068) y el documento PCT/GB92/01586.

45 Los compuestos de sulfonato pueden prepararse mediante la adaptación adecuada de las enseñanzas de Page *et al.* (1990 *Tetrahedron* 46; 2059-2068) y el documento PCT/GB92/01586.

50 También se presentan preparaciones preferidas en el siguiente texto.

#### **Ejemplos**

55 La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle a modo de ejemplo sólo haciendo referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1 muestra un esquema resumen;

60 La figura 2 muestra un esquema resumen;

La figura 3 muestra una gráfica; y

La figura 4 muestra una gráfica.

65 La figura 5 muestra una placa.

La figura 6 muestra una placa.

La figura 7 muestra una gráfica.

La figura 8 muestra una gráfica.

5 La figura 9 muestra una gráfica.

La figura 10 muestra placas.

10 La figura 11 muestra una gráfica.

La figura 12 muestra una gráfica.

15 La figura 13 muestra una gráfica.

La figura 14 muestra fotografías fluorescentes.

La figura 15 muestra una gráfica.

20 La figura 16 muestra una gráfica.

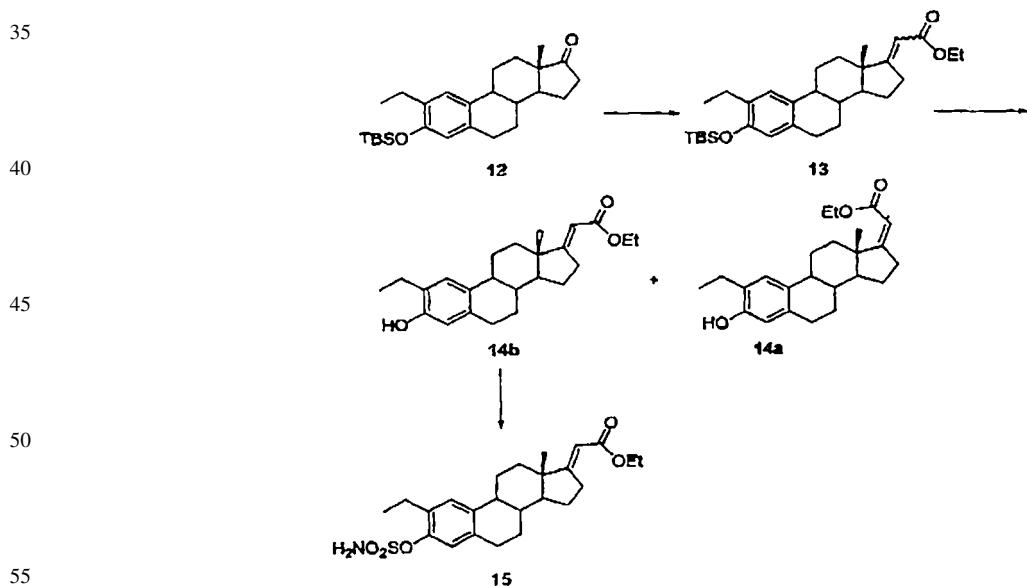
La figura 17 muestra una gráfica.

25 La presente invención se describirá ahora sólo a modo de ejemplo. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos también presentan compuestos preferidos de la presente invención, así como rutas preferidas para prepararlos y productos intermedios útiles que no están dentro del alcance de la invención en la preparación de los mismos.

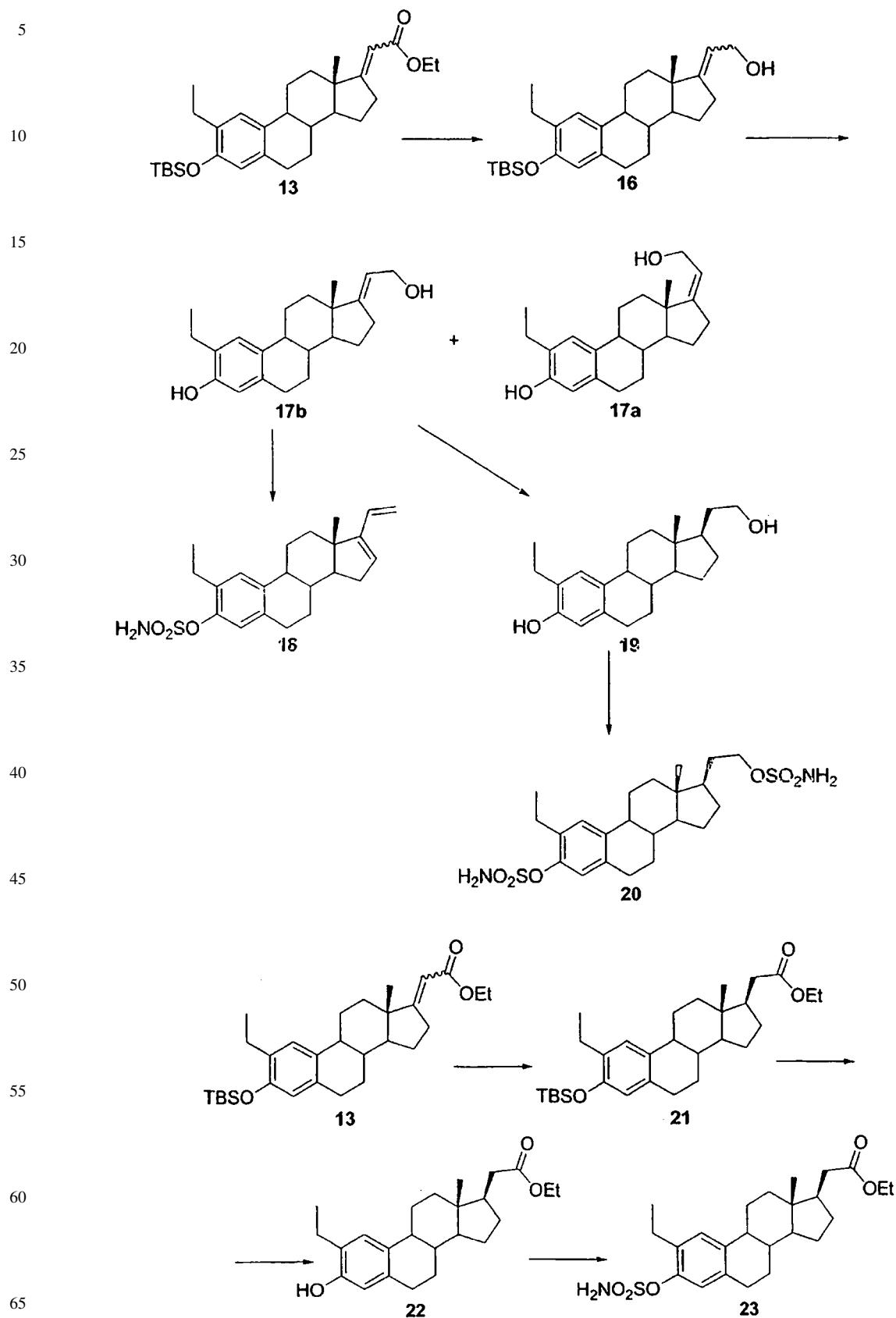
### Síntesis

30 Se siguieron los siguientes esquemas

La síntesis de 17-alquenil-sulfamatos 2-sustituidos

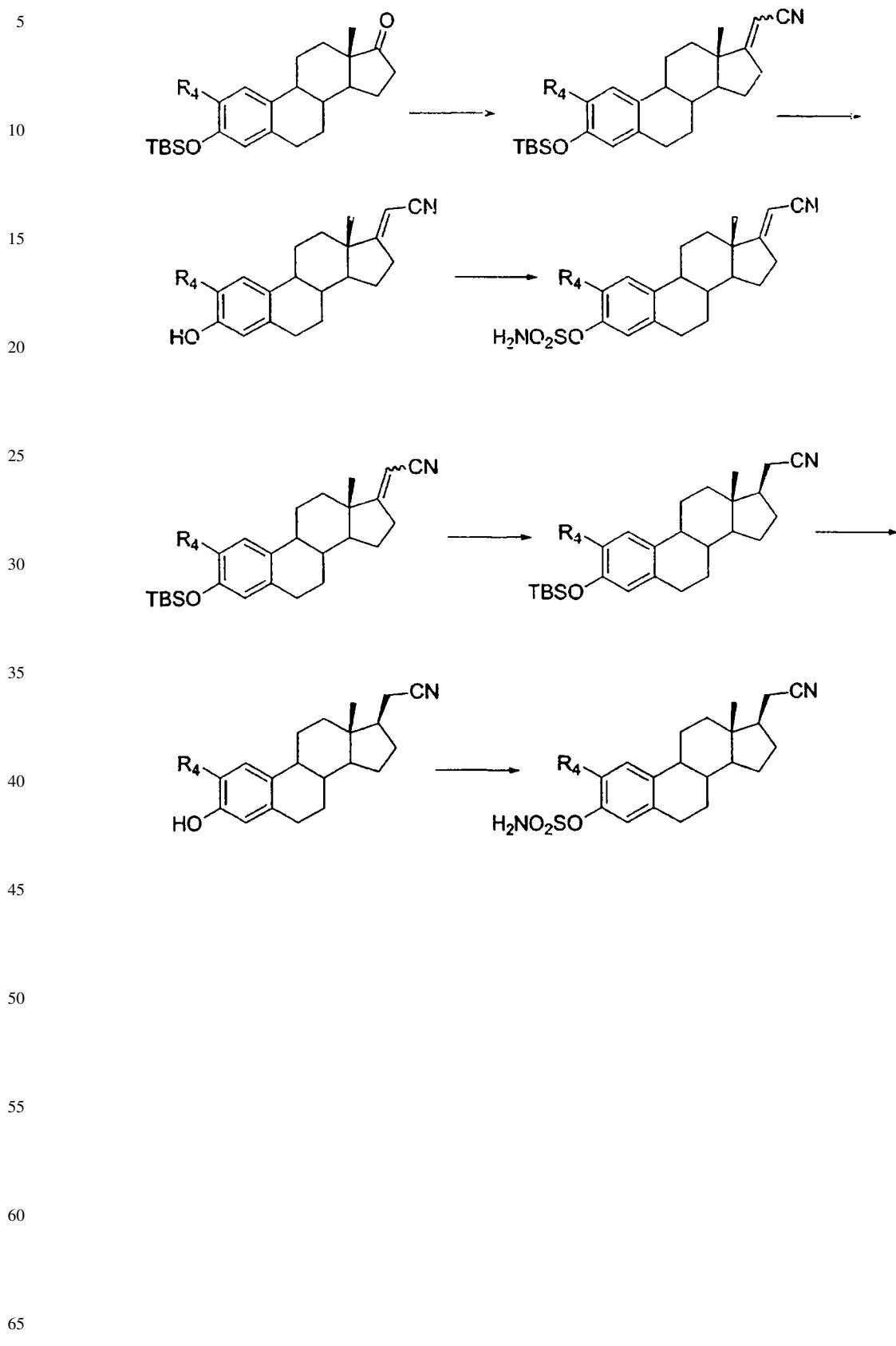


Transformaciones de la función éster 17-alquenfílico



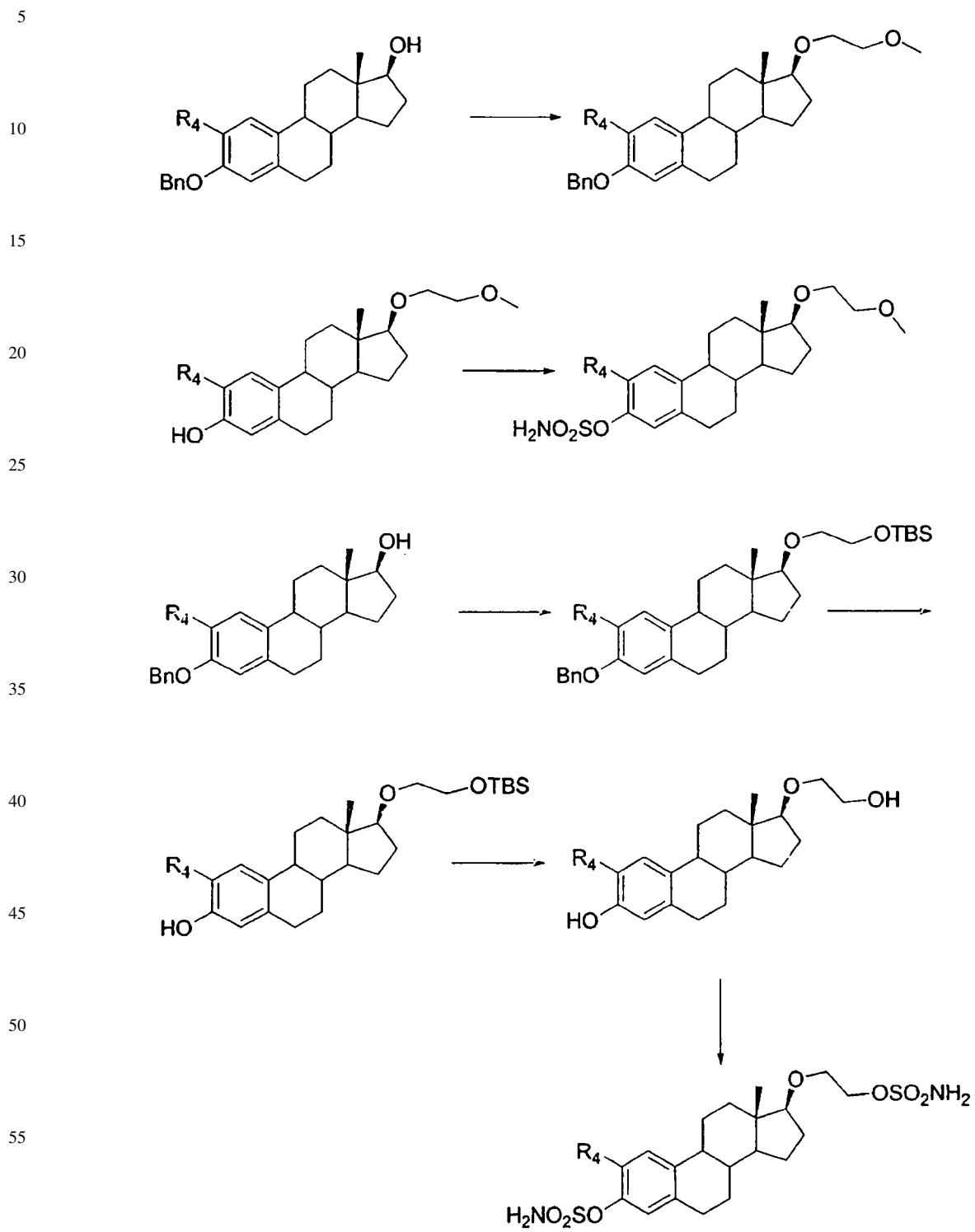
# ES 2 339 450 T3

Síntesis de EMATES funcionalizados con nitrilo

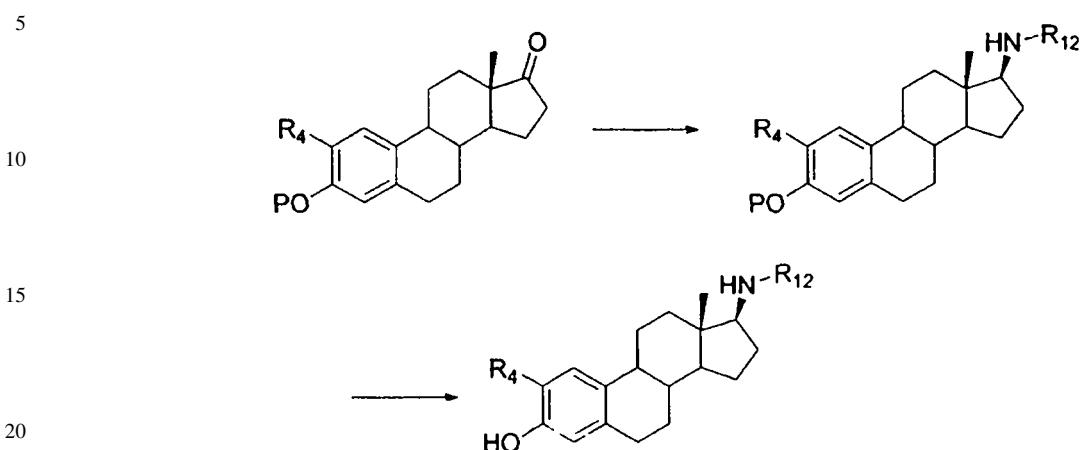


ES 2 339 450 T3

17-Alquil-EMATE



## 17-Aminoestrógenos



25 En los que P es un grupo protector.

## Procedimiento A

30 Se concentró a vacío una disolución en tolueno 0,745 M de cloruro de sulfamoilo (680  $\mu$ l, 0,507 mmoles) (temperatura del baño de agua por debajo de 30°C) y se enfrió en un baño de hielo antes de la adición de DMA (1,5 ml). Se añadió entonces el fenol apropiado (0,253 mmoles) y se dejó que la reacción llegase a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se combinaron las fracciones orgánicas combinadas, se lavaron con agua (5 x 10 ml) y salmuera (10 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío.

35 *3-O-terc-butildimetilsilil éter de estrona 1*



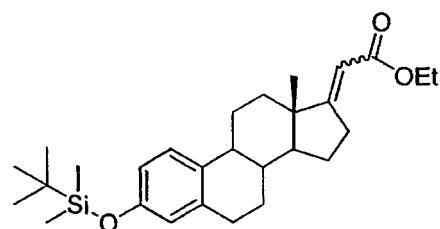
## 50 Procedimiento B

55 Se disolvieron estrona (10 g, 37 mmoles), imidazol (6,4 g, 94 mmoles) y cloruro de *terc*-butildimetsilsililo (6,7 g, 44,4 mmoles) en dimetilformamida (130 ml) y se agitaron bajo nitrógeno durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua y se extrajo la mezcla con diclorometano (3 x 100 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con agua (2 x 100 ml) y salmuera (10 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío.

60 La recristalización en etanol produjo estrona protegida como agujas cristalinas blancas (11,34 g, 29,6 mmoles, 80%). P.f. 172-173°C (p.f. de la bibl. 170-172°C).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,19 [6 H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ], 0,91 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 0,98 [9 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,36-1,68 (5 H, m, H de alquilo), 1,90-2,55 (7 H, m, H de alquilo), 2,82-2,88 (2 H, m, H de alquilo), 6,57 (1 H, d,  $J = 2,3$ , ArH-4), 6,62 (1 H, dd,  $J = 8,6, 2,3$ , ArH-2), 7,12 (1 H, d,  $J = 8,6$ , ArH-1).

P.f.: Fevig *et al.* J.Org.Chem. 52: 1987, 247-251.

5 *Éster etílico del ácido [3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidrociclopenta[a]fenantren-17-iliden]-acético 2*



Procedimiento C

- 20 Se agitó hidruro de sodio (520 mg, 17,4 mmoles) en THF seco (15 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente hasta que todo el sólido se había disuelto. Se añadió fosfonoacetato de trietilo (3,20 g, 2,84 ml 7,14 mmoles) y se agitó durante 10 min. antes de la adición de TBS estrona 1 (2 g, 5,2 mmoles). Se calentó la mezcla resultante a reflujo durante la noche. Se añadió agua y se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con agua (2 x 50 ml) y salmuera (10 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío.
- 25 La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo una mezcla de dos isómeros como un sólido cristalino blanco (1,73 g, 3,77 mmoles, 73%). Se determinó que la razón de isómeros era de 5:1 a partir de la RMN.  $m/z$  (EI<sup>+</sup>) 454 ( $\text{M}^+$ , 50%), 397 (90%), 82,9 (100%). HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{Si}$  454,2903, hallado 454,2910.
- 30 Procedimiento: Ewers *et al.* *Tetrahedron*, 54: 1998, 4277-4282.

35 *Éster etílico del ácido (3-hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-acético 3*



50 Procedimiento D

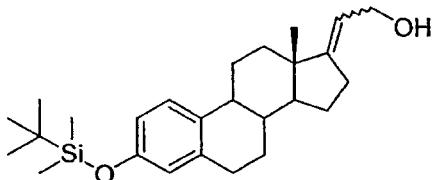
- 55 Se agitaron TBS éter 2 (100 mg, 0,220 mmoles), fluoruro de tetra-butilamonio 1 M en THF (300  $\mu\text{l}$ , 0,300 mmoles) y THF (5 ml) a temperatura ambiente durante 2 h bajo nitrógeno. Se añadió agua y se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 5 ml). Se combinaron las fracciones orgánicas combinadas, se lavaron con agua (2 x 5 ml) y salmuera (5 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío.

60 La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo una mezcla de dos isómeros como un sólido cristalino blanco (74 mg, 0,218 mmoles, 99%). P.f. 118-120°C. Se determinó que la razón de isómeros era de 5:1 a partir de la RMN.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,86 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1,30 (3 H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,41-2,91 (15 H, m, H de alquilo), 4,17 (2 H, q,  $J$  = 7,0), 5,20 (1 H, s, OH), 5,59 (1 H, t,  $J$  = 2,3, H olefínico), 6,58 (1 H, d,  $J$  = 2,7, ArH-4), 6,64 (1 H, dd,  $J$  = 8,2, 2,7, ArH-2), 7,15 (1 H, d,  $J$  = 8,2, ArH-1);  $m/z$  (FAB<sup>+</sup>) 341,1 [( $\text{MH}^+$ ), 100%]; HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3+\text{H}$  34,2116, hallado 341,2111.

2-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-ilideno]-etanol 4

5

10



15

#### Procedimiento E

20 A una disolución de TBS éter 2 (300 mg, 0,66 mmoles) en THF (5 ml) se le añadió una disolución 1,5 M de hidruro de diisobutilamonio en tolueno (1 ml, 1,5 mmoles) a -78°C bajo nitrógeno. Se calentó la disolución hasta 0°C y se agitó durante 1,5 h. Se añadieron metanol y agua a 0°C y se dejó calentar la disolución hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. Se extrajo la disolución turbia con acetato de etilo (3 x 10 ml) y se lavaron las fracciones orgánicas combinadas con agua (2 x 10 ml) y salmuera (10 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío.

25

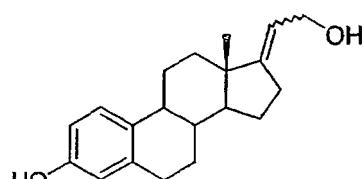
Se utilizó el sólido blanco resultante (179 mg, 0,434 mmoles, 66%) sin purificación adicional. P.f. 128-130°C (P.f. de la bibl. 128-130°C).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,18 [6 H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ], 0,81 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 0,98 [9 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,03-1,61 (7 H, m, H de alquilo), 1,74-1,97 (3 H, m, H de alquilo), 2,16-2,42 (3 H, m, H de alquilo), 2,75-2,86 (2 H, m, H de alquilo), 4,07-4,23 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 5,26-5,31 (1 H, m, H olefínico), 6,55 (1 H, d,  $J$  = 2,3, ArH-4), 6,61 (1 H, dd,  $J$  = 8,6, 2,3, ArH-2), 7,13 (1 H, d,  $J$  = 8,6, ArH-1). Se determinó que la razón de isómeros era de 8:1 a partir de la RMN.

30  $m/z$  (FAB<sup>+</sup>) 412,1 ( $\text{M}^+$ , 7%), 73,0 (100%), 147 (35%); HRMS (FAB+) calc. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Si}$  412,2798, hallado 412,2778.

35 Procedimiento: Tanabe *et al.* Patente US nº 6.281.205 B1. 2001. Esteroides antiestrogénicos y composiciones farmacéuticas asociadas y procedimientos de utilización. P.f.: Ewers *et al.* Tetrahedron, 54: 1998, 4277-4282.

40 17-(2-Hidroxi-etiliden)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol, 5

45



50

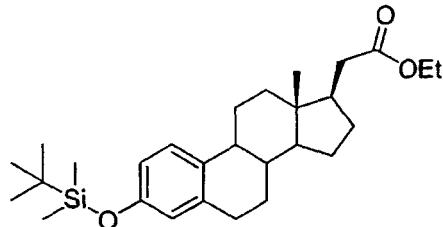
55 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D en alcohol alílico 4 (179 mg, 434 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo una mezcla de dos isómeros como un polvo blanco (74 mg, 0,218 mmoles, 99%). P.f. 200-202°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,81 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1,13-1,56 (7 H, m, H de alquilo), 1,82-1,98 (3 H, m, H de alquilo), 2,16-2,43 (3 H, m, H de alquilo), 2,82-2,87 (2 H, m, H de alquilo), 5,27-5,32 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4,53 (1 H, s, OH), 5,27-5,32 (1 H, m, H olefínico), 6,56 (1 H, d,  $J$  = 2,3, ArH-4), 6,63 (1 H, dd,  $J$  = 8,6, 2,3, ArH-2), 7,17 (1 H, d,  $J$  = 8,6, ArH-1);  $m/z$  (FAB<sup>+</sup>) 298,1 ( $\text{M}^+$ , 75%), 281,1 (100%); HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$  298,1933, hallado 298,1935.

60

65

*Éster etílico del ácido [3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-acético 6*

5



10

15

Procedimiento F

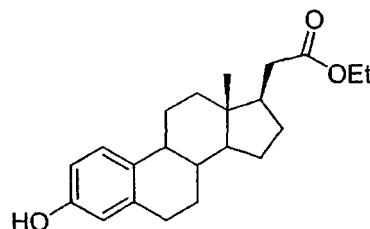
20 Se agitó una disolución del éster 2 (300 mg, 0,66 mmoles) y paladio al 5% sobre carbonato de calcio (17 mg) en etanol (5 ml) bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite lavado con etanol. Se concentró el filtrado a vacío.

25 La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano: acetato de etilo 4:1) produjo el producto reducido 6 como un sólido cristalino blanco (233 mg, 0,51 mmoles, 77%). P.f. 64-66°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,18 [6 H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ]), 0,64 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 0,97 [9 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,27 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,30-1,56 (5 H, m, H de alquilo), 1,73-2,42 (9 H, m, H de alquilo), 2,79-2,82 (2 H, m, H de alquilo), 4,13 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 6,54 (1 H, d,  $J$  = 2,7, ArH-4), 6,60 (1 H, dd,  $J$  = 8,6, 2,7, ArH-2), 7,11 (1 H, d,  $J$  = 8,6, ArH-1);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 456,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3\text{Si}$  456,3060, hallado 456,3041.

30 Procedimiento: Tanabe *et al.* Patente US número 6.281.205 B1. 2001. Esteroides antiestrogénicos y composiciones farmacéuticas asociadas y procedimientos de utilización.

35 *Éster etílico del ácido (3-hidroxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-acético 7*

40



45

50

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el éster 6 (100 mg, 0,211 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo el fenol 7 como agujas de color hueso (56 mg, 0,164 mmoles, 78%). P.f. 126-128°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,63 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,27 (3 H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,30-2,43 (14 H, m, H de alquilo), 2,78-2,84 (2 H, m, H de alquilo), 4,13 (2 H, q,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_2$ ), 4,60 (1 H, s, OH), 6,56 (1 H, d,  $J$  = 2,7, ArH-4), 6,62 (1 H, dd,  $J$  = 8,2, 2,7, ArH-2), 7,14 (1 H, d,  $J$  = 8,2, ArH-1).  $m/z$  (FAB $^+$ ) 342,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$  342,2195, hallado 342,2201.

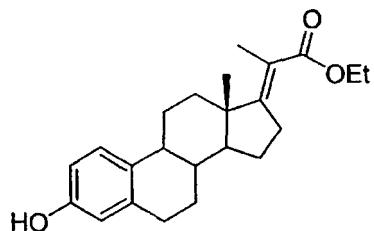
60

65

ES 2 339 450 T3

Éster etílico del ácido 2-(3-hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-propiónico 8

5



10

15

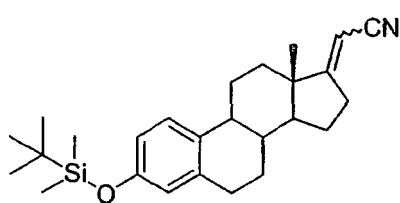
Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento C utilizando la TBS estrona 1 (1 g, 2,6 mmoles) y 2-fosfonopropionato de trietilo (1,7 g, 1,53 ml, 7,14 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo un único isómero del producto desprotonado 8 como un polvo blanco (170 mg, 0,48 mmoles, 18%). P.f. 113-115°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,91 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,40 (3 H, t,  $J$  = 6,6,  $\text{CH}_3$ ), 1,43-1,68 (7 H, m, H de alquilo), 1,91-2,28 (6 H, m, H de alquilo), 2,37-2,42 (2 H, m, H de alquilo), 2,87-2,91 (2 H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4,00 (2 H, q,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_2$ ), 6,64 (1 H, d,  $J$  = 2,7, ArH-4), 6,71 (1 H, dd,  $J$  = 8,6, 2,7, ArH-2), 7,19 (1 H, d,  $J$  = 8,6, ArH-1).

[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a] fenantren-17-iliden]-acetonitrilo 9

20

25

30



35

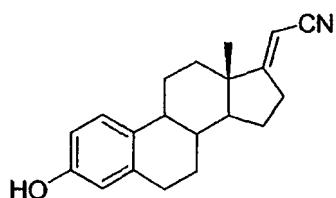
Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento C utilizando la TBS estrona 1 (5 g, 13,0 mmoles) y (cianometil)fosfonato de dietilo (4,02 g, 4,4 ml, 22,7 mmoles). La CCF y la  $^1\text{H}$  RMN de la mezcla de reacción bruta tras el tratamiento final indicaron que el material de partida ya no estaba presente y que el producto era una mezcla de los dos isómeros 9 en una razón de 6:1. Se utilizó esta mezcla sin purificación adicional.

40

(3-Hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-acetonitrilo 10

45

50



55

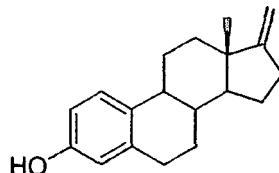
60

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D en silil éter 9 (100 g, 0,246 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo un único isómero del fenol 10 como un polvo blanco (53 mg, 0,18 mmoles, 73%). P.f. 264-266°C.  $\delta_{\text{H}}$  (DMSO) 0,84 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,24-1,50 (8 H, m, H de alquilo), 1,82-1,87 (2 H, m, H de alquilo), 1,93-1,97 (1 H, m, H de alquilo), 2,09-2,16 (1 H, m, H de alquilo), 2,18-2,34 (1 H, m, H de alquilo), 2,66-2,77 (2 H, m, H de alquilo), 5,37 (1 H, m, H olefínico), 6,44 (1 H, d,  $J$  = 2,64, ArH-4), 6,51 (1 H, dd,  $J$  = 8,2, 2,6, ArH-2), 7,06 (1 H, d,  $J$  = 8,2, ArH-1), 9,02 (1 H, s, OH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 293,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAS $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ON}$  293,1780, hallado 293,1783.

65

## 13-Metil-17-metilen-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 11

5

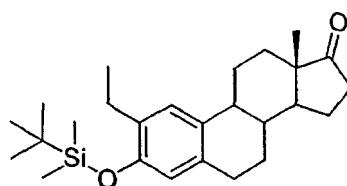


10 Se añadió *terc*-butóxido de potasio (220 mg, 1,96 mmoles) a THF seco (5 ml) y se agitó durante 10 minutes para completar la disolución de la sal. Se añadió bromuro de metiltrifenilfosfonio (700 mg, 1,96 mmoles) en porciones a la disolución de sal. Se disolvió estrona (500 mg, 1,85 mmoles) en THF (5 ml) y se añadió gota a gota por medio de una jeringuilla a la disolución amarilla brillante. Tras agitarla temperatura ambiente durante 2 h, se calentó la reacción a reflujo durante la noche. Se enfrió la reacción, se añadió agua (10 ml) y se extrajo la mezcla utilizando acetato de etilo (3 x 10 ml). Se combinaron las fracciones orgánicas combinadas, se lavaron con agua (2 x 10 ml) y salmuera (10 ml), se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a vacío. La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) y la recristalización en tolueno/hexano produjeron el alqueno 11 como un sólido cristalino blanco (53 mg, 0,198 mmoles, 11%). P.f. 130-132°C (p.f. de la bibl. 134-137°C).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,82 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,20-1,62 (6 H, m, de alquilo), 1,78-1,85 (1 H, m, H de alquilo), 1,90-1,99 (2 H, m, H de alquilo), 2,16-2,38 (3 H, m, H de alquilo), 2,50-2,59 (1 H, m, H de alquilo), 2,78-2,92 (2 H, m, H de alquilo), 4,50 (1 H, s, OH), 4,67 (2 H, t,  $J$  = 2,0, H olefínico), 6,57 (1 H, d,  $J$  = 2,7, ArH-4), 6,63 (1 H, dd,  $J$  = 8,6, 2,7, Arch-2), 7,17 (1 H, d,  $J$  = 8,6, ArH-1).

15  
20  
25 Procedimiento: Williams, Preparation of Alkenes, Oxford University Press, 1996, p. 32. P.f.: Forcellese *et al.* J.Org.Chem. 46: 1981, 3326-3328.

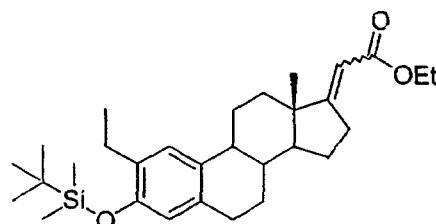
30 3-(*terc*-Butil-dimetil-silaniloxi)-2-*etil*-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-una 12

35



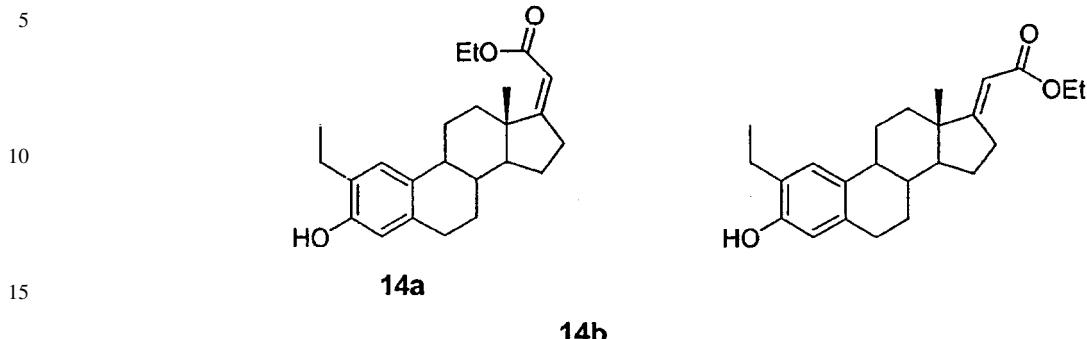
35 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento B utilizando 2-etilestrona (4 g, 13,4 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo el silyl éter 12 como un sólido cristalino blanco (5,02 g, 12,2 mmoles, 91%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,24 [6H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ], 0,98 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1,01 [9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,17 (3H, t,  $J$  = 7,8,  $\text{CH}_3$ ), 1,40-1,66 (6H, m, H de alquilo), 1,94-2,52 (7H, m, H de alquilo), 2,57 (2H, q,  $J$  = 7,8,  $\text{CH}_2$ ), 2,82-2,86 (2H, m, H de alquilo), 6,50 (1H, s, ArH), 7,06 (1H, s, ArH).

45  
50  
55 Éster etílico del ácido [3-(*terc*-butil-dimethyl-silaniloxi)-2-*etil*-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-ilidén]-acético 13



55 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento C utilizando el silyl éter 12 (412 mg, 1 mmoles) y fosfonoacetato de trietilo (271 mg, 240  $\mu\text{l}$ , 1,2 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo los dos isómeros 13 como un aceite incoloro (290 mg, 0,602 mmoles, 60%). Se determinó que la razón de isómeros era de 6:1 a partir de la  $^1\text{H}$  RMN.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,22 [6H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ], 0,97 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,00 [9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,17 (3H, t,  $J$  = 7,8,  $\text{CH}_3$ ), 1,29 (3H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,59-2,44 (11H, m, H de alquilo), 2,56 (2H, q,  $J$  = 7,8,  $\text{CH}_2$ ), 2,76-2,92 (4H, m, H de alquilo), 4,15 (2H, q,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_2$ ), 5,62 (1H, t,  $J$  = 2,0, H olefínico), 6,48 (1H, s, ArH), 7,06 (1H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 482,1 ( $\text{M}^+$ , 90%), 73,0 (100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{Si}$  482,3216, hallado ??.

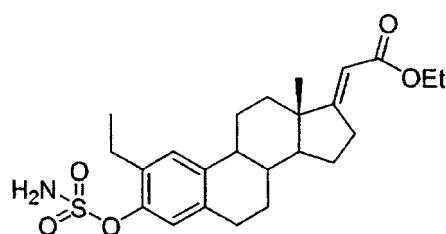
5 *Z*-y *E*-Éster etílico del ácido (2-ethyl-3-hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[*a*]fenantren-17-iliden)-acético 14a y 14b



Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el éster 13 (290 mg, 0,639 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo el isómero *Z* 14a como un polvo blanco (28 mg, 0,0757 mmoles, 12%). P.f. 157-159°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 1,04 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,29 (3 H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,35-2,48 (13 H, m, H de alquilo), 2,60 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,78-2,84 (2 H, m, H de alquilo), 4,09-4,12 (2 H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4,46 (1 H, s, OH), 5,68 (1 H, t,  $J$  = 2,0, H olefínico), 6,50 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 368,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_3$  368,2351, hallado 368,2364.

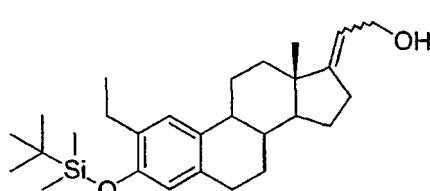
La elución adicional produjo el isómero *E* 14b como un aceite amarillo pálido (184 mg, 0,497 mmoles, 78%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,86 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,23 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,29 (3 H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,33-2,45 (11 H, m, H de alquilo), 2,60 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,74-2,91 (4 H, m, H de alquilo), 4,15 (2 H, q,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_2$ ), 4,52 (1 H, s, OH), 5,59 (1 H, t,  $J$  = 2,3, H olefínico), 6,51 (1 H, s, ArH), 7,06 (1 H, s, ArH).

*Éster etílico del ácido (2-ethyl-13-metil-3-sulfamoiloxi-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[*a*]fenantren-17-iliden)-acético 15*



Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando el éster 14b (132 mg, 0,357 mmoles). Se utilizó HPLC preparativa para purificar el sulfamato 15 como un sólido blanco (28 mg, 0,0757 mmoles, 21%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $d_6$ -acetona) 0,91 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,18 (3 H, t,  $J$  = 7,7,  $\text{CH}_3$ ), 1,23 (3 H, t,  $J$  = 7,2,  $\text{CH}_3$ ), 1,28-1,65 (6 H, m, H de alquilo), 1,86-2,08 (5 H, m, H de alquilo), 2,24-2,34 (1 H, m, H de alquilo), 2,47-2,54 (1 H, m, H de alquilo), (2 H, q,  $J$  = 7,7,  $\text{CH}_2$ ), 2,81-2,89 (2 H, m, H de alquilo), 4,10 (2 H, q,  $J$  = 7,2,  $\text{CH}_2$ ), 5,56 (1 H, t,  $J$  = 2,5, H olefínico), 7,09 (1 H, s, ArH), 7,26 (1 H, s, ArH).

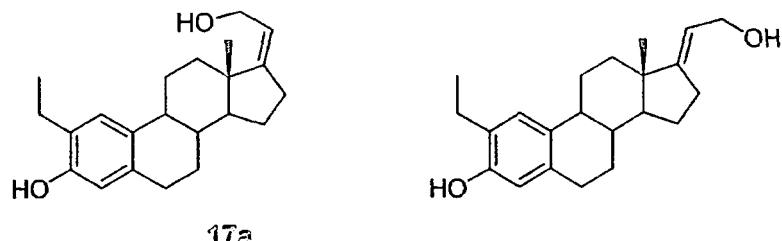
*2-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-2-ethyl-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[*a*]fenantren-17-iliden]-etanol 16*



Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento E utilizando el éster 14b (412 mg, 1 mmoles). Tanto la CCF como la  $^1\text{H}$  RMN indicaron que no estaba presente material de partida y se utilizó el producto alcohol vinílico 16 sin purificación adicional.

5 *Z- y E-2-Etil-17-(2-hidroxi-etiliden)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 17a y 17b*

10



15

20

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el alcohol vinílico 16 (520 mg, 1,18 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo el fenol Z 17a como un polvo blanco (27 mg, 0,0831 mmoles, 7%). P.f. 205-207°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,93 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,23 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,26-1,61 (5 H, m, H de alquilo), 1,72-1,79 (2 H, m, H de alquilo), 1,89-1,92 (1 H, m, H de alquilo), 2,18-2,39 (4 H, m, H de alquilo), 2,47-2,53 (1 H, m, H de alquilo), 2,60 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,74-2,87 (2 H, m, H de alquilo), 4,21 (1 H, dd,  $J$  = 7,0, 12,1,  $\text{CHOH}$ ), 4,35 (1 H, dd,  $J$  = 12,1, 7,0,  $\text{CHOH}$ ), 4,62 (1 H, s, OH), 5,33-5,37 (1 H, m, H olefínico), 6,50 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 326,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2$  326,2246, hallado 326,2259.

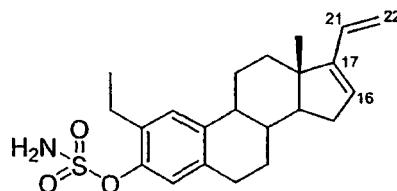
30

La elución adicional produjo el fenol E 17b como un polvo blanco (245 mg, 0,754 mmoles, 64%). P.f. 169-171°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,79 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,27-1,61 (5 H, m, H de alquilo), 1,74-1,97 (3 H, m, H de alquilo), 2,20-2,48 (5 H, m, H de alquilo), 2,59 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,77-2,83 (2 H, m, H de alquilo), 4,11-4,60 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4,50 (1 H, s, OH), 5,26-5,37 (1 H, m, H olefínico), 6,48 (1 H, s, ArH), 7,06 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 326,1 ( $\text{M}^+$ , 50%), 73,0 (100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2$  326,2246, hallado 326,2256.

35

40 *Éster 2-etil-13-metil-17-vinil-7,8,9,11,12,13,14,15-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 18*

45



50

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando 17b (65 mg, 0,200 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$   $\text{CHCl}_3$ ) produjo el sulfamato 18 como un aceite incoloro (36 mg, 0,093 mmoles, 47%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,91 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,27-1,55 (2 H, m, H de alquilo), 1,61-1,73 (4 H, m, H de alquilo), 1,85-2,07 (2 H, m, H de alquilo), 2,18-2,39 (4 H, m, H de alquilo), 2,69 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,83-2,92 (2 H, m, H de alquilo), 4,88-4,97 (1 H, m, H olefínico-16), 4,99(2 H, s  $\text{NH}_2$ ), 5,35(1 H, d,  $J$  = 18,0, H olefínico-22), 5,73 (1 H, s a, H olefínico-22), 6,32 (1 H, dd,  $J$  = 18,0, 11,4, H olefínico-21), 7,10 (1H, s, ArH), 7,18 (1H, s, ArH).

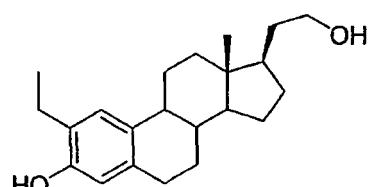
60

65

## 2-Etil-17-(2-hidroxi-etil)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 19

5

10

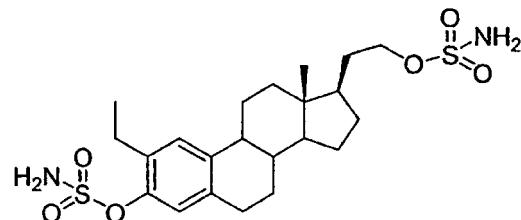


Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento F utilizando el alcohol vinílico 16 (76 mg, 0,233 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 5:1) produjo el diol 19 como un polvo blanco (51 mg, 0,155 mmoles, 67%). P.f. 162-164°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,63 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,24-1,50 (10 H, m, H de alquilo), 1,72-1,88 (4 H, m, H de alquilo), 2,15-2,32 (2 H, m, H de alquilo), 2,59 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,76-2,81 (2 H, m, H de alquilo), 3,61-3,75 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 5,0 (1 H, s, OH), 6,49 (1 H, s, ArH), 7,05 (1 H, s, ArH);  $\delta_{\text{c}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 12,6 ( $\text{CH}_3$ ), 14,4 ( $\text{CH}_3$ ), 23,0 ( $\text{CH}_2$ ), 24,4 ( $\text{CH}_2$ ), 26,5 ( $\text{CH}_2$ ), 27,9 ( $\text{CH}_2$ ), 28,4 ( $\text{CH}_2$ ), 29,3 ( $\text{CH}_2$ ), 33,7 ( $\text{CH}_2$ ), 37,8 ( $\text{CH}_2$ ), 38,9 (CH), 42,5 (C), 44,2(CH), 47,2 (CH), 54,7 (CH), 62,7 ( $\text{CH}_2$ ), 115,2 (CH), 126,3 (CH), 127,1 (C), 132,8 (C), 135,5 (C), 151,1 (C).  $m/z$  (FAB $^+$ ) 328,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$  328,2402, hallado 328,2407.

25 *Éster 2-etil-13-metil-17-(2-sulfamoiloxi-etil)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 20*

30

35

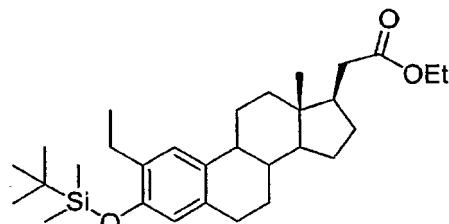


45

40 *Éster etílico del ácido [3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-2-etil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-acético 21*

50

55

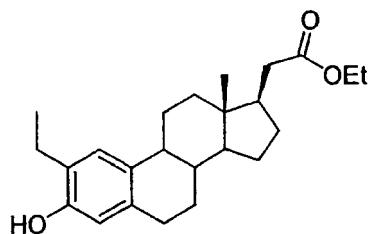


60

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento F utilizando el éster 13 (100 mg, 0,220 mmoles). La  $^1\text{H}$  RMN indicó que no estaba presente material de partida y se utilizó el producto éster 21 sin purificación adicional.

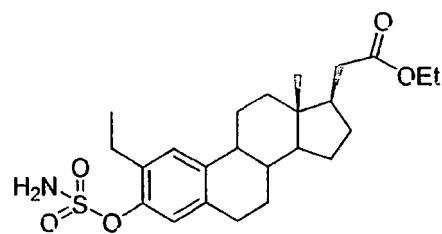
65

5      *Éster etílico del ácido (2-etil-3-hidroxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-acético 22*



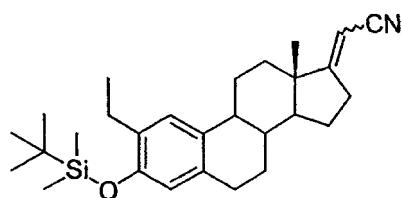
15      Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el éster 21 (66 mg, 0,145 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo el éster saturado 22 como un aceite incoloro (38 mg, 0,103 mmoles, 71%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,63 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,27 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,24-2,00 (11 H, m, H de alquilo), 2,12-2,22 (3 H, m, H de alquilo), 2,27-2,33 (1 H, m, H de alquilo), 2,41 (1 H, dd,  $J$  = 14,5, 5,1, H de alquilo), 2,59 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,73-2,81 (2 H, m, H de alquilo), 4,13 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 4,62 (1 H, s, OH), 6,49 (1 H, s, ArH), 7,06 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB) 370,2 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_3$  370,2508, hallado 370,2537.

25      *Éster etílico del ácido (2-etil-13-metil-3-sulfamoiloxi-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-acético 23*



40      Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando el éster 22 (100 mg, 0,270 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano: acetato de etilo 9:1) produjo el sulfamato 23 como un polvo blanco (83 mg, 0,185 mmoles, 68%). P.f. 120-122°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,63 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,27 (3 H, t,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_3$ ), 1,24-1,50 (7 H, m, H de alquilo), 1,74-1,98 (5 H, m, H de alquilo), 2,11-2,42 (4 H, m, H de alquilo), 2,68 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,82-2,84 (2 H, m, H de alquilo), 4,12 (2 H, q,  $J$  = 7,0,  $\text{CH}_2$ ), 5,08 (2 H, s, NH<sub>2</sub>), 7,05 (1 H, s, ArH), 7,16 (1 H, s, ArH).  $\delta_{\text{c}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 12,5, 14,2, 14,6, 23,0, 24,2, 26,2, 27,5, 28,2, 29,2, 35,4, 37,3, 38,4, 42,3, 44,2, 46,9, 54,3, 60,2, 121,4, 126,9, 133,6, 136,0, 139,6, 146,1, 174,0;  $m/z$  (FAB) 449,1 ( $\text{M}^+$ , 10%), 135,0 (100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{NS}$  449,2236, hallado 449,2237.

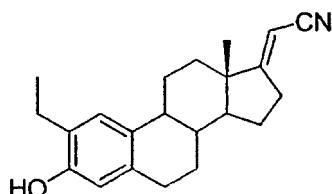
50      *[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-2-etil-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden]-acetonitrilo 24*



60      Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento C utilizando el silyl éter 12 (1 g, 2,6 mmoles) y (cianometil)fosfonato de dietilo (691 mg, 631  $\mu\text{l}$ , 3,9 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 20:1) produjo los dos isómeros 24 como un aceite incoloro (641 mg, 1,47 mmoles, 57%).  $m/z$  (FAB) 435,3 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{ONSi}$  435,2957, hallado 435,2961.

(2-Etil-3-hidroxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-acetonitrilo 25

5

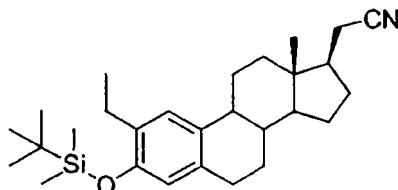


10

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el silit éter 24 (540 mg, 1,24 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo el fenol 25 como un aceite amarillo pálido (284 mg, 0,88 mmoles, 71%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,88 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,25-1,62 (6 H, m, H de alquilo), 1,90-1,97 (3 H de alquilo), 2,18-2,24 (1H, m, H de alquilo), 2,40-2,45 (1 H, m, H de alquilo), 2,59 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,63-2,84 (4 H, m, H de alquilo), 4,53 (1 H, s, OH), 5,04 (1 H, t,  $J$  = 2,3, H olefínico), 6,49 (1 H, s, ArH), 7,02 (1 H, s, ArH);  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 14,4 ( $\text{CH}_3$ ), 18,0 ( $\text{CH}_3$ ), 23,0 ( $\text{CH}_3$ ), 23,5 ( $\text{CH}_2$ ), 26,3 ( $\text{CH}_2$ ), 27,4 ( $\text{CH}_2$ ), 29,1 ( $\text{CH}_2$ ), 30,3 ( $\text{CH}_2$ ), 34,7 ( $\text{CH}_2$ ), 38,5 (CH), 43,7 (CH), 46,4 (C), 52,8 (CH), 87,7 (CH), 115,2 (CH), 117,5 (C), 126,2 (CH), 127,4 (C), 131,7 (C), 135,2 (C), 151,4 (C), 181,1 (C);  $m/z$  (FAB) 321,3 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{ON}$  321,2093, hallado 321,2088.

[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-2-etil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-acetonitrilo 26

30



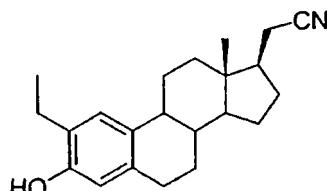
35

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento F utilizando el silit éter 24 (100 mg, 0,230 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo el nitrilo saturado 26 como un aceite incoloro (81 mg, 0,185 mmoles, 81%).  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,22 [6 H, s,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ], 0,67 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,00 [9 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ], 1,16 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,26-1,53 (7 H, m, H de alquilo), 1,78-2,17 (5 H, m, H de alquilo), 2,20-2,29 (2 H, m, H de alquilo), 2,31-2,40 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2,56 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,74-2,81 (2 H, m, H de alquilo), 6,47 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB) 437,4 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{OSiN}$  437,3114, hallado 437,3121.

45

(2-Etil-3-hidroxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-acetonitrilo 27

50



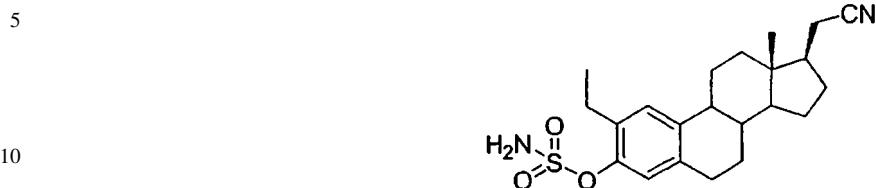
55

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el nitrilo 26 (73 mg, 0,167 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo el fenol 27 como un sólido blanco (38 mg, 0,118 mmoles, 70%). P.f. 195-197°C.  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,67 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,27-1,53 (7 H, m, H de alquilo), 1,74-1,89 (3 H, m, H de alquilo), 1,99 (1 H, dt,  $J$  = 12,1, 3,1, H de alquilo), 2,03-2,12 (1 H, m, H de alquilo), 2,14-2,42 (4 H, m, H de alquilo), 2,59 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,75-2,86 (2 H, m, H de alquilo), 4,67 (1 H, s OH), 6,49 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB) 323,2 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB<sup>+</sup>) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{ON}$  323,2249, hallado 323,2252.

65

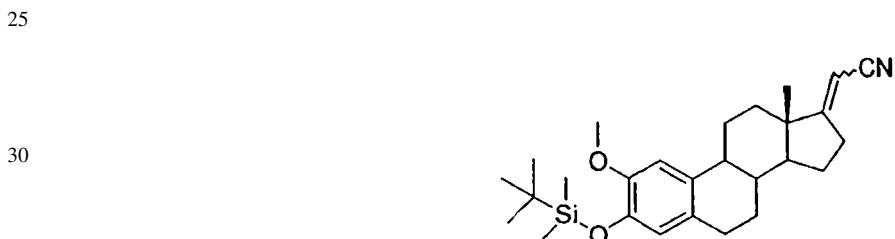
# ES 2 339 450 T3

Éster 17-cianometil-2-etyl-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 28 (STX 564)



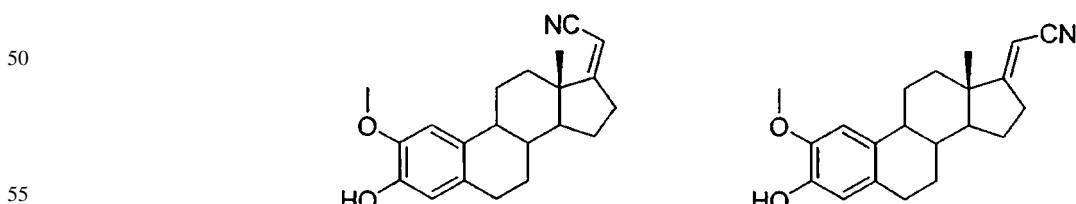
15 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando el fenol 27 (182 mg, 0,591 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{CHCl}_3$ ) produjo el sulfamato 28 como agujas blancas (120 mg, 0,299 mmoles, 51%). P.f. 175-177°C.  $\delta_H$  ( $d_6$ -acetona) 0,73 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,17 (3 H, t,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_3$ ), 1,26-1,56 (7 H, m, H de alquilo), 1,77-2,13 (5 H, m, H de alquilo), 2,26-2,58 (3 H, m, H de alquilo), 2,69 (2 H, q,  $J$  = 7,4,  $\text{CH}_2$ ), 2,80-2,83 (2 H, m, H de alquilo), 7,08 (1 H, s, ArH), 7,12 (2 H, s,  $\text{NH}_2$ ), 7,23 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB) 402,0 ( $\text{M}^+$ , 100%);  
20 HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{N}_2\text{S}$  402,1977, hallado 402,1975.

25  $[\beta\text{-}(\text{terc-Butil-dimetil-silaniloxi})\text{-}2\text{-metoxi}\text{-}13\text{-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-ilidenmetil}\text{-}2\text{-metilen-amina}$  29



35 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento C utilizando 2-metoxi-3-terc-butildimetilsiloxiestrona (1 g, 2,42 mmoles) y (cianometil)fosfonato de dietilo (712 g, 650  $\mu\text{l}$ , 4,02 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 19:1) produjo los dos alquenos isoméricos 29 como un aceite incoloro (4,81 mg, 1,14 mmoles, 27%). Se determinó a partir de la RMN que la razón de los dos isómeros era de 40 1:1.  $m/z$  (FAB $^+$ ) 438,1 [( $\text{MH}^+$ ), 50%], 380,1 (100%), 73,0 (80%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{NSi}$  437,2750, hallado 437,2731.

45 Z- y E-(3-Hidroxi-2-metoxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta [a]fenantren-17-iliden)-acetonitrilo 30



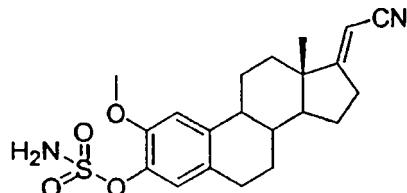
60 Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento D utilizando el silil éter 29 (400 mg, 0,95 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 9:1) produjo una mezcla de los dos isómeros como un polvo blanco (91 mg, 0,281 mmoles, 30%).

65 La elución adicional produjo el isómero E 30 como un sólido blanco (115 mg, 0,356 mmoles, 37%).  $\delta_H$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 0,89 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,25-1,64 (6 H, m, H de alquilo), 1,90-1,99 (3 H, m, H de alquilo), 2,22-2,27 (1 H, m, H de alquilo), 2,35-2,40 (1 H, m, H de alquilo), 2,60-2,69 (1 H, m, H de alquilo), 2,74-2,82 (3 H, m H de alquilo), 3,86 (3 H, s  $\text{OCH}_3$ ), 5,05 (1 H, t,  $J$  = 2,7, H olefínico), 5,43 s, OH), 6,65 (1 H, s, ArH), 6,77 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 323,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS(FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_2\text{N}$  323,1885, hallado 323,1885.

# ES 2 339 450 T3

Éster 2-metoxi-13-metil-17-metilenaminometilen-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 31 (STX 639)

5



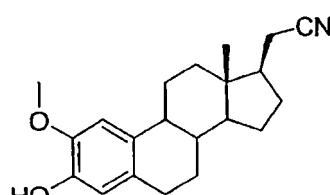
10

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando el fenol 30 (40 mg, 0,124 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo el sulfamato 31 como agujas blancas (36 mg, 0,0896 mmoles, 72%). P.f. 202-204°C.  $\delta_H$  ( $d_6$ -acetona) 0,95 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,25-1,65 (7 H, m, H de alquilo), 1,94-2,08 (2 H, m, H de alquilo), 2,26-2,35 (1 H, m, H de alquilo), 2,46-2,66 (2 H, m, H de alquilo), 2,74-2,84 (3 H, m, H de alquilo), 3,84 (3 H, s  $\text{OCH}_3$ ), 5,27 (1 H, t,  $J$  = 2,3, H olefínico), 6,90 (2 H, s,  $\text{NH}_2$ ), 7,02 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 402,0 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$  402,1613, hallado 402,1611.

20

(3-Hidroxi-2-metoxi-13-metil-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-acetonitrilo 32

25



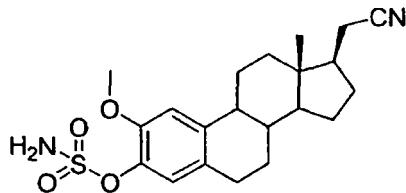
30

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento F utilizando el alqueno 30 (100 mg, 0,310 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) produjo el nitrilo saturado 32 como un sólido blanco (81 mg, 0,249 mmoles, 80%). P.f. 172-174°C.  $\delta_H$  ( $d_6$ -acetona) 0,71 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,22-1,52 (7 H, m, H de alquilo), 1,73-1,90 (3 H, m, H de alquilo), 1,98-2,08 (2 H, m, H de alquilo), 2,14-2,22 (1 H, m, H de alquilo), 2,30-2,39 (2 H, m, H de alquilo), 2,45-2,54 (1 H, m, H de alquilo), 2,65-2,80 (2 H, m, H de alquilo), 3,80 (3 H, s  $\text{OCH}_3$ ), 6,52 (1 H, s, ArH), 6,84 (1 H, s, ArH), 8,00 (1 H, s, OH).  $m/z$  [FAB $^+$ ] 325 (100%,  $\text{M}^+$ ); HRMS [FAB $^+$ ] hallado 325,20418,  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_2$  requiere 325,20418; calculado C, 77,5%; H, 8,36%; N, 4,30%; hallado C, 77,2%; H, 8,41%; N, 4,01%.

45

Éster 17-cianometil-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 33 (STX 641)

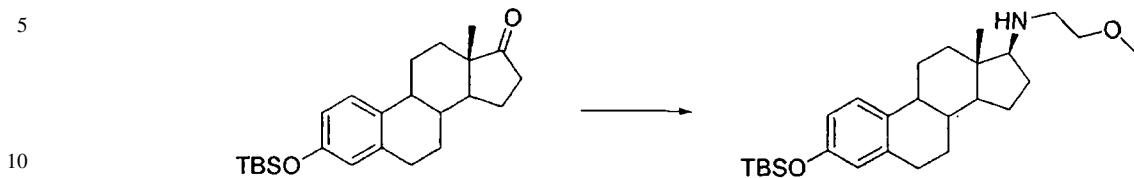
50



55

Se llevó a cabo la reacción tal como se describió en el procedimiento A utilizando el nitrilo 32 (60 mg, 0,185 mmoles). La cromatografía en columna ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$  hexano:acetato de etilo 4:1) y la recristalización en acetona/hexano produjo el sulfamato 33 como un sólido cristalino blanco (20,3 mg, 0,0547 mmoles, 30%). P.f. 183-185°C.  $\delta_H$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 0,69 (3 H, s  $\text{CH}_3$ ), 1,20-1,55 (7 H, m, H de alquilo), 1,70-1,94 (3 H, m, H de alquilo), 1,98-2,50 (6 H, m, H de alquilo), 2,74-2,84 (2 H, m, H de alquilo), 3,87 (3 H, s  $\text{OCH}_3$ ), 5,06 (2 H, s,  $\text{NH}_2$ ), 6,92 (1 H, s, ArH), 7,04 (1 H, s, ArH);  $\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 12,2 ( $\text{CH}_3$ ), 17,6 ( $\text{CH}_2$ ), 23,9 ( $\text{CH}_2$ ), 26,3 ( $\text{CH}_2$ ), 27,4 ( $\text{CH}_2$ ), 28,3 ( $\text{CH}_2$ ), 28,6 ( $\text{CH}_2$ ), 37,3 ( $\text{CH}_2$ ), 38,3 (CH), 42,5 (C), 44,3 (CH), 46,7 (CH), 54,4 (CH), 56,4 ( $\text{CH}_3$ ), 110,4 (CH), 119,5 (C), 124,2 (CH), 130,2 (C), 138,2 (C), 140,4 (C), 149,0 (C);  $m/z$  (FAB $^+$ ) 404,1 ( $\text{M}^+$ , 100%); HRMS (FAB $^+$ ) calc. para  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$  404,1770, hallado 404,1767;  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}$  requiere C, 62,35%; H, 6,98%; N, 6,93%, hallado C, 62,50%; H, 6,96%; N, 6,85%.

## 3-O-(terc-Butil-dimetil-silil)-17-(2-dimetillamino-etilamino)-estrona 34



15 A una disolución de 3-OTBS estrona (200 mg, 0,52 mmoles) en THF (20 ml) se le añadió 2-metoxietilamina (226  $\mu$ l, 4 eq.), y entonces, tras 10 minutos, triacetoxiborohidruro de sodio (449 mg, 4,5 eq.) y ácido acético (150  $\mu$ l). Tras agitar durante cuatro días a temperatura ambiente, se extinguío la reacción con hidróxido de sodio (4 ml, 1 M ac.) y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). El tratamiento final acuoso convencional dio la amina deseada 34 como un sólido blanco que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 7,09 (1 H, d,  $J$  8,4, ArH), 6,58 (1 H, dd,  $J$  8,4 y 2,5, ArH), 6,52 (1 H, d,  $J$  2,5, ArH), 3,34-3,51 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3,34 (3H, s, OMe), 2,57-2,92 (5H, m, 6-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N y CHN), 1,20-2,30 (14H, m), 0,96 (9H, s, tBu), 0,74 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) y 0,17 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>);  $\delta_c$  153,6, 137,8, 133,2, 126,1, 119,9, 117,1, 72,4, 69,3, 58,7, 52,4, 48,5, 44,0, 43,2, 38,7, 38,3, 29,7, 29,6, 27,5, 26,4, 25,7, 23,5, 1801, 11,8 y -4,4. FAB+ 444,3.

20

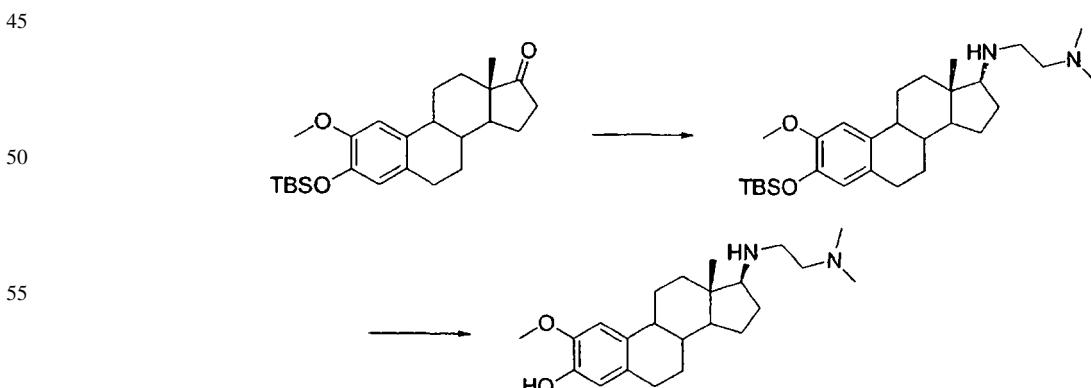
## 17-(2-Dimetilamino-etilamino)-estrona 35



35 Se trató una disolución de estratrieno 34 protegido con TBS (160 mg) en THF (10 ml) con TBAF (0,4 ml, 1 M solución en THF). Tras agitar durante la noche, se llevó a cabo un tratamiento final acuoso convencional dando el producto deseado 35 que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 7,10 (1 H, d,  $J$  8,6, ArH), 6,58 (1 H, dd,  $J$  8,6 y 2,7, ArH), 6,52 (1 H, d,  $J$  2,7, ArH), 3,48-3,52 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3,34 (3H, s, OMe), 2,62-2,94 (5H, m, 6-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N y CHN), 1,24-2,52 (15H, m) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

40

## 17-(2-Dimetilamino-etilamino)-2-metoxi-13-metil-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 36



60 A una disolución de 2-MeO-3-OTBS estrona (415 mg) en THF (10 ml) se le añadió *N,N*-dimetiletilendiamina (439  $\mu$ l, 4 mmoles), y entonces, tras 10 minutos, triacetoxiborohidruro de sodio (954 mg, 4,5 mmoles) y ácido acético (300  $\mu$ l). Tras agitar durante tres días a temperatura ambiente, se extinguío la reacción con hidróxido de sodio (4 ml, 1 M ac.) y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). El tratamiento final acuoso convencional dio la amina deseada como un aceite amarillo pálido que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 6,76 (1 H, s, ArH), 6,53 (1H, s, ArH), 3,76 (3H, s, OMe), 2,65-2,82 (4H, m, 6-CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>N), 2,62 (1H, dd,  $J$  8,6 y 8,6, CHN), 2,36-2,48 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 1,20-2,30 (20H, m incluyendo 2,23 (6H, s, NMe<sub>2</sub>)), 0,99 (9H, s, tBu), 0,76 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) y 0,15 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>). Se disolvió entonces el aminoesterido protegido con TBS en THF (20 ml) y se trató con TBAF (1,5 ml, 1 M en THF) y KF (10

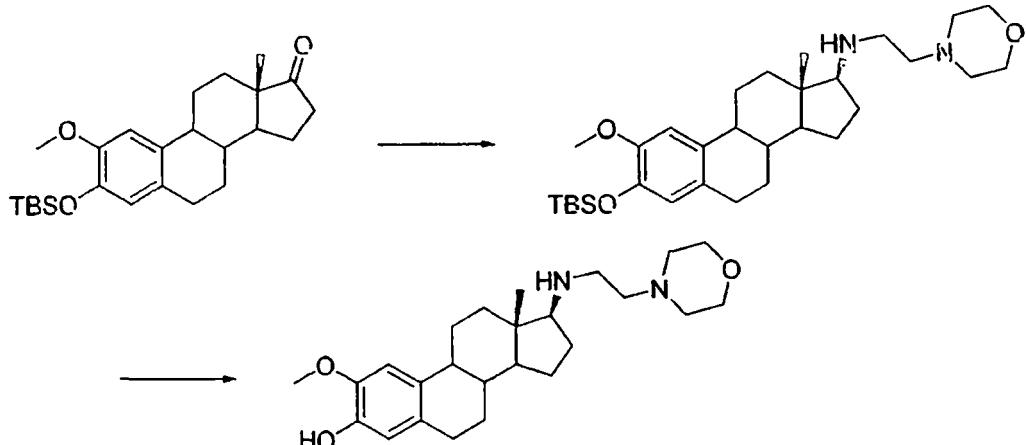
65

mg) antes de agitar durante 8 h. Se añadió entonces acetato de etilo (50 ml) y se lavó la disolución resultante con disolución de bicarbonato de sodio (50 ml, saturada), agua (50 ml) y salmuera (2 x 50 ml), se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporó. Se purificó el aceite amarillo pálido resultante mediante cromatografía en columna ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  de 99:1 a 1:1) dando la amina deseada 36 como un aceite incoloro transparente que entonces se trituró en éter/hexano dando un polvo blanco, p.f. 108°C, que mostró  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ref. TMS = 0) 6,77 (1 H, s, ArH), 6,61 (1 H, s, ArH), 3,85 (3H, s, OMe), 2,68-2,84 (4H, m, 6- $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2,63 (1H, dd,  $J$  8,6 y 8,6,  $\text{CHN}$ ), 2,38-2,46 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1,20-2,30 (21 H, m incluyendo 2,24 (6H, s,  $\text{NMe}_2$ )) y 0,76 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ).  $\delta_{\text{c}}$  144,6, 143,4, 131,5, 129,3, 114,7, 108,1, 69,4, 59,3, 56,0, 52,4, 46,3, 45,5, 44,3, 43,2, 38,8, 38,3, 29,7, 29,1, 27,6, 26,9, 23,5 y 11,9.

10

2-Metoxi-17-(2-morfolin-4-il-etilamino)-13-metil-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 37

15



20

25

30

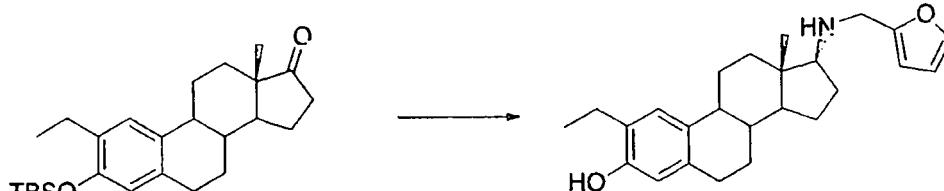
A una disolución de 2-MeO-3-OTBS estrona (315 mg, 0,76 mmoles) en THF (10 ml) se le añadió 4-(2-aminoethyl)morfolina (395 mg, 4 eq.), y entonces, tras 10 minutos, triacetoxiborohidruro de sodio (723 mg, 4,5 eq.) y ácido acético (240  $\mu\text{l}$ ). Tras agitar durante cuatro días a temperatura ambiente, se extinguío la reacción con hidróxido de sodio (4 ml, 1 M ac.) y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). El tratamiento final acuoso convencional dio la amina deseada como un polvo blanco que mostró  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ref. TMS = 0) 6,78 (1 H, s, ArH), 6,54 (1H, s, ArH), 3,78 (3H, s, OMe), 3,66-3,76 (4H, m, 2 x  $\text{OCH}_2$ ), 1,20-2,88 (25H, m) 0,99 (9H, s,  $\text{tBu}$ ), 0,76 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ) y 0,16 (6H, s,  $\text{SiMe}_2$ ). Se disolvió entonces el aminoesteroide protegido con TBS en THF (20 ml) y se trató con TBAF (1,5 ml, 1 M en THF) y KF (10 mg) antes de agitar durante 8 h. se añadió entonces acetato de etilo (50 ml) y se lavó la disolución resultante con disolución de bicarbonato de sodio (50 ml, saturada), agua (50 ml) y salmuera (2 x 50 ml), se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se evaporó. Se purificó el aceite amarillo pálido resultante mediante cromatografía en columna ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  de 99:1 a 1:1) dando la amina deseada 37 como un aceite incoloro transparente que entonces se trituró en éter/hexano dando un polvo blanco, p.f. 144-146°C, que mostró  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ref. TMS = 0) 6,75 (1H, s, ArH), 6,61 (1H, s, ArH), 3,84 (3H, s, OMe), 3,67-3,71 (4H, m, 2 x  $\text{OCH}_2$ ) 2,72-2,86 (4H, m, 6- $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2,65 (1 H, dd,  $J$  9,0 y 8,2,  $\text{CHN}$ ), 2,52 (2H, dd,  $J$  6,3 y 6,3,  $\text{CH}_2\text{N}$ ) 2,46-2,50 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1,20-2,26 (15H, m) y 0,76 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ).  $\delta_{\text{c}}$  144,5, 143,4, 131,3, 129,3 (todos los C), 114,6, 108,0 (ambos CH), 69,2 (CH), 67,0, 57,9 (ambos  $\text{CH}_2$ ), 56,0 ( $\text{CH}_3$ ), 53,7 ( $\text{CH}_2$ ), 52,3 (CH), 45,0 ( $\text{CH}_2$ ), 44,3 (CH), 43,2 (C), 38,8 (CH), 38,2, 29,4, 29,1, 27,6, 26,9, 23,5 (todos los  $\text{CH}_2$ ) y 12,0 ( $\text{CH}_3$ ).

50

2-Etil-17-[(furan-2-ilmetil)-amino]-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 38

55

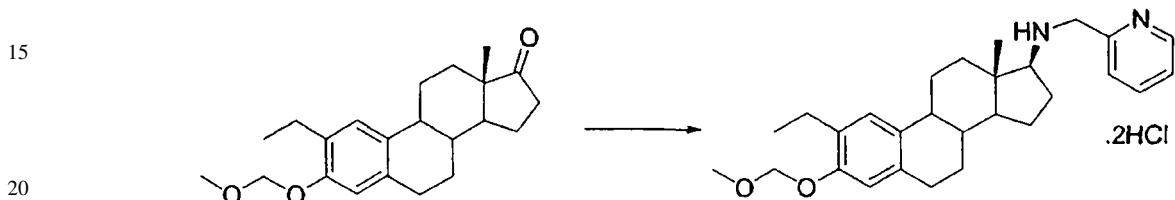
60



A una disolución de 2-Et-3-O-TBS estrona (414 mg, 1 mmoles) en THF (10 ml) se le añadió furfurylamina (354  $\mu\text{l}$ , 4 mmoles), y a continuación, tras 10 minutos, triacetoxiborohidruro de sodio (954 mg, 4,5 mmoles) y ácido acético (300  $\mu\text{l}$ ). Tras agitar durante tres días a temperatura ambiente, se extinguío la reacción con hidróxido de sodio (4 ml, 1 M ac.) y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). El tratamiento final acuoso convencional proporcionó la amina deseada como un aceite amarillo pálido. A una disolución de esteroide protegido en THF se le añadió TBAF (1,5 ml) y fluoruro de potasio (10 mg). Tras agitar a temperatura ambiente durante 14 h, se añadieron éter (50 ml) y agua (50 ml). Se separó entonces la fase orgánica, se lavó con disolución de hidrogenocarbonato de sodio (25 ml), agua (25 ml)

5 y salmuera (25 ml), posteriormente se secó y se evaporó dando un aceite amarillo pálido (270 mg). Se aisló entonces el producto deseado 38 mediante cromatografía en columna (0-3% de metanol en cloroformo) como un aceite incoloro transparente que mostró  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ , TMS = 0) 7,37 (1 H, dd,  $J$  1,8 y 0,8), 7,03 (1 H, s, ArH), 6,49 (1 H, s, ArH), 6,32 (1 H, dd,  $J$  3,2 y 1,8), 6,24 (1 H, dd,  $J$  3,2 y 0,8), 3,85-3,95 (2H, m,  $CH_2N$ ), 2,76-2,84 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2,67 (1H, dd, 8,8 y 8,5,  $CHN$ ), 2,60 (2H, q,  $J$  7,6,  $CH_2Me$ ), 2,27-2,35 (1H, m), 2,14-2,22 (1H, m), 1,26-2,07 (13H, m), 1,23 (3H, t,  $J$  7,6,  $CH_2Me$ ) y 0,81 (3H, s, 18- $CH_3$ ).

10 *Diclorhidrato de (2-etil-3-metoximetoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenan-17-il)-piridin-2-ilmetil-amina 39*



25 Se agitó una disolución de 2-Et-3-O-MOM estrona (342 mg, 1 mmoles) y 2-(aminomethyl)piridina (515  $\mu$  l, 5 mmoles) en THF (10 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (300 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (848 mg, 4 mmoles). Tras agitar 3 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separó entonces la fase orgánica, se lavó con agua y salmuera, se secó y se evaporó. Se tomó el aceite amarillo resultante en THF y entonces se trató con HCl etéreo (1 ml de 2 M), se eliminó entonces el disolvente a vacío y se trituró entonces la goma resultante con éter dando el producto 39 como la sal de bis-HCl, un polvo de color hueso que muestra  $\delta_H$  ( $CD_3OD$ , TMS=0) 8,86 (1 H, d ap.,  $J$  5,1), 8,38 (1 H, t ap.,  $J$  7,8), 8,06 (1H, d ap.,  $J$  7,8), 7,87 (1H, dd,  $J$  7,8 y 5,1), 7,02 (1H, s, ArCH), 6,73 (1H, s ArH), 5,14 (2H, s,  $OCH_2$ ), 4,59 (2H, a,  $CH_2N$ ), 3,43 (3H, s, OMe), 2,78-2,86 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2,59 (2H, q,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ), 1,30-2,41 (12H, m), 1,17 (3H, t,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ) y 1,01 (3H, s, 18- $CH_3$ ).

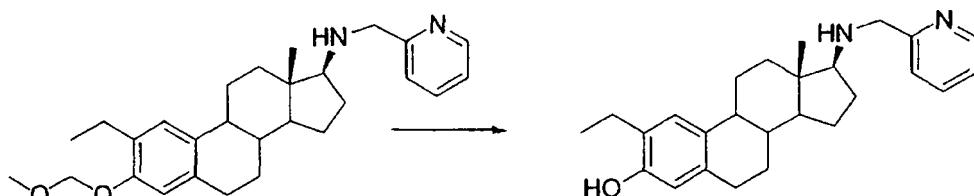
30

35

*2-Etil-13-metil-17-[(piridin-2-ilmetil)-amino]-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenan-17-ol 40*

40

45



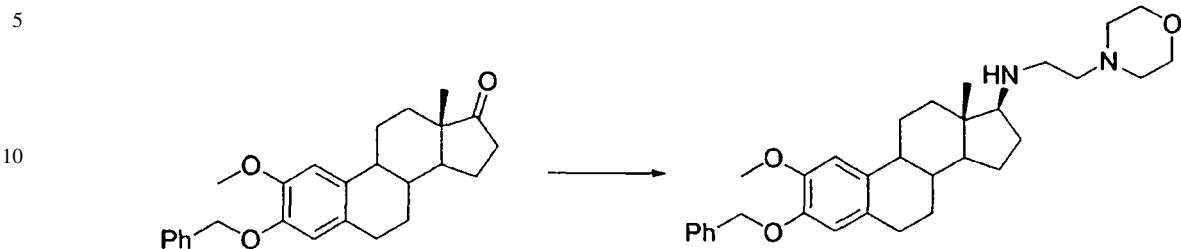
50

55 Se preparó HCl metanólico mediante la reacción de cloruro de acetilo (957  $\mu$ l) con metanol (2,5 ml) a 0°C y entonces se añadió a estrona MPL03139 protegida con MOM, tras la sonicación durante 2 minutos se evaporó la reacción hasta sequedad. Se precipitó la sal de HCl en metanol éter pero demostró ser demasiado higroscópica como para recogerse, en su lugar se disolvió el compuesto en etanol, se basificó con  $NaHCO_3$  (saturado) y entonces se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua, luego salmuera, se secaron y se evaporaron dando el producto 40 como un aceite incoloro que mostró  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ , TMS = 0) 8,54-8,57 (1 H, m), 7,65 (1 H, ddd,  $J$  7,8, 7,8 y 1,9), 7,39 (1 H, d ap.,  $J$  7,8), 7,16 (1 H, m), 7,03 (1H, s, ArH), 6,45 (1H, s, ArH), 3,97 (2H, s,  $NCH_2$ ), 2,73-2,78 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2,67 (1H, dd, 9,0 y 8,6,  $CHN$ ), 2,60 (2H, q,  $J$  7,4  $CH_2Me$ ), 1,25-2,32 (13H, m), 1,22 (3H, t,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ) y 0,77 (3H, s, 18- $CH_3$ ).

60

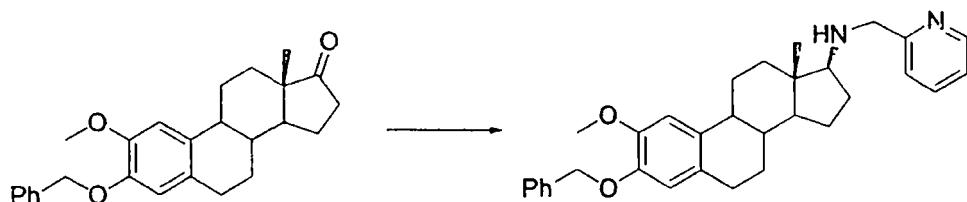
65

(3-Benciloxi-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-(2-morfolin-4-il-etil)-amina 41



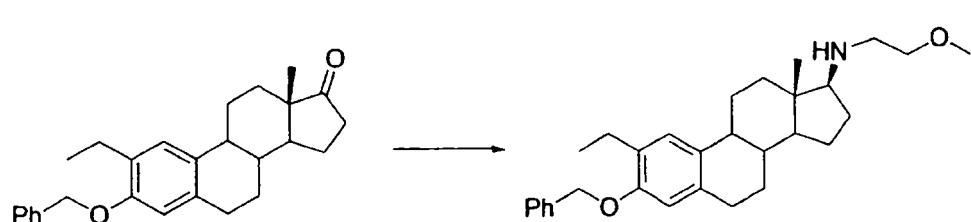
Se agitó una disolución de 2-MeO-3-O-bencilestrona (390 mg, 1 mmoles) y 4-(2-ethylamino)morfolina (651 mg, 5 mmoles) en THF (15 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (300 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (954 mg, 4,5 mmoles). Tras agitar 5 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separaron entonces los compuestos orgánicos, se lavaron con agua y salmuera, se secaron y se evaporaron. El producto deseado 41, un aceite amarillo, mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>, TMS=0) 7,25-7,46 (5H, m), 6,84 (1H, s, ArH), 6,62 (1H, s, ArH), 5,10 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>O), 3,86 (3H, s, OMe), 3,68-3,74 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>O), 1,20-2,80 (25H, m) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

(3-Benciloxi-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-piridin-2-ilmetil-amina 42



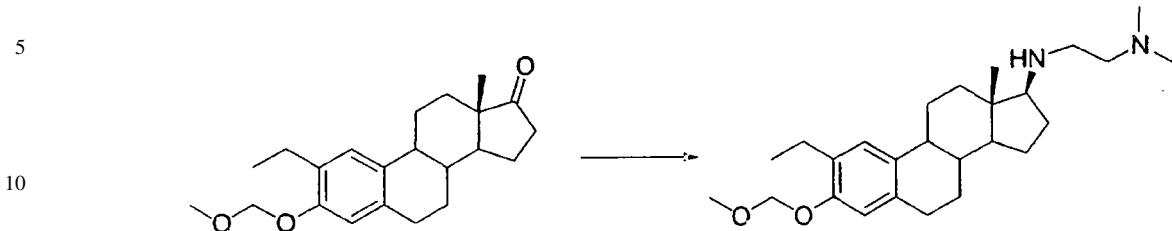
Se agitó una disolución de 2-MeO-3-O-bencilestrona (390 mg, 1 mmoles) y 2-(aminometil)piridina (515  $\mu$ l, 5 mmoles) en THF (20 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (300 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (954 mg, 4,5 mmoles). Tras agitar 6 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separaron entonces los compuestos orgánicos, se lavaron con agua y salmuera, se secaron y se evaporaron. La amina deseada 42, un aceite amarillo, mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>, TMS=0) 8,52 (1H, m), 7,62 (1H, ddd, J 7,8, 7,8 y 1,9) 7,24-7,46 (7H, m), 7,12-7,17 (1H, m), 6,84 (1H, s, ArH), 6,61 (1H, s, ArH), 5,10 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>O), 3,96 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ar) 3,86 (3H, s, OMe), 2,63-2,82 (3H, m, 6-CH<sub>2</sub> y CHN) 1,20-2,32 (13H, m) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

(3-Benciloxi-2-etil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-(2-metoxi-etil)-amina 43



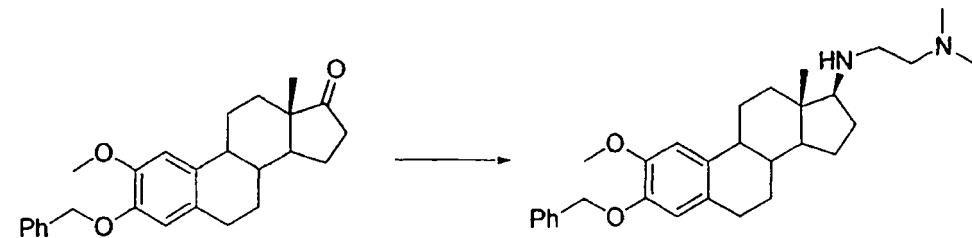
Se agitó una disolución de 2-Et-3-O-bencilestrona (220 mg, 0,57 mmoles) y 2-metoxietilamina (197  $\mu$ l, 2,26 mmoles) en THF (10 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (150 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (540 mg, 2,55 mmoles). Tras agitar 3 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separaron entonces los compuestos orgánicos, se lavaron con agua y salmuera, se secaron y se evaporaron. La amina deseada 43, un aceite amarillo, mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>, TMS=0) 7,27-7,44 (5H, m), 7,08 (1H, s, ArH), 6,61 (1H, s, ArH), 5,02 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>O), 3,47-3,51 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 2,74-2,92 (4H, m, 6-CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>N), 2,58-2,70 (3H, m, CHN y ArCH<sub>2</sub>Me), 1,24-2,34 (14H, m), 1,21 (3H, t, J 7,6, CH<sub>2</sub>Me) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

*N'*-(2-Etil-3-metoximetoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il)-*N,N*-dimetil-etano-1,2-diamina 44



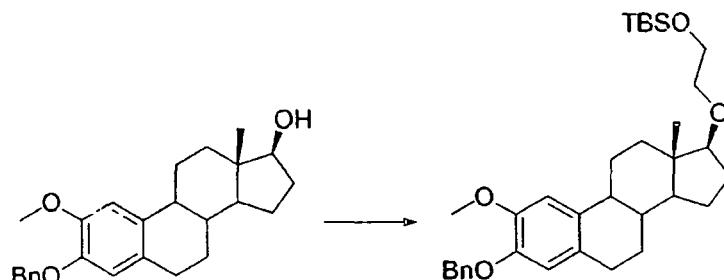
Se agitó una disolución de 2-Et-3-O-MOM estrona (342 mg, 1 mmoles) y *N,N*-dimetiletilendiamina (549  $\mu$ l, 5 mmoles) en THF (10 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (300 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (848 mg, 4 mmoles). Tras agitar 3 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separaron entonces los compuestos orgánicos, se lavaron con agua y salmuera, se secaron y se evaporaron. Se purificó el aceite amarillo resultante mediante cromatografía en columna (10% de MeOH en  $\text{CHCl}_3$ ) dando el producto deseado 44 que mostró  $\delta_H$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS=0) 7,08 (1H, s, ArCH), 6,78 (1H, s ArH), 5,17 (2H, s,  $\text{OCH}_2$ ), 3,48 (3H, s, OMe), 2,24-2,86 (9H, m, 6- $\text{CH}_2$ , ArCH<sub>2</sub> y 2 x NCH<sub>2</sub> y NCH), 2,23 (6H, s, NMe<sub>2</sub>), 1,20 (3H, t, *J* 7,6,  $\text{CH}_2\text{Me}$ ) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

*N'*-(3-Benciloxi-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il)-*N,N*-dimetil-etano-1,2-diamina 45



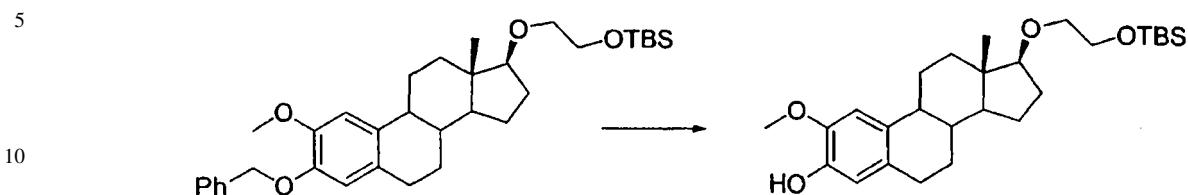
Se agitó una disolución de 2-MeO-3-O-bencilestrona (390 mg, 1 mmoles) y *N,N*-dimetiletilendiamina (439  $\mu$ l, 4 mmoles) en THF (10 ml) durante 1 h y entonces se trató con ácido acético (300 mg) y triacetoxiborohidruro de sodio (954 mg, 4,5 mmoles). Tras agitar 3 d, se añadió hidróxido de sodio (5 ml de 2 M ac.) seguido por acetato de etilo (30 ml). Se separó entonces la fase orgánica, se lavó con agua y salmuera, se secó y se evaporó. El producto 45, un aceite amarillo, mostró  $\delta_H$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS=0) 7,28-7,46 (5H, m), 6,84 (1H, s, ArH), 6,61 (1H, s, ArH), 5,10 (2H, s,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ), 3,86 (3H, s, OMe), 2,37-2,83 (7H, m, 6- $\text{CH}_2$ , 2 x NCH<sub>2</sub> y NCH), 2,22 (6H, s, NMe<sub>2</sub>), 1,24-2,14 (14H, m) y 0,75 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

[2-(3-Benciloxi-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-iloxi)-etoxi]-terc-butil-dimetil-silano 46



Se trató una disolución de 3-O-Bn-2-MeO-estradiol (340 mg, 0,86 mmoles) en tolueno (8 ml) con hidruro de sodio (2 eq.) y entonces se calentó en un tubo sellado hasta 130°C durante 0,25 h, se enfrió hasta ta, entonces se trató con bromuro de 2-(terc-butildimetilsiloxi)etilo (429  $\mu$ l, 2 mmoles) antes de calentar en el tubo sellado a 130°C durante 16 h. Tras el tratamiento final acuoso convencional, se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna dando el éter deseado 46 como un sólido blanco (208 mg) que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ref. TMS = 0) 7,26-7,46 (5H, m, ArH), 6,85 (1H, s, ArH), 6,62 (1H, s, ArH), 5,11 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 3,87 (3H, s, OMe), 3,71-3,77 (2H, m,  $\text{OCH}_2$ ), 3,39-3,69 (3H, m,  $\text{OCH}_2$  y HCO), 2,72-2,82 (2H, m, 6- $\text{CH}_2$ ), 1,10-2,40 (13H, m), 0,91 (9H, s, *tBu*), 0,80 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) y 0,10 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>).

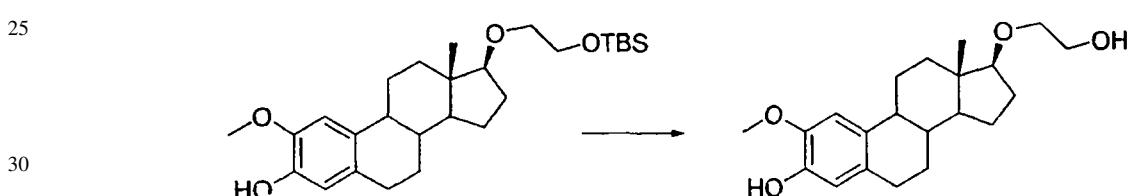
17-[2-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-etoxi]-2-metoxi-13-metil7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol 47



15 Se trató una disolución agitada, desgasificada del éter 46 (200 mg, 0,36 mmoles) en THF (10 ml) con Pd al 10%/C (20 mg) y se colocó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. Se filtró entonces la reacción a través de celite y se evaporó dando el fenol deseado 47 como un aceite incoloro transparente  $\delta_H$  6,80 (1H, s, ArH), 6,65 (1H, s, ArH), 5,55 (1H, s, OH), 3,87 (3H, s, OMe), 3,52-3,82 (4H, m, 2 x OCH<sub>2</sub>), 3,42-3,48 (1H, m, 17-CH), 2,72-2,84 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,20-2,36 (13H, m), 0,94 (9H, s, 'Bu), 0,89 (3H, s, 18-Me) y 0,12 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>).

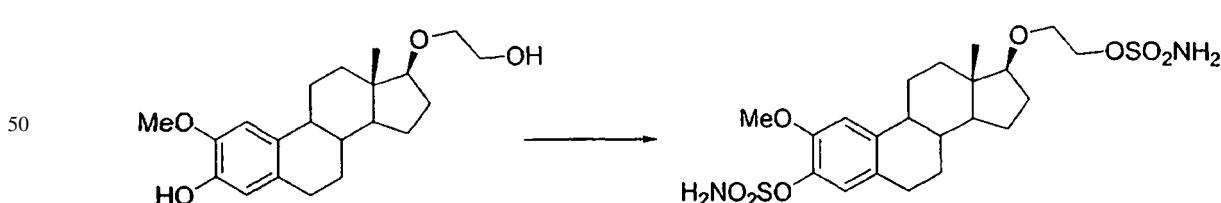
20

48 17-[2-(Hidroxi)-etoxi]-2-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol



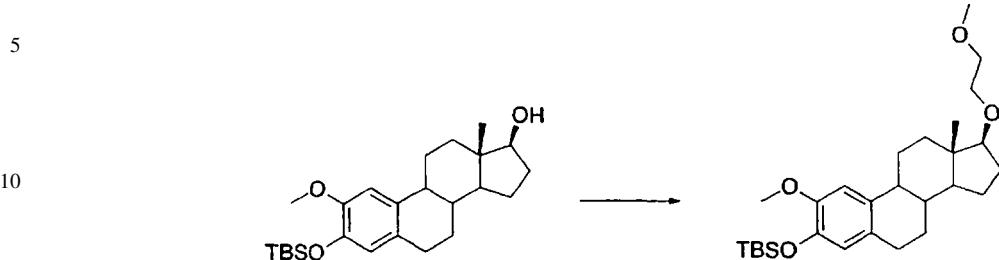
35 Se trató una disolución de alcohol 47 protegido con TBS (110 mg, 0,24 mmoles) en THF (5 ml) con TBAF (250 ml, 0,25 mmoles). Tras agitar durante la noche, se extrajo la reacción con acetato de etilo (25 ml), se lavó la fase orgánica con agua y salmuera, se secó y se evaporó. Se purificó el aceite amarillo pálido resultante mediante cromatografía en columna (2% de metanol en cloroformo) dando el diol deseado 48 como un aceite incoloro transparente (65 mg) que mostró  $\delta_H$  6,78 (1H, s, ArH), 6,64 (1H, s, ArH), 5,51 (1H, s, OH), 3,86 (3H, s, OMe), 3,40-3,68 (5H, m, 2 x OCH<sub>2</sub> y CHOR), 2,72-2,82 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,20-2,30 (14H, m) y 0,81 (3H, s, 18-Me);  $\delta_c$  144,6, 143,5, 131,7, 129,5, 114,6, 109,1, 89,4, 70,9, 62,1, 56,1, 50,2, 44,2, 38,6, 38,0, 28,9, 28,1, 27,2, 26,6, 23,0 y 11,7.

45 Éster 2-metoxi-13-metil-17-(2-sulfamoiloxi-etoxi)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido sulfámico 49



55 Se evaporó hasta sequedad una disolución en tolueno de cloruro de sulfamoilo (1 ml, 0,69 mmoles), se enfrió hasta 0°C y entonces se trató con dimetilacetamida (1,5 ml), luego con el diol 48 (45 mg). Tras agitar 3 h a ta, se diluyó la reacción en acetato de etilo (20 ml), entonces se trató con agua (10 ml), se separó la fase orgánica y se extrajo con salmuera (5x10 ml), se secó y se evaporó dando un aceite amarillo. Se utilizó cromatografía en columna (gradiente del 5-10% de metanol en cloroformo) para purificar el bis-sulfamato deseado 49 como un aceite incoloro transparente (21 mg) que mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>, TMS = 0) 7,03 (1H, s, ArH), 6,90 (1H, s, ArH), 5,02 (4H, a, 2 x NH<sub>2</sub>), 4,37-4,42 (2H, m, CH<sub>2</sub>OS), 3,87 (3H, s, OMe), 3,75-3,82 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3,48 (1H, dd, J 8,6 y 7,9, OCH), 2,74-2,85 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,25-2,50 (H, m) y 0,79 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); m/z 504,6.

*terc-Butil-[2-metoxi-17-(2-metoxi-etoxy)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]-dimetil-silano 50*

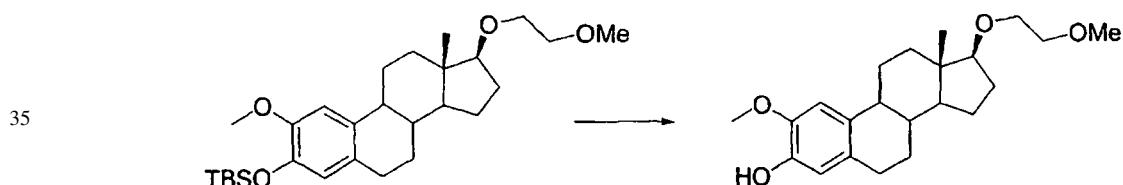


15 Se trató una disolución en tolueno (20 ml) de 2-MeO-3-O-TBS estradiol (340 mg, 0,81 mmoles) con hidruro de sodio (98 mg, 2,45 mmoles) y entonces se llevó a reflujo durante 1 h antes de la adición de bromuro de 2-(metoxi)etilo (153  $\mu$ l, 1,62 mmoles). Se sometió a reflujo la reacción durante 14 h, entonces se trató con alícuotas adicionales de hidruro de sodio (80 mg, 2 mmoles) y bromuro de 2-(metoxi)etilo (141  $\mu$ l, 1,5 mmoles) antes de someterse a reflujo durante otras 8 horas, tiempo tras el cual se añadieron otra alícuota de base y bromuro de alquilo. Tras un reflujo de otras 14 h, se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó en acetato de etilo (30 ml) y entonces se trató con cloruro de amonio saturado (20 ml). Se separó la fase orgánica, se lavó con agua (2 x 20 ml), salmuera, se secó y se evaporó. Se aisló entonces el éter deseado 50 mediante cromatografía en columna (eluyente hexano/acetato de etilo 11:1), como agujas blancas, p.f. 98-100°C (276 mg, %) que mostraron  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 6,76 (1 H, s, ArH), 6,54 (1 H, s, ArH), 3,77 (3 H, s, OMe), 3,41-3,73 (7 H, m), 3,40 (3 H, s, OMe), 2,68-2,80 (2 H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,16-2,27 (11 H, m), 0,99 (9 H, s, tBu), 0,82 (3 H, s, 18-CH<sub>3</sub>) y 0,15 (6 H, s, SiMe<sub>2</sub>)  $\delta_c$  148,6, 142,9, 133,2, 129,0, 121,0, 110,0, 89,6, 72,3, 69,5, 59,2, 50,4, 43,4, 38,5, 38,2, 29,7, 28,8, 28,2, 27,4, 26,6, 25,8, 23,0, 18,5, 11,7 y -4,6. m/z FAB<sup>+</sup> 473,2.

20

25

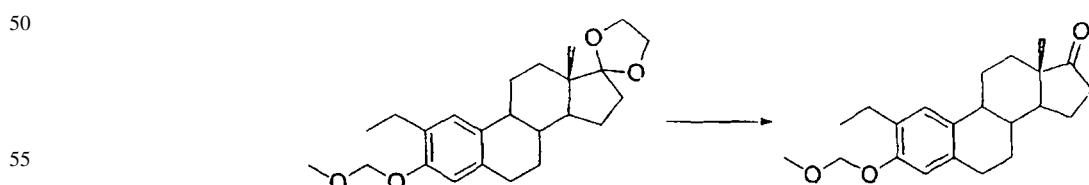
30 *2-Metoxi-17-(2-metoxi-etoxy)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta [a]fenantren-3-ol 51*



40 Se trató una disolución de éter 50 protegido con TBS (232 mg) en THF (10 ml) con TBAF (0,5 ml, disolución 1 M en THF). Tras agitar durante la noche, se llevó a cabo un tratamiento final acuoso convencional y se purificó el fenol deseado 51 mediante cromatografía en columna (4:1 Hex/EA) dando un sólido blanco que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 6,77 (1 H, s, ArH), 6,63 (1 H, s, ArH), 5,50 (1 H, s, OH), 3,85 (3 H, s, ArOMe), 3,41-3,72 (5 H, m, 2 x OCH<sub>2</sub> y CHOR), 3,40 (3 H, s, OMe), 2,69-2,83 (6-CH<sub>2</sub>), 1,16-2,26 (13 H, m) y 0,81 (3 H, s, 18-Me);  $\delta_c$  144,5, 143,4, 131,7, 129,5 (todos los C), 114,6, 108,1, 89,6 (todos los CH), 72,3, 69,5 (ambos CH<sub>2</sub>), 59,1 (CH), 56,0 (CH<sub>3</sub>), 50,3, 44,2 (ambos CH), 43,3 (C), 38,6 (CH), 38,1, 28,9, 28,1, 27,2, 26,7, 23,0 (todos los CH<sub>2</sub>) y 11,6 (CH<sub>3</sub>).

45

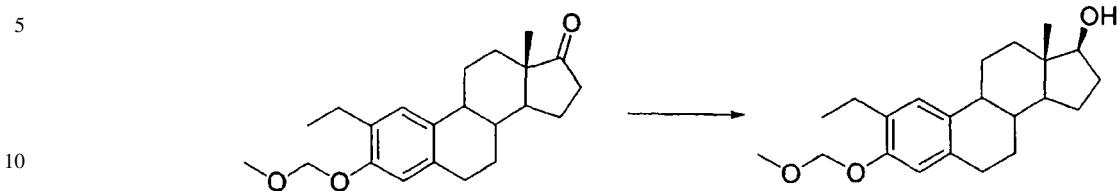
2-Etil-3-metoximetoxi-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-una 52



60 Se trató una disolución de 2-Et-3-O-MOM-17-(etilendioxicetal)estrona (15 g) en acetona (200 ml) y agua (10 ml) con sulfonato de para-piridiniotolueno (333 mg) y entonces se llevó a reflujo durante 14 h. Se eliminó entonces el disolvente mediante evaporación rotatoria dando un sólido blanco que entonces se recristalizó en etanol y agua dando el producto deseado 52 como un sólido blanco (5,6 g) que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 7,09 (1 H, s, ArH), 6,81 (1 H, s, ArH), 5,18 (2 H, s, OCH<sub>2</sub>), 3,49 (3 H, s, OMe), 2,84-2,92 (2 H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,61 (2 H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 1,38-2,56 (13 H, m), 1,19 (3 H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,91 (3 H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  220,1, 152,8, 134,8, 132,6, 130,6, 126,2, 114,0, 94,3, 56,0, 50,4, 48,1, 44,1, 38,4, 36,0, 31,7, 29,6, 26,7, 26,0, 23,6, 21,7, 14,9 y 14,0.

65

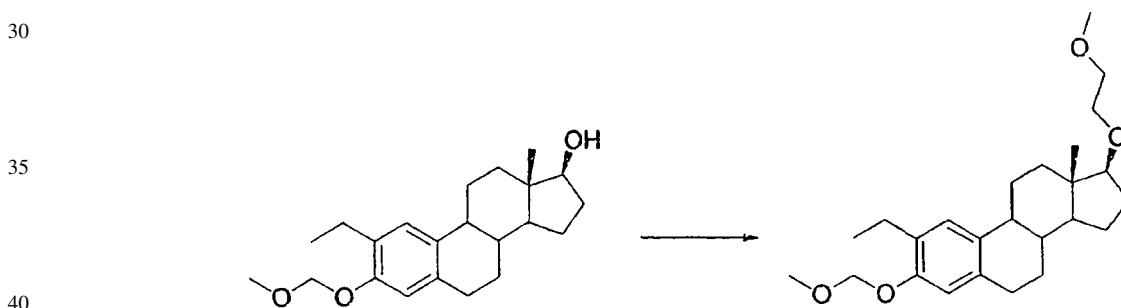
## 2-Etil-3-metoximetoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-ol 53



15 A una disolución agitada, a t.a., de 2-Et-3-O-MOM estrona 52 (743 mg, 2,18 mmoles) en THF (10 ml)/metanol (40 ml) solución se le añadió borohidruro de sodio (76 mg, 2 mmoles). Tras una hora, se extinguío la reacción mediante la adición de cloruro de amonio (2 ml de una disolución saturada), se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y agua (25 ml), se separó la fase orgánica y se lavó con agua, salmuera, se secó y se evaporó. La cromatografía en columna (gradiente de hexano/acetato de etilo) dio el alcohol deseado 53 como un aceite incoloro transparente (650 mg) que mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 7,09 (1H, s, ArH), 6,78 (1H, s, ArH), 5,17 (2H, s,  $OCH_2$ ), 3,69-3,78 (1H, m,  $CHOH$ ), 3,48 (3H, s, OMe), 2,78-2,86 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2,61 (2H, q,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ), 1,24-2,38 (13H, m), 1,19 (3H, t,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ) y 0,77 (3H, s, 18- $CH_3$ ).

20

25 2-Etil-17-(2-metoxi-etoxy)-3-metoximetoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantreno 54



45 Se trató una disolución en tolueno (10 ml) de 2-Et-3-O-MOM estradiol 53 (170 mg, 0,5 mmoles) con hidruro de sodio (80 mg, 2 mmoles) y entonces se llevó a reflujo durante 0,5 h antes de la adición de bromuro de 2-(metoxi)etilo (141  $\mu$ l, 1,5 mmoles). Se sometió a reflujo la reacción durante 14 h, entonces se trató con alícuotas adicionales de hidruro de sodio (80 mg, 2 mmoles) y bromuro de 2-(metoxi)etilo (141  $\mu$ l, 1,5 mmoles) antes de someterse a reflujo durante otras 8 horas, tiempo tras el cual no quedaba material de partida residual. Se enfrió entonces la reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó en acetato de etilo (30 ml) y entonces se trató con cloruro de amonio saturado (20 ml). Se separó la fase orgánica, se lavó con agua (2 x 20 ml), salmuera, se secó y se evaporó. Se aisló el éter deseado 54, un aceite incoloro transparente (128 mg, %), mediante cromatografía en columna (gradiente del 0 al 20% de acetato de etilo en hexano) y mostró  $\delta_H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ , ref. TMS = 0) 7,08 (1H, s, ArH), 6,78 (1H, s, Ar, H), 5,17 (2H, s,  $OCH_2$ ), 3,67-3,74 (1H, m), 3,52-3,56 (2H, m), 3,48 (3H, s, OMe), 3,43 (1H, dd,  $J$  8,6 y 8,2,  $CHO$ ), 3,40 (3H, s, OMe), 2,78-2,86 (2H, m, 6- $CH_2$ ), 2,63 (2H, q,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ), 2,37-2,44 (1H, m), 2,14-2,22 (1H, m), 2,01-2,11 (2H, m), 1,83-1,90 (1H, m), 1,23-1,72 (8H, m), 1,19 (3H, t,  $J$  7,4,  $CH_2Me$ ) y 0,81 (3H, s, 18- $CH_3$ )  $\delta_C$  152,6, 135,0, 133,2, 130,3, 126,1, 114,0, 94,3, 89,6, 72,3, 69,6, 59,2, 56,0, 50,4, 44,1, 43,5, 38,7, 38,3, 29,7, 28,3, 27,4, 26,6, 23,6, 23,2, 15,0 y 11,7.

50

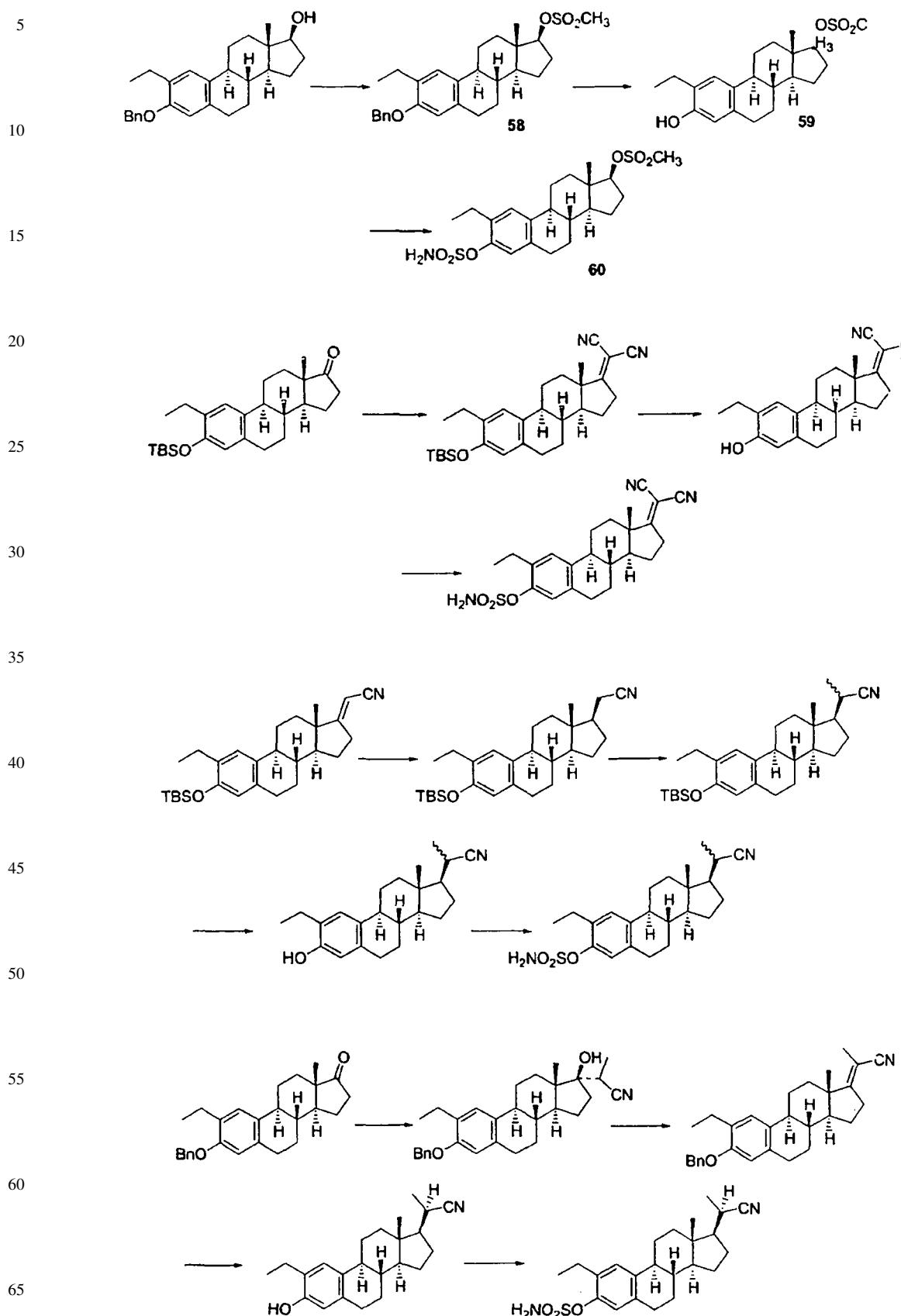
55

60

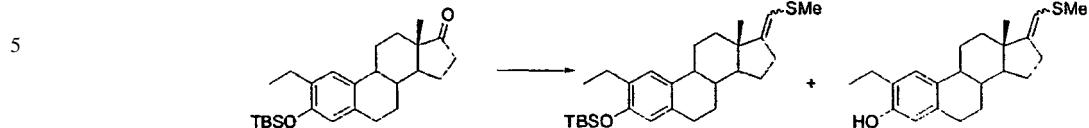
65

# ES 2 339 450 T3

Se siguieron los siguientes esquemas.



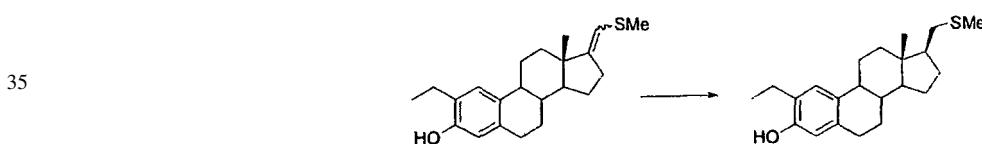
(E- y Z)-2-Etil-3-O-terc-butil-dimetil-silil-17-metilsulfanilmetilenestrona A y (E- y Z)-2-ethyl-17-metilsulfanilmetilenestrona B



10 Se lavó hidruro de sodio (120 mg, 3 mmoles) con tres alícuotas de hexano (1 ml cada una), se secó bajo nitrógeno y entonces se trató con THF (5 ml). Se introdujo entonces (metiltiometil)fosfonato de dimetilo (526  $\mu$ l, 3 mmoles) en la suspensión provocando un vigoroso desprendimiento de gas antes de la formación de una disolución incolora transparente. Se trató entonces la mezcla de reacción con una disolución de 2-Bt-3-GOTBS estrona (412 mg, 1 mmoles) en THF (5 ml) y a continuación se sometió a refluo durante 48 h. Se diluyó entonces la reacción enfriada con acetato de etilo (30 ml), se vertió sobre agua (20 ml) y se separó la fase acuosa. Se lavó la fase orgánica con agua (3 x 35 ml), salmuera (50 ml), a continuación se secó y evaporó. Se purificó el aceite resultante mediante cromatografía en columna (5% de acetato de etilo/hexano) dando como primera fracción, el producto de alqueno A protegido con TBS deseado como una mezcla de isómeros, un aceite incoloro (196 mg, 43%) y como segunda fracción un aceite incoloro que demostró ser los alquenos desililados B (150 mg, 44%). F1  $\delta$ <sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 7,05 (1H, s, ArH), 6,54, 6,47 (1H, s, ArH, ambos isómeros), 5,48-5,55 (1H, m, :CHSMe, ambos isómeros), 2,75 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,56 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,26, 2,21 (3H, s, SMe de ambos isómeros), 1,19 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 1,00 (9H, s, tBu), 0,92, 0,81 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), y 0,21 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>). m/z [FAB+] hallado 456,28822, C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>SOSi requiere 456,28821.

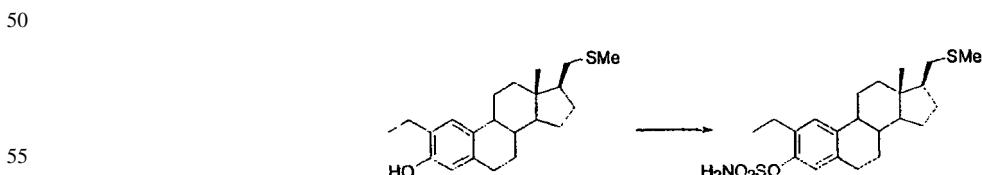
25 F2  $\delta$ <sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 7,04 (1H, s, ArH), 6,48 (1H, s, ArH), 5,51 (t, 1,9, :CHSMe), 5,49 (t, 2,3, :CHSMe), 4,43-4,46 (1H, m, OH), 2,72-2,88 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,59 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,27 y 2,22 (3H, 2 x s, SMe de ambos isómeros), 1,22 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 0,93 y 0,81 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub> de ambos isómeros); m/z [FAB+] hallado 342,20174, C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>SO requiere 342,20173.

30 2-Etil-17-metilsulfanilmetilestrona C



40 Se disolvió (E- y Z)-2-ethyl-17-metilsulfanilmetilenestrona B (150 mg) en THF (1 ml) y etanol (10 ml), entonces se trató con Pd/C (25 mg, 5%), se desgasificó y entonces se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 16 h. Se filtró entonces la reacción a través de una almohadilla de celite y se evaporó. Se aisló el producto reducido C mediante cromatografía en columna como un aceite incoloro (85 mg) que mostró  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 7,04 (1H, s, ArH), 6,48 (1H, s, ArH), 4,48 (1H, s, OH), 2,74-2,84 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,58 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,11 (3H, s, SMe), 1,21 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,65 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

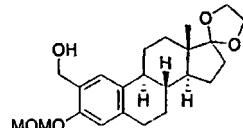
2-Etil-3-O-sulfamoil-17-metilsulfanilmetilestrona E



60 Se evaporó hasta sequedad cloruro de sulfamoilo (1,5 ml de una disolución 0,56 M) y entonces se disolvió en DMA (1,5 ml) a 0°C antes de añadirse a 2-ethyl-13-metil-17-metilsulfanilmetilestrona C (80 mg). Se dejó que la reacción agitada llegase hasta temperatura ambiente a lo largo de 14 h. Se añadió entonces acetato de etilo (10 ml) y se lavó la disolución con agua (3 x 10 ml) y salmuera (10 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y entonces se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (0-7,5% de acetato de etilo en cloroformo) dando el sulfamato deseado E como una espuma blanca (65 mg) que mostró  $\delta$ H (CDCl<sub>3</sub>) 7,18 (1H, s, ArH), 7,06 (1H, s, ArH), 4,90 (2H, a, NH<sub>2</sub>), 2,78-2,88 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,68 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,11 (3H, s, SMe), 1,21 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,66 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

## 2-Hidroximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona

5



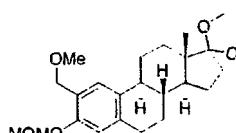
10

Se trató una disolución de 2-formil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona (2,00 g, 5,18 mmoles) en THF (10 ml) y metanol (20 ml) con borohidruro de sodio (189 mg, 5 mmoles). Tras 10 minutos, no quedaba material de partida y se destruyó el borohidruro en exceso mediante la adición de cloruro de amonio. Se extrajo la reacción en acetato de etilo (50 ml), se lavó con agua (2 x 25 ml), salmuera (25 ml), se secó y se evaporó dando 2-hidroximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona (1,98 g) como una espuma blanca  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,23 (1 H, s, ArH), 6,82 (1 H, s, ArH), 5,20 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 4,64-4,70 (2H, m, ArCH<sub>2</sub>O), 3,88-4,00 (4H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,49 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,82-2,88 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,30-2,40 (14H, m) y 0,88 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  152,9, 137,7, 133,9, 127,2, 126,2, 119,3, 114,5, 94,6, 65,2, 64,5, 61,9, 56,1, 49,3, 46,1, 43,6, 38,9, 34,2, 30,6, 29,7, 26,9, 26,0, 22,3 y 14,3; m/z [ES+] 411,2 (100%, M<sup>+</sup> + Na).

20

## 2-Metoximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona

25



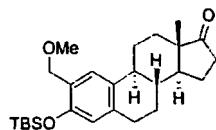
30

A una disolución agitada a ta de 2-hidroximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona (1,98 g, 5,10 mmoles) en THF (25 ml) se le añadió hidruro de sodio (306 mg) y entonces, tras 0,5 h, yoduro de metilo. Se agitó la reacción durante la noche antes del tratamiento final acuoso convencional. La cromatografía (hexano/acetato de etilo) dio el producto deseado como un aceite incoloro (1 g) junto con material de partida recuperado (600 mg). El producto 2-metoximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,26 (1 H, s, ArH), 6,80 (1H, s, ArH), 5,16 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 4,43-4,50 (2H, m, ArCH<sub>2</sub>O), 3,86-3,98 (4H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,46 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3,39 (3H, s, OMe), 2,80-2,86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,26-2,40 (13H, m) y 0,86 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  152,6, 137,4, 133,6, 126,4, 124,4, 119,3, 114,3, 94,4, 69,5, 65,2, 64,5, 58,1, 55,9, 49,3, 46,1, 43,6, 38,9, 34,2, 30,6, 29,6, 26,9, 26,1, 22,3 y 14,3; m/z [ES+] 425,3 (100%, M<sup>+</sup> + Na). HRMS [FAB+] 402,24063.

40

## 2-Metoximetil-3-O-TBS estrona

45



50

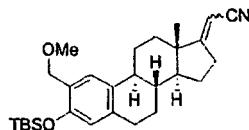
Se trató 2-netoximetil-3-O-metoximetil-17-etilendioxiestrona (1 g) en THF (10 ml) con HCl metanólico (10 ml, 4 M) durante 0,25 h, tras el tratamiento final acuoso convencional se disolvió el producto en DMF (10 ml) y se trató con imidazol (425 mg) y TBSCl (453 mg). Tras 14 h, se extrajo la reacción en acetato de etilo (25 ml) y entonces se lavó con agua (5 x 20 ml) y salmuera (20 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía en columna (0-15% de acetato de etilo en hexano) dio el producto deseado como un sólido blanco (360 mg) que mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,25 (1H, s, ArH), 6,51 (1 H, s, ArH), 4,43 (1 H, d, *J* 11,7, ArCH<sub>a</sub>), 4,40 (1 H, d, *J* 11,7, ArCH<sub>b</sub>), 3,39 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,82-2,88 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,42-2,54 (2H, m), 1,92-2,29 (5H, m), 1,36-1,68 (6H, m), 1,01 (9H, s, t-Bu), 0,91 (3H, s; 18-CH<sub>3</sub>) y 0,22 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>);  $\delta_c$  221,1, 151,3, 136,7, 132,3, 126,4, 126,1, 118,6, 69,8, 58,2, 50,4, 48,0, 44,0, 38,3, 35,9, 31,5, 29,4, 26,6, 25,9, 25,7, 21,6, 18,2, 13,8 y -4,3.

60

65

## 2-Metoximetil-3-O-TBS-17-cianometilenestrona

5



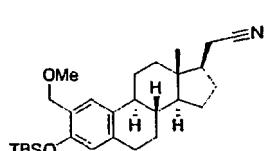
10

Se trató (cianometil)fosfonato de dietilo (506  $\mu$ l, 3 mmoles) en THF (10 ml) con hidruro de sodio (124 mg) y entonces, tras el cese del desprendimiento de gas, 2-metoximetil-3-O-TBS estrona (320 mg) en THF (5 ml). Se calentó la reacción hasta 70°C durante 1,5 h, a continuación se sometió al tratamiento final. Se purificó el producto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo 7:1) como una mezcla 1:1 de isómeros (240 mg). El aceite incoloro transparente mostró  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ ) 7,24 y 7,25 (1H, 2 x s, ArH), 6,51 y 6,50 (1H, 2 x s, ArH), 5,13 (dd,  $J$  2,3 y 2,0 :CHCN) y 5,05 (dd,  $J$  2,5 y 2,3) (1H, 2 x dd, :CHCN ambos isómeros), 4,43 (1H, d,  $J$  12,8, OCH<sub>a</sub>), 4,40 (1H, d,  $J$  12,8, OCH<sub>b</sub>), 3,39 y 3,39 (3H, 2 x s, OCH<sub>3</sub>), 0,99 y 0,88 (3H, 2 x s, 18-CH<sub>3</sub>, ambos isómeros).

20

2-Metoximetil-3-O-TBS-17- $\beta$ -cianometilestrona

25



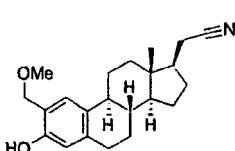
30

Se hidrogenó 2-metoximetil-3-O-TBS-17-cianometilenestrona (220 mg) en THF (1 ml) y etanol (5 ml) en presencia de Pd/C (200 mg, 5%) a lo largo de 14 h. Se filtró entonces la reacción a través de celite y se evaporó dando el producto deseado, 2-metoximetil-3-O-TBS-17- $\beta$ -cianometilestrona, como un aceite incoloro transparente (200 mg) que mostró  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ ) 7,23 (1H, s, ArH), 6,50 (1H, s, ArH), 4,42 (1H, d,  $J$  11,8, ArCHa), 4,41 (1H, d,  $J$  = 11,8, ArCHb), 3,39 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,72-2,86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,15-2,46 (16H, m), 1,01 (9H, s, t-Bu), 0,67 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>) y 0,21 (6H, s, SiMe<sub>2</sub>);  $\delta_c$  151,20, 136,9, 132,7, 126,4, 125,9, 119,8, 118,6, 69,8, 58,2, 54,4, 46,8, 44,0, 42,7, 38,8, 37,3, 28,6, 28,4, 27,8, 26,3, 25,7, 24,0, 18,2, 17,6, 12,3 y -4,1.

40

2-Metoximetil-17- $\beta$ -cianometilestrona

45



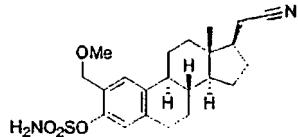
50

Se trató 2-metoximetil-3-O-TBS-17- $\beta$ -cianometilestrona (200 mg) en THF (5 ml) con TBAF (1 ml, 1 M en THF). Tras 0,5 h, se sometió la reacción al tratamiento final. La cromatografía (hexano/éter) dio el producto deseado, 2-metoximetil-17- $\beta$ -cianometilestrona, como un sólido cristalino (120 mg) que mostró  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ ) 7,22 (1H, s, ArH), 6,91 (1H, s, ArH), 6,62 (1H, s, OH), 4,64 (1H, d,  $J$  12,5, ArCHa), 4,59 (1H, d,  $J$  12,5, ArCHb), 3,43 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,78-2,86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,24-2,42 (15H, m) y 0,67 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  153,8, 138,0, 131,5, 125,0, 119,8, 119,4, 116,3, 74,1, 58,1, 54,3, 46,7, 43,6, 42,5, 38,7, 37,3, 29,3, 28,2, 27,6, 26,2, 25,6, 23,9, 17,6 y 12,2. m/z [APCI-] 338,3 (100%, M<sup>+</sup> - H).

65

2-Metoximetil-3-*O*-sulfamoil-17- $\beta$ -cianometilestrona

5

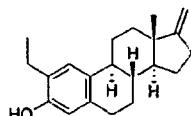


10

Se enfrió cloruro de sulfamoilo (1,7 mmoles) hasta 0°C, se disolvió en dimetilacetamida (1,5 ml) y entonces tras 5 minutos se trató con 2-metoximetil-17- $\beta$ -cianometilestrona (60 mg). Se retiró la refrigeración externa tras 15 minutos y se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante 3 h. Se diluyó entonces la reacción en acetato de etilo (15 ml), se vertió sobre salmuera (15 ml) y se separó la fase orgánica. Se lavó el extracto orgánico con agua (3 x 15 ml) y salmuera (15 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía (0-5% de MeOH en DCM) dio el producto, 2-metoximetil-3-*O*-sulfamoil-17- $\beta$ -cianometilestrona, como aceite incoloro (65 mg). La cristalización en cloroformo/hexano dio un sólido cristalino blanco que mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,29 (1H, s, ArH), 7,17 (1H, s, ArH), 5,55 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 4,48 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 3,44 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,86-2,92 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,26-2,42 (15H, m) y 0,69 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  147,3, 139,4, 139,3, 128,5, 126,8, 122,7, 119,6, 70,6, 58,3, 54,3, 46,6, 43,9, 42,6, 38,2, 37,3, 29,2, 28,2, 27,2, 26,1, 23,9, 17,6 y 12,2. m/z [APCI-] 417,3 (100%, M<sup>+</sup> - H).

## 2-Etil-17-metilenestrona

25



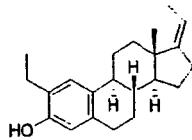
30

Se trató yoduro de metiltrifenilfosfonio (10 mmoles) en DMSO (15 ml) con hidruro de sodio (400 mg). Tras 0,5 h, se añadió 2-etilestrona (600 mg) en DMSO (15 ml) al aceite amarillo resultante y se llevó la reacción hasta 60°C durante 16 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, se vertió sobre agua helada (50 ml), se extrajo con éter (3 x 50 ml), se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua (3 x 50 ml), se secaron y se evaporaron. La cromatografía (10% de éter en hexano) dio el producto deseado, 2-etil-17-metilenestrona, como una espuma blanca (390 mg) que mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,05 (1H, s, ArH), 6,47 (1H, s, ArH), 4,65-4,68 (2H, m, :CH<sub>2</sub>), 4,53 (1H, s, OH), 2,72-2,87 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,59 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 1,25-2,56 (13H, m), 1,22 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,81 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  161,6, 150,9, 135,4, 132,6, 127,0, 126,2, 115,1, 100,7, 53,5, 44,4, 44,1, 38,9, 35,8, 29,5, 29,4, 27,7, 26,8, 24,0, 23,1, 18,7 y 14,6; HRMS [FAB+] 296,21402.

45

## 2-Etil-17-etilidenestrona

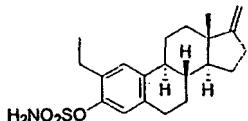
50



55

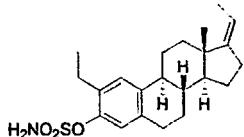
Se trató yoduro de etiltrifenilfosfonio (10 mmoles) en DMSO (15 ml) con hidruro de sodio (400 mg). Tras 0,5 h, se añadió 2-etilestrona (600 mg) en DMSO (15 ml) al aceite amarillo resultante y se llevó la reacción hasta 60°C durante 16 h. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, se vertió sobre agua helada (50 ml), se extrajo con éter (3 x 50 ml), se lavaron los extractos orgánicos combinados con agua (3 x 50 ml), se secaron y se evaporaron. La cromatografía (10% de éter en hexano) dio el producto deseado, cis-2-etil-17-etilidenestrona, como una espuma blanca (460 mg) que mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,03 (1H, s, ArH), 6,47 (1H, s, ArH), 5,14 (1H, qdd, J 7,0,2,0, 2,0, :CHMe), 4,45 (1H, s, OH), 2,72-2,88 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,59 (2H, q, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,14-2,46 (5H, m), 1,87-1,95 (1H, m), 1,70-1,78 (1H, m), 1,69 (3H, ddd, J 7,0, 2,0, 2,0, MeHC:), 1,25-1,62 (6H, m), 1,22 (3H, t, J 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,91 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  150,8, 150,1, 135,4, 132,7, 126,9, 126,1, 115,1, 113,3, 55,2, 44,6, 43,9, 38,5, 37,3, 31,5, 29,4, 27,7, 27,1, 24,3, 23,1, 17,1, 14,7 y 13,3; HRMS [FAB+] 310,22967.

### 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-metilenestriona



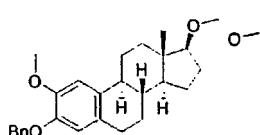
10 A una disolución de 2-etyl-17-metilenestrona (231 mg) en diclorometano (5 ml) se le añadió 2,6-di-*t*-butil-4-metilpiridina (320 mg) y cloruro de sulfamoilo (1,56 mmoles). Tras agitar 14 h a ta, se diluyó la reacción en acetato de etilo (20 ml), entonces se lavó con agua (3 x 20 ml) y salmuera (20 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía en columna dio el producto deseado, 2-etyl-3-*O*-sulfamoilo-17-metilenestrona, como un aceite incoloro transparente (200 mg) que se solidificó en reposo y mostró  $\delta$ <sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 7,19 (1 H, s, ArH), 7,09 (1 H, s, ArH), 5,06-5,14 (2H, a, NH<sub>2</sub>), 4,56-4,60 (2H, m, :CH<sub>2</sub>), 2,82-2,87 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,69 (2H, q, *J* 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 1,32-2,60 (13H, m), 1,22 (3H, t, *J* 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,82 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta$ <sub>C</sub> 161,3, 145,9, 139,5, 135,8, 126,8 (todos los C), 126,8, 121,3 (ambos CH), 100,9 (:CH<sub>2</sub>), 53,5 (CH), 44,3 (C), 44,3, 38,4 (ambos CH), 35,7, 29,5, 29,3, 27,5, 26,5, 24,0, 23,1 (todos los CH<sub>2</sub>), 18,6 y 14,7 (ambos CH<sub>3</sub>); HRMS [FAB+] 375,18681.

### 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-etilidenestrona



30 A una disolución de 2-etil-17-etilidenestrona (329 mg) en diclorometano (5 ml) se le añadió 2,6-di-t-butil-4-metilpiridina (435 mg) y cloruro de sulfamoilo (2,12 mmoles). Tras agitar 14 h a ta, se diluyó la reacción en acetato de etilo (20 ml), entonces se lavó con agua (3 x 20 ml) y salmuera (20 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía en columna dio el producto deseado, cis-2-etil-3-*O*-sulfamoil-17-etilidenestrona, como un aceite incoloro transparente que se solidificó en reposo y mostró  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,17 (1H, s, ArH), 7,04 (1H, s, ArH), 5,15 (1H, qdd, *J* 7,0,2,0, 2,0, :CHMe), 5,09 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 2,80-2,86 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 2,69 (2H, q, *J* 7,4, CH<sub>2</sub>Me), 2,18-2,46 (5H, m), 1,89-1,96 (1 H, m), 1,70-1,78 (1 H, m), 1,69 (3H, ddd, *J* 7,0, 2,0, 2,0, MeHC:), 1,23-1,63 (6H, m), 1,21 (3H, t, *J* 7,4, CH<sub>2</sub>Me) y 0,90 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  149,8, 145,9, 139,5, 135,8, 133,4 (todos los C), 126,8, 121,2, 113,4, 55,4 (todos los CH), 44,5 (C), 44,1, 38,0 (ambos CH), 37,2, 31,5, 29,3, 27,4, 26,9, 24,2, 23,1 (todos los CH<sub>2</sub>), 17,0, 14,7 y 13,3; HRMS [FAB+] 389,20246.

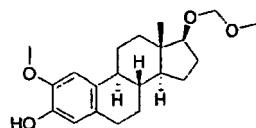
### 2-Metoxi-3-benciloxi-17-O-metoximetelestradiol



55 Se trató una disolución de 2-metoxi-3-benciloxiestradiol (800 mg) en DMF (10 ml) con hidruro de sodio (120 mg) y entonces tras 0,25 h con clorometil metil éter (266  $\mu$ l). Se agitó la reacción durante 14 h a temperatura ambiente antes del tratamiento final acuoso convencional. La cromatografía (hexano/acetato de etilo 6:1) produjo el producto deseado como un aceite incoloro transparente (590 mg) que se solidificó en reposo, p.f. 87-88°C, que mostró  $\delta$ <sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>) 7,24-7,45 (5H, m), 6,85 (1H, s, ArH), 6,62 (1H, s, ArH), 5,10 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 4,66 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 3,86 (3H, s, OMe), 3,62 (1H, dd, *J* 8,4, 8,2, 17-*a*H), 3,37 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) 2,70-2,80 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,20-2,32 (13H, m), y 0,82 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>)- m/z [FAB+] 436,1 (100%, M<sup>+</sup> + H). HRMS [FAB+] 436,26136.

*2-Metoxi-17-O-metoximetilestradiol*

5



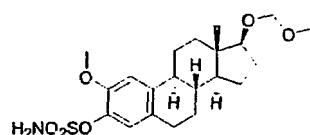
10

Se hidrogenó (1 atm) una disolución de 2-metoxi-3-benciloxi-17-O-metoximetilestradiol (500 mg) en THF (2 ml) y etanol (10 ml) durante 16 h en presencia de Pd/C (50 mg, 5%). Se sometió a tratamiento final la reacción mediante filtración a través de celite y evaporación dando el producto deseado como un sólido blanco (500 mg). Se obtuvieron cristales blancos mediante recristalización en éter/hexano  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 6,78 (1H, s, ArH), 6,63 (1H, s, ArH), 4,65 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 3,86 (3H, s, OMe), 3,56-64 (1H, m, 17- $\alpha$ H), 3,37 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) 2,72-2,80 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,15-2,30 (13H, m), y 0,82 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>).

*2-Metoxi-3-O-sulfamoil-17-O-metoximetilestradiol*

20

25

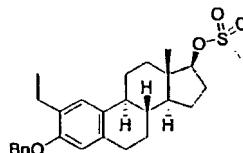


30

Se trató una disolución a 0°C de cloruro de sulfamoilo (1,7 mmoles) en DMA (2 ml) con 2-metoxi-17-O-metoximetilestradiol (170 mg). Tras 3 h, se sometió la reacción a tratamiento final mediante dilución en acetato de etilo (15 ml) y luego lavando con agua (4 x 15 ml) y salmuera (15 ml), se secó y se evaporó. La cromatografía (gradiente de acetona/cloroformo) dio el producto deseado, 2-metoxi-3-O-sulfamoil-17-O-metoximetilestradiol, como un sólido blanco (160 mg) que entonces se cristalizó en éter/hexano.  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 7,02 (1H, s, ArH), 6,91 (1H, s, ArH), 4,99 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 4,65 (1H, d, 9,0, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O), 4,64 (1H, d, 9,0, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O), 3,86 (3H, s, OMe), 3,60 (1H, dd, *J* 8,6, 8,2, 17- $\alpha$ H), 3,37 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) 2,76-2,82 (2H, m, 6-CH<sub>2</sub>), 1,15-2,30 (13H, m), y 0,82 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>);  $\delta_c$  148,7, 140,4, 136,6, 130,1, 124,0, 110,4, 96,0, 86,5, 56,4, 55,2, 50,0, 44,5, 43,0, 38,2, 37,3, 28,7, 27,1, 26,5, 23,2 y 11,9.

*2-Etil-3-benciloxi-17-O-mesilestradiol 58*

45



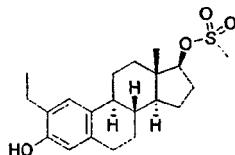
50

A una disolución de 2-ethyl-3-O-bencilestradiol (1 mmoles) en 5 ml de piridina seca agitada bajo nitrógeno y enfriada hasta 0°C se le añadió cloruro de metilsulfonilo (0,09 ml, 1,2 mmoles). Se agitó la disolución a 0°C durante 2 h antes de la adición de agua (20 ml). Se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x60 ml) y se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, entonces se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Tras la eliminación de los disolventes a vacío y la cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 5:1), se obtuvo 2-ethyl-3-benciloxi-17-O-mesilestradiol como un sólido blanco. 0,36 g (77%), p.f. = 133°C <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,22 (t, JH-H = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,60 (m, 6H), 1,70-1,95 (m, 3H), 2,05 (m, 1H), 2,15-2,45 (m, 3H), 2,68 (q, JH-H = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,85 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>), 4,57 (m, 1H, H17), 5,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6,64 (s, 1H, ArH), 7,10 (s, 1H, ArH), 7,36-7,44 (m, 5H, Ph). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): 11,7(CH<sub>3</sub>), 14,6(CH<sub>3</sub>), 23,0, 23,4, 26,0, 27,1, 27,9, 29,5, 36,4, 38,2, 38,6, 43,3, 43,7, 49,0, 69,8 (CH<sub>2</sub>Ph), 89,5(C17), 111,8, 126,2, 127,0, 127,6, 128,4, 130,3, 131,7, 134,7, 137,6 y 154,5

65

## 2-Etil-17-O-mesilestradiol 59

5

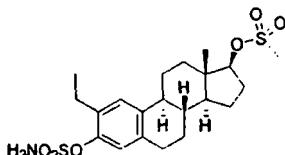


10 A una disolución de 2-etil-3-benciloxi-17-O-mesilestradiol (0,5 mmoles) en 10 ml de THF y 40 ml de etanol se le añadieron 30 mg de Pd al 10%/C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 14 horas. Se filtró la suspensión sobre celite, se lavó con THF y se concentró la fase orgánica a vacío. Tras la cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 1:0 a 2:1), se aisló 2-etil-17-O-mesilestradiol como un sólido blanco. 145 mg (77%), p.f. = 195°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,21 (t, JH-H = 7,7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,60 (m, 6H), 1,71-1,91 (m, 3H), 2,03 (m, 1H), 2,13-2,38 (m, 3H), 2,58 (q, JH-H = 7,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,79 (m, 2H, H6), 3,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>), 4,53 (s, 1H, OH), 4,56 (dd, 1 JH-H = 9,1 y 7,9 Hz, 1H, H17), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,03 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): 11,7 (CH<sub>3</sub>), 14,6(CH<sub>3</sub>), 23,0, 23,4, 26,0, 27,1, 27,9, 29,5 36,4, 38,2, 38,6, 43,3, 43,7, 49,0, 89,5(C17), 115,2, 126,3, 127,3, 132,1, 135,2 y 151,2 MS m/z: 350,16 (M<sup>+</sup>) HPLC 100%. Microanálisis: C: 66,30 (esperado 66,63); H: 7,80 (esperado 7,99)

20

## 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-O-mesilestradiol 60

25



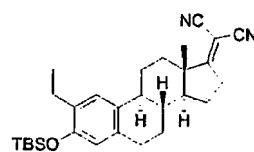
30

35 Se concentró a vacío 1 ml de una disolución 0,559 M de cloruro de sulfamoilo en tolueno y se disolvió cloruro de sulfamoilo en 1 ml de DMA. Se enfrió esta disolución hasta 0°C y se añadió a 2-etil-17-O-mesilestradiol (0,2 mmoles) bajo nitrógeno. Se agitó la disolución durante 15 horas a temperatura ambiente. Tras la adición de 5 ml de agua, se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. Tras la cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 5:2), se obtuvo 2-etil-3-O-sulfamoil-17-O-mesilestradiol como un sólido blanco. 60 mg (66%) p.f. = 179°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (t, JH-H = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,30-1,55 (m, 6H), 1,73-187 (m, 3H), 2,04 (m, 1H), 2,16-2,36 (m, 3H), 2,68 (q, JH-H = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,82 (m, 2H, H6), 3,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>), 4,57 (dd, 1 JH-H = 8,7 y 8,1 Hz, 1H, H17), 5,08 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,03 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): 14,1(CH<sub>3</sub>), 17,0(CH<sub>3</sub>), 25,4, 23,4, 28,2, 29,2, 30,3, 31,4 38,6, 40,5, 40,6, 45,6, 46,3, 51,4, 91,5(C17), 123,6, 129,2, 135,9, 137,9, 141,1 y 148,3. LRMS m/z: 457,32 (M<sup>+</sup>); HPLC 100%; microanálisis: C: 53,40 (esperado 55,12); H: 6,38 (esperado 6,34); N: 3,09 (esperado 3,06).

45

## 2-Etil-3-O-TBS-17-dicianometilenestrona

50

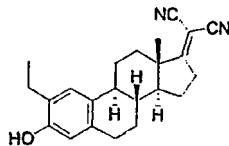


55

60 Se sometió a reflujo una disolución de 2-etil-3-O-TLS-estrona (2 mmoles), malononitrilo (6 mmoles) y  $\beta$ -alanina en 150 ml de tolueno y 30 ml de ácido acético durante 3 días. Además, se añadieron alícuotas de 2 mmoles de malononitrilo tras 24 h y 48 h. Tras enfriar la disolución hasta ta, se evaporaron los disolventes y se agitó el sólido residual con 50 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (2x100 ml). Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se eliminó el disolvente a vacío. Tras la cromatografía en columna, se obtuvo 2-etil-3-O-TBS-17-dicianometilenestrona como un polvo blanco. 840 mg (91%), p.f. = 168°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,21 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si), 1,00 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si), 1,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,15 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,40-1,80 (m, 6H), 1,85-2,05 (m, 2H), 2,26 (m, 1H), 2,45-3,05 (m, 7H), 6,4 (s, 1H, ArH), 7,02 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): -4,2 y -4,1 (CH<sub>3</sub>Si), 14,6 (CH<sub>3</sub>), 16,6, 18,2, 23,2, 23,6, 25,7 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 26,3, 27,5, 29,1, 34,0, 34,7, 38,3, 43,4, 49,5, 54,2, 79,6 (C17), 111,1, 112,4, 118,3, 126,1, 131,2, 132,2, 134,3, 151,5 y 196,2.

## 2-Etil-17-dicianometilenestrona

5



10 Se enfrió hasta 0°C una disolución de 2-ethyl-3-O-TBS-17-dicianometilenestrona (0,5 mmoles) en THF (50 ml) y se añadió gota a gota TBAF/THF 1 M (0,6 mmoles, 0,6 ml). Se agitó la disolución durante 2 horas a 0°C, entonces se calentó hasta ta. Se añadieron entonces agua (10 ml) y acetato de etilo (80 ml), se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre  $MgSO_4$  y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5:1 a 2:1) dando 2-ethyl-17-dicianometilenestrona como un sólido blanco. 125 mg (72%); p.f. = 270°C;  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 270 MHz): 1,06 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,21 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,39-1,79 (m, 6H), 1,89-2,05 (m, 2H), 2,25 (m, 1H), 2,45-2,52 (m, 1H), 2,61 (q,  $J$  = 7,5 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,63-3,02 (m, 5H), 4,52 (s, 1H, OH), 6,50 (s, 1H, ArH), 7,02 (s, 1H, ArH).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ): 14,3, 16,6 ( $CH_3$ ), 23,0, 23,2, 26,4, 27,4, 28,9, 33,9, 34,7, 38,3, 43,3, 49,4, 54,1, 79,6 (C17), 111,2, 112,5, 115,2 126,2, 127,5, 131,3, 135,0, 151,4 y 196,1. HPLC: 100%

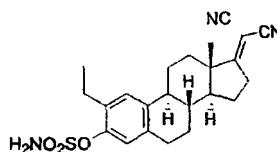
15

20

## 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-dicianometilenestrona

25

30



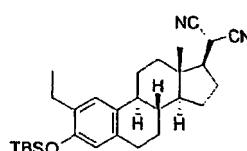
35 Se añadió una disolución de  $NH_2SO_2Cl$  (0,6 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-ethyl-17-dicianometile-  
nestrona (0,2 mmoles) y se agitó la mezcla durante 14 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. A continuación se  
añadió agua (10 ml) y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica  
sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $MgSO_4$  antes de eliminarse el disolvente a vacío. Se purificaron los  
sólidos residuales mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5/1 a 3/1) dando 62 mg de 2-ethyl-  
3-O-sulfamoil-17-dicianometilenestrona (73%), p.f. = 228°C;  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 270 MHz): 1,6 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,20 (t,  
40  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,44-1,75 (m, 6H), 1,92-2,03 (m, 2H), 2,29 (m, 1H), 2,44-2,55 (m, 1H), 2,69 (q,  $J$  = 7,4 Hz,  
2H,  $CH_2$ ), 2,75-3,04 (m, 5H), 5,03 (s, 2H,  $NH_2$ ), 7,09 (s, 1H, ArH), 7,16 (s, 1H, ArH).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ): 14,6, 16,6  
( $CH_3$ ), 23,0, 23,2, 26,2, 27,2, 28,9, 33,8, 34,7, 37,8, 43,4, 49,3, 54,1, 79,7 (C17), 111,0, 112,3, 121,5, 126,9, 134,0,  
135,4, 138,0, 146,4 y 195,8. HPLC 100%; microanálisis: C: 64,90 (esperado 64,92); H: 6,45 (esperado 6,40); N: 9,68  
(esperado 9,87).

45

2-Etil-3-O-TBS-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona

50

55

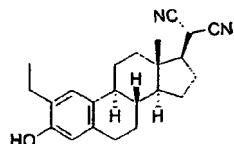


60 Se enfrió hasta -10°C una disolución de 2-ethyl-3-O-TBS-17-dicianometilenestrona (1 mmol) en metanol (50 ml)  
y THF (5 ml) y se añadió  $NaBH_4$  (76 mg, 2 mmoles) en porciones. Se agitó la mezcla a -10°C durante 4 horas. Se  
añadió agua (50 ml) y se acidificó la disolución con  $NH_4Cl$ . Se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de  
etilo (2x60 ml) y se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre  $MgSO_4$  y se evaporaron  
los disolventes a vacío. Se purificaron los sólidos residuales mediante cromatografía en columna dando 380 mg de 2-  
ethyl-3-O-TBS-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona (83%), p.f. = 162°C  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ): 0,22 (s, 6H,  $CH_3Si$ ), 0,80 (s,  
3H,  $CH_3$ ), 1,00 (s, 9H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 1,16 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,33-1,66 (m, 6H), 1,85 (m, 2H), 2,10-2,40 (m, 6H),  
2,55 (q,  $J$  = 7,5 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,78 (m, 2H, H6), 3,56 (d,  $J$  = 9,9 Hz, 1H,  $CH(CN)_2$ ), 6,47 (s, 1H, ArH), 7,03 (s, 1H,  
ArH).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ): -4,2 y -4,1 ( $CH_3Si$ ), 12,4 ( $CH_3$ ), 14,7, 18,2, 23,4, 25,7 ( $(CH_3)_3CSi$ ), 26,2, 27,6, 27,7, 29,2,  
37,5, 38,8, 43,2, 43,6, 50,3, 54,6, 112,7, 118,2, 126,1, 131,9, 132,1, 134,5 y 151,3.

# ES 2 339 450 T3

## 2-Etil-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona

5

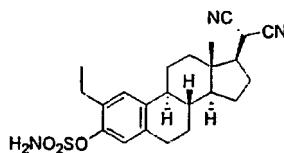


10

Se enfrió hasta 0°C una disolución de 2-ethyl-3-O-TBS-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona (0,5 mmoles) en THF (50 ml) y se añadió gota a gota TBAF/THF 1 M (0,6 mmoles, 0,6 ml). Se agitó la disolución durante 2 horas a 0°C, entonces se calentó hasta ta. Se añadieron entonces agua (10 ml) y acetato de etilo (80 ml), se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5:1 a 2:1) dando 2-ethyl-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona como un sólido blanco. 124 mg (71%) p.f. = 248°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,21 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,30-1,61 (m, 7H), 1,85 (m, 2H), 2,10-2,41 (m, 5H), 2,59 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,81 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3,56 (d, J = 9,9 Hz, 1H, CH(CN)<sub>2</sub>), 4,51 (a, 1H, OH), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,02 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (GDGL<sub>3</sub>): 12,4 (CH<sub>3</sub>), 14,4 (CH<sub>3</sub>), 22,9, 23,4, 26,3, 27,6, 27,7, 29,0, 37,5, 38,8, 43,2, 43,6, 50,3, 54,5, 112,7, 115,2, 126,3, 127,3, 131,9, 135,2, y 151,3. HPLC: 100%; microanálisis: C: 78,96 (esperado 79,27); H: 8,03 (esperado 8,10); N: 7,79 (esperado 8,04).

## 25 2-Etil-3-*O*-sulfamoil-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona

30

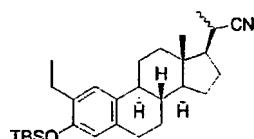


35

Se añadió una disolución de NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl (0,6 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-ethyl-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona (0,2 mmoles) y se agitó la mezcla durante 14 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió agua (10 ml) y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> antes de eliminarse el disolvente a vacío. Se purificaron los sólidos residuales mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5/1 a 3/1) dando 170 mg de 2-ethyl-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -dicianometil-17-desoxiestrona (80%), como un polvo blanco p.f. = 169°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,21 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,32-1,55 (m, 7H), 1,87 (m, 2H), 2,10-2,38 (m, 5H), 2,68 (q, J = 7,4 Hz; 2H, CH<sub>2</sub>), 2,83 (m, 2H, H<sub>6</sub>), 3,57 (d, J = 9,9 Hz, 1H, CH(CN)<sub>2</sub>), 4,91 (a, 2H, NH<sub>2</sub>), 7,08 (s, 1H, ArH), 7,16 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 12,4 (CH<sub>3</sub>), 14,4 (CH<sub>3</sub>), 22,9, 23,4, 26,3, 27,6, 27,7, 29,0, 37,5, 38,8, 43,2, 43,6, 50,3, 54,5, 112,7, 115,2, 126,3, 127,3, 131,9, 135,2 y 151,3. HPLC: 100%; microanálisis: C: 64,64 (esperado 64,61); H: 7,80 (esperado 6,84); N: 9,62 (esperado 9,83).

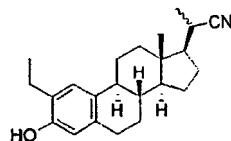
## 50 2-Etil-3-*O*-TBS-17 $\beta$ -(1-ciano)etil-17-desoxiestrona

55



60

Se agitó una disolución de 2-ethyl-3-O-TBS-17 $\beta$ -cianometil-17-desoxiestrona (0,5 mmoles) en THF (50 ml) bajo nitrógeno a -78°C y entonces se trató con LDA 1 M (1,2 mmoles, 1,2 ml) de una manera gota a gota. Tras 30 min., se añadió CH<sub>3</sub>I (1,5 mmoles, 212 mg) y se agitó la mezcla durante 4 horas a -78°C, luego 12 horas a ta. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua (30 ml), se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite amarillo resultante mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 20:1) dando 2-ethyl-3-O-TBS-17 $\beta$ -(1-ciano)etil-17-desoxiestrona, un aceite incoloro, 176 mg (78%), como una mezcla (1:1) de diastereoisómeros <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,23 (s, 6H, CH<sub>3</sub>Si), 0,76 y 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,01 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 1,17 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,96 (m, 13H), 2,05-2,50 (m, 3H), 2,57 (q t, J = 7,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,66-2,88 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 6,48 y 6,50 (m, 1H, ArH), 7,03-7,06 (m, 1H, ArH).

2-Etil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona

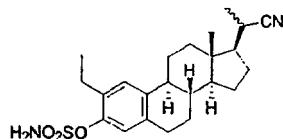
10

Se enfrió hasta 0°C una disolución de 2-ethyl-3-O-TBS-17 $\beta$ (1-ciano)etil-17-desoxiestrona (1 mmol) en THF (50 ml) y se añadió gota a gota TBAF/THF 1 M (1,2 mmoles, 1,2 ml). Se agitó la disolución durante 2 horas a 0°C, se calentó hasta TA. Se añadieron entonces agua (10 ml) y acetato de etilo (80 ml), se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el sólido amarillo residual (400 mg) mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5:1 a 2:1), entonces se recristalizó en hexano/acetato de etilo 6:1 produciendo 220 mg (71%) de 2-ethyl-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona como un polvo blanco p.f.: 226-228°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,20-1,65 (m, 9H), 1,85-1,92. (m, 5H), 2,10-2,58 (m, 4H), 2,5 (m, 2H, H6), 6,55-6,62 (m, 2H, ArH), 7,07 (m, 1 H, ArH). HPLC: 100% microanálisis: C: 81,60 (esperado 81,51); H: 8,79 (esperado 8,79); N: 4,40 (esperado 4,53).

15

2-Etil-3-O-sulfamoil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona

25



30

35

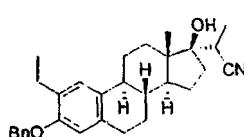
40

Se añadió una disolución de NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl (0,6 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-ethyl-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona (0,2 mmoles) y se agitó la mezcla durante 14 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadieron 10 ml de agua y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> antes de eliminarse el disolvente a vacío. Se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5/1 a 2/1), entonces se recristalizó (hexano/acetato de etilo 5:1) dando 42 mg (54%) de 2-ethyl-3-O-sulfamoil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona, p.f.: 157-159°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,64 (m, 11H), 1,73-1,81 (m, 1H), 1,85-2,03 (m, 2H), 2,23-2,37 (m, 2H), 2,40-2,53 (m, 2H), 2,89 (m, 2H, H6), 7,03 (d, J = 2,7 Hz, 1H, ArH), 7,07 (dd, J = 9,0 y 2,7 Hz, 1H, ArH), 7,31 (d, J = 9,0 Hz, 1H, ArH). HPLC: 100% microanálisis: C: 64,90 (esperado 64,92); H: 7,52 (esperado 7,26); N: 7,23 (esperado 7,21).

2-Etil-3-O-bencil-17 $\alpha$ -(metil)cianometilestradiol

45

50



55

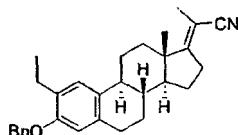
60

Se agitó una disolución de propionitrilo (0,05 moles) en THF seco (50 ml) bajo nitrógeno a -78°C y entonces se trató con LDA (0,05 moles) añadido gota a gota. Se agitó la mezcla durante 1 h antes de la adición de 2-ethyl-3-O-bencilestrona (8 mmoles) en 20 ml de THF (gota a gota a lo largo de un periodo de 3 h). Se agitó la mezcla durante otras 3 h, entonces se extinguío con una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 10/1 a 4/1) dando 2,70 g de 2-ethyl-3-O-bencil-17 $\alpha$ -(metil)cianometilestradiol (76%) como un polvo blanco, p.f. = 75-77°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (t, J = 7,6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25-1,90 (m, 12H), 1,97-2,07 (m, 2H), 2,15-2,23 (m, 1 H), 2,41-2,49 (m, 1 H), 2,66 (q, J = 7,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,77-2,91 (m, 3H), 5,04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6,62 (s, 1H, ArH), 7,09 (s, 1H, ArH), 7,28-7,46 (m, 5H, Ph).

65

## 2-Etil-3-O-bencil 17-(1-ciano)etilidenestrona

5



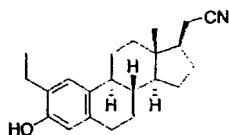
10

Se añadió 2-etil-3-O-bencilestradiol-17 $\alpha$ -propionitrilo (0,05 moles) a una disolución de TEA (2 ml) y DCM (25 ml) enfriada hasta 0°C y tras la adición de  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$  (0,055 moles, 0,44 ml) se agitó la disolución durante 8 horas a 0°C. Se extinguíó la disolución con agua y se extrajeron los compuestos orgánicos con DCM. Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se eliminaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 10/1) dando 2-etil-3-O-bencil-17-cianoetilidenestrona. Rendimiento del 85%, p.f. = 63-64°C  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,30-1,71 (m, 6H), 1,84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,85-1,96 (m, 2H), 2,21-2,51 (m, 4H), 2,64 (q,  $J$  = 7,3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,75-2,90 (m, 3H), 5,04 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6,63 (s, 1H, ArH), 7,10 (s, 1H, ArH), 7,28-7,48 (m, 5H, Ph).

20

2-Etil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona

25



30

A una disolución de 2-etil-3-O-bencil-17-(1-ciano)etilidenestrona (1 mmol) en 5 ml de THF/45 ml de metanol se le añadieron 50 mg de Pd al 5%/C y se agitó la mezcla bajo hidrógeno durante 16 horas. Se filtró la suspensión sobre celite/arena, se lavó con THF y se concentró la fase orgánica a vacío. Tras la cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 10:1 a 1:1) y la recristalización (hexano/acetato de etilo 5:1), se aisló 2-etil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona como un sólido blanco. Polvo blanco, 225 mg (67%), p.f. = 235-236°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,24-1,69 (m, 13H), 1,71-2,00 (m, 2H), 2,10-2,48 (m, 2H), 2,57 (q,  $J$  = 7,3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,71 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ), 2,78 (m, 2H, H6), 4,47 (a, 1H, OH), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,03 (s, 1H, ArH). Microanálisis: C: 81,50 (esperado 81,85); H: 9,18 (esperado 9,26); N: 3,99 (esperado 4,15).

40

2-Etil-3-O-sulfamoil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona

45



50

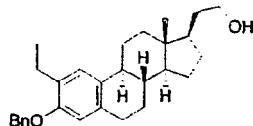
Se añadió una disolución de  $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$  (1 mmol) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 21a (0,3 mmoles) y se agitó la mezcla durante 14 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió entonces agua (10 ml) y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  antes de eliminarse el disolvente a vacío. Se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 5/1 a 2/1), entonces se recristalizó (hexano/acetato de etilo 5:1) dando 2-etil-3-O-sulfamoil-17-desoxi-17 $\beta$ -(1-ciano)etilestrona como un polvo blanco, 86 mg (69%), p.f. = 171-172°C  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,76 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,22-1,64 (m, 11H), 1,75-2,35 (m, 6H), 2,66 (q,  $J$  = 7,3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,68 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ), 2,84 (m, 2H, H6), 4,92 (a, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,07 (s, 1H, ArH), 7,16 (s, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 12,4 ( $\text{CH}_3$ ), 14,6( $\text{CH}_3$ ), 18,6 ( $\text{CH}_3$ ), 23,0, 23,8, 26,2, 26,8, 27,0, 27,4, 29,1, 38,2, 38,6, 42,9, 44,0, 53,3, 54,8, 121,4, 123,0 (CN), 126,9, 133,6, 135,9, 139,3, 146,2.

Microanálisis: C: 66,40 (esperado 66,31); H: 7,73 (esperado 7,74.); N: 6,52 (esperado 6,72).

65

2-Etil-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-hidroxietil)17-desoxiestrona

5



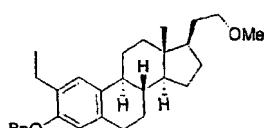
10 Se enfrió hasta 0°C una disolución de éster etílico del ácido (3-benciloxi-2-etyl-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenanren-17-il)-acético (1,84 g, 4 mmoles) en 30 ml de THF seco bajo nitrógeno antes de añadirse LiAlH<sub>4</sub> (0,30 g, 8 mmoles) en porciones. Tras 3 horas a 0°C, se extinguíó la mezcla con NH<sub>4</sub>Cl ac. y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 15/1 a 8:1) dando 1,47 g (88%) de 2-etyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-hidroxietil)17-desoxiestrona como un polvo blanco, p.f. = 98-99°C <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,22-1,58 (m, 9H), 1,70-1,92 (m, 5H), 2,16-2,34 (m, 2H), 2,66 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,82 (m, 2H, H6), 3,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6,62 (s, 1H, ArH), 7,10 (s, 1H, ArH), 7,28-7,45 (m, 5H, Ph).

15

20

2-Etil-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona

25



30

30 Se enfrió hasta 0°C una disolución de 2-etyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-hidroxietil)17-desoxiestrona (1,26 g, 3 mmoles) en 30 ml de THF seco bajo nitrógeno. Se añadió en porciones NaH (0,16 g, 4 mmoles de una dispersión al 60% de NaH en aceite mineral) y se agitó la disolución durante 30 minutos antes de añadirse gota a gota CH<sub>3</sub>I (0,37 ml, 6 mmoles). Se dejó entonces que la disolución se calentase hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Tras la adición de agua (20 ml) se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo 20/1) dando 1,25 g (96%) de 2-etyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona como un polvo blanco, p.f. = 70-71°C <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,26-1,60 (m, 9H), 1,76-1,96 (m, 5H), 2,20-2,42 (m, 2H), 2,70 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,86 (m, 2H, H6), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 5,07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6,66 (s, 1H, ArH), 7,15 (s, 1H, ArH), 7,31-7,50 (m, 5H, Ph).

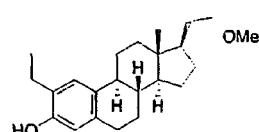
35

40

2-Etil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona

45

50



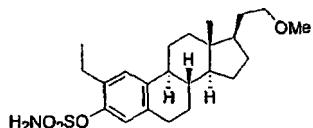
55 Se disolvieron 0,87 g de 2-etyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona (2 mmoles) de 35 en THF (5 ml) y se añadieron MeOH (50 ml), 50 mg de Pd al 5%/C y se agitó la mezcla bajo hidrógeno durante 16 horas. Se filtró la suspensión sobre celite/arena, se lavó con THF y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite amarillento espeso mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 15/1 a 10/1) dando 0,66 g de 2-etyl-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona (97%), un polvo blanco, p.f. = 58-59°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,19-1,56 (m, 12H), 1,72-1,91 (m, 5H), 2,13-2,34 (m, 2H), 2,60 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,77 (m, 2H, H6), 3,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O) 3,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 5,26 (s, 1H, OH), 6,48 (s, 1H, ArH), 7,06 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>): 12,4 (CH<sub>3</sub>), 12,5 (CH<sub>3</sub>), 23,0, 24,4, 26,5, 27,9, 28,3, 29,3, 30,2, 37,7, 38,9, 42,4, 44,2, 47,3, 54,6, 58,4, 72,4, 115,1, 126,2, 127,2, 132,6, 135,4 y 151,3. HPLC: 100%; HRMS (FAB+): hallado 342,255493 calc. C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> 342,255881

60

65

2-Etil-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona

5



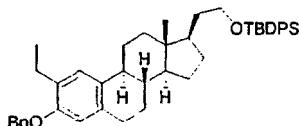
10

Se añadió una disolución de  $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$  (3 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-ethyl-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona (342 mg, 1 mmoles) y se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la adición de agua (10 ml), se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 10/1 a 4/1), entonces se recristalizó (hexano/acetato de etilo 5:1) dando 0,35 g de 2-ethyl-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -(2-metoxietil)17-desoxiestrona (84%) como un polvo blanco, p.f. = 168-169°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,61 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,22-1,54 (m, 9H), 1,70-1,95 (m, 5H), 2,15-2,33 (m, 2H), 2,68 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,82 (m, 2H, H6), 3,33 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3,35 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,95 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,06 (s, 1H, ArH), 7,18 (s, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 12,4 ( $\text{CH}_3$ ), 14,6 ( $\text{CH}_3$ ), 23,0, 24,4, 26,3, 27,7, 28,3, 29,3, 30,4, 37,6, 38,5, 42,4, 44,4, 47,4, 54,9, 58,7, 72,6, 121,4, 127,0, 133,5, 136,1, 139,9 y 146,1.; HPLC: 100%; microanálisis: C: 65,40 (esperado 65,52); H: 8,29 (esperado 8,37); N: 3,14 (esperado 3,32).

25

2-Etil-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-(OTBDPS)etil)17-desoxiestrona

30



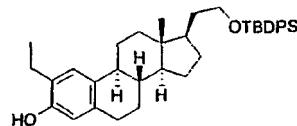
35

Se agitó una disolución de 2-ethyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-hidroxietil)-17-desoxiestrona (0,419 g, 1 mmol), imidazol (0,136 g, 2 mmoles) y TPDPSCI (1,1 mmoles) en 10 ml de DMF seca a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 24 horas. Tras la adición de agua (10 ml), se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el aceite residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 25/1) dando [2-(3-bencilogoxi-2-ethyl-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopental[a]fenantren-17-il)-etoxi]-terc-butil-difenil-silano como un polvo blanco, 590 mg (90%), p.f. = 48-50°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,12 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1,15-1,60 (m, 11H), 1,71-2,01 (m, 5H), 2,20-2,44 (m, 2H), 2,69 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,88 (m, 2H, H6), 3,65-3,81 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6,68 (s, 1H, ArH), 7,20 (s, 1H, ArH), 7,32-7,51 (m, 11H, Ph), 7,72-7,77 (m, 4H, Ph).

45

2-Etil-17 $\beta$ -(2-(OTBDPS)etil)17-desoxiestrona

50

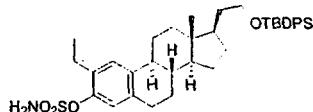


55

A una disolución de 2-ethyl-3-O-bencil-17 $\beta$ -(2-(OTBDPS)etil)17-desoxiestrona (1 mmol) en THF (2 ml) y etanol (20 ml) se le añadieron 50 mg de Pd al 5%/C y se agitó la mezcla bajo hidrógeno. Se monitorizó la reacción mediante CCF. Tras la finalización, se filtró la suspensión sobre celite/arena y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 20/1 a 3:1) produciendo 17-[2-(terc-butil-difenil-silanoloxi)-etil]-2-ethyl-13-metil-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-decahidro-6H-ciclopental[a]fenantren-3-ol como un sólido blanco, p.f. = 134-135°C, 0,49 g (87%);  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,59 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,08 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1,18-1,56 (m, 12H), 1,68-1,89 (m, 5H), 2,10-2,33 (m, 2H), 2,61 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,78 (m, 2H, H6), 3,61-3,78 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,71 (s, 1H, OH), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,07 (s, 1H, ArH), 7,38 (m, 6H, Ph), 7,70 (m, 4H, Ph).

2-Etil-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -(2-(OTBDPS)etil)17-desoxiestrona

5



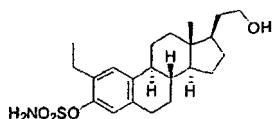
10

Se añadió una disolución de  $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$  (3 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 39 c (566 mg, 1 mmol) y se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la adición de agua (10 ml), se trajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 15/1 a 8/1) dando 2-ethyl-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -(2-(OTBDPS)ethyl)17-desoxiestrona como un sólido blanco, 470 mg (72%), p.f. = 185-186°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,57 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,05 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1,18-1,55 (m, 13H), 1,68-1,89 (m, 4H), 2,15-2,31 (m, 2H), 2,68 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,82 (m, 2H, H6), 3,57-3,75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,91 (a, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,06 (s, 1H, ArH), 7,19 (s, 1H, ArH), 7,34-7,45 (m, 6H, Ph), 7,67 (m, 4H, Ph).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): 12,9 ( $\text{CH}_3$ ), 15,1 ( $\text{CH}_3$ ), 20,0, 23,5, 24,9, 26,8, 27,3, 28,1, 28,8, 29,7, 33,9, 38,1, 38,8, 42,7, 44,8, 47,6, 55,0, 63,9, 121,5, 127,2, 127,7, 129,7, 133,7, 134,3, 135,7, 136,3, 140,1 y 146,2. HRMS (FAB+): hallado 645,326294, calc.  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_2$  645,330810

25

2-Etil-3-O-sulfamoil-17 $\beta$ -(2-hidroxietil)17-desoxiestrona

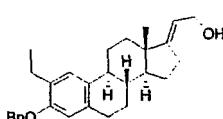
30



45

## 2-(3-Benciloxi-2-ethyl-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-etanol

50

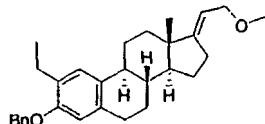


55

Se enfrió hasta 0°C una disolución de éster etílico del ácido (3-benciloxi-2-ethyl-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-acético (0,92 g, 2 mmoles) en 20 ml de THF seco bajo nitrógeno antes de añadirse en porciones  $\text{LiAlH}_4$  (0,15 g, 4 mmoles). Tras 6 horas a 0°C, se extinguío la mezcla con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ac., se trajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 15/1 a 6:1) dando 2-(3-benciloxi-2-ethyl-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-etanol, 0,75 g (89%), como un polvo blanco, p.f. = 61-62°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,84 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,20-1,66 (m, 9H), 1,82-2,02 (m, 3H), 2,21-2,51 (m, 3H), 2,71 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,87 (m, 2H, H6), 4,16 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 5,07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5,31 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 6,66 (s, 1H, ArH), 7,15 (s, 1H, ArH), 7,30-7,48 (m, 5H, Ph).

## 3-Benciloxi-2-etil-17-(2-metoxi-etilidenil)-3-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantreno

5



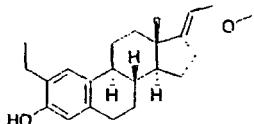
10

Se enfrió hasta 0°C una disolución de 2-(3-benciloxi-2-etil-13-metil-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-decahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-iliden)-etanol (0,62 g, 1,5 mmoles) en 10 ml de THF seco bajo nitrógeno. Se añadió en porciones NaH (0,08 g, 2 mmoles de una dispersión al 60% de NaH en aceite mineral) y se agitó la disolución durante 30 minutos antes de añadirse gota a gota CH<sub>3</sub>I (0,19 ml, 3 mmoles). Se dejó calentar entonces la disolución hasta temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. Tras la adición de agua (20 ml), se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo 20/1) dando 3-benciloxi-2-etil-17-(2-metoxi-etiliden)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantreno, 0,59 g (91%), como un aceite incoloro; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,24 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,26-1,66 (m, 6H), 1,82-2,02 (m, 3H), 2,20-2,51 (m, 3H), 2,70 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,87 (m, 2H, H6), 3,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OMe), 5,06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5,27 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>OH), 6,66 (s, 1H, ArH), 7,15 (s, 1H, ArH), 7,31-7,48 (m, 5H, Ph).

20

## 2-Etil-17-(2-metoxi-etiliden)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol

30



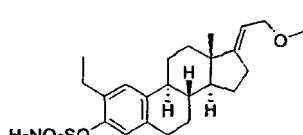
35

Se sometió a reflujo una disolución de 3-benciloxi-2-etil-17-(2-metoxi-etiliden)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantreno (0,43 g, 1 mmoles) en 50 ml de terc-butanol y se añadió Na (0,46 g, 20 mmoles) en pequeñas porciones a lo largo de un periodo de 6 horas. Se sometió a reflujo la mezcla durante 18 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió 2-propanol para destruir el sodio en exceso. Se evaporaron los disolventes y se vertió el sólido residual en agua (20 ml). Se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con agua, salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se evaporó el disolvente a vacío. Se purificó el aceite bruto mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 15/1 a 8:1) dando 2-ethyl-17-(2-metoxi-ethylidene)-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol como un polvo blanco, 230 mg (68%), p.f. = 133-134°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,22 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,28-1,60 (m, 6H), 1,75-1,96 (m, 3H), 2,18 (m, 1H), 2,39 (m, 3H), 2,59 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,79 (m, 2H, H6), 3,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OMe), 5,11 (s, 1H, OH), 5,24 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>OH), 6,48 (s, 1H, ArH), 7,05 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 14,9 (CH<sub>3</sub>), 19,2, 23,5, 24,4, 26,7, 27,1, 28,1, 29,7, 36,4, 39,1, 44,4, 44,8, 53,5, 58,2, 70,2, 112,8, 115,7, 126,4, 127,5, 132,6, 135,5, 151,5 y 157,1. HPLC: 98%; HRMS (FAB+): hallado 340,24023 calc. C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> 340,24023.

40

## 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-(2-metoxi-ethylidene)estrona

55



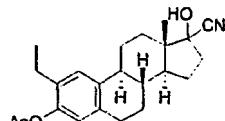
60

Se añadió una disolución de NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl (2 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-ethyl-17-(2-metoxi-ethylidene)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol (170 mg, 0,5 mmoles) y se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la adición de agua (10 ml), se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo de 10/1 a 5/1) dando 2-ethyl-3-O-sulfamoil-17-(2-metoxi-ethylidene)estrone como un sólido blanco, 142 mg (68%), <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 270 MHz): 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,20 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,22-

1,67 (m, 6H), 1,78-1,98 (m, 3H), 2,17-2,47 (m, 4H), 2,68 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,85 (m, 2H, H6), 3,32 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3,90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OMe}$ ), 5,14 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,22 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 7,06 (s, 1H, ArH), 7,19 (s, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 14,6 ( $\text{CH}_3$ ), 18,8, 23,1, 24,0, 26,4, 26,5, 27,4, 29,2, 35,8, 38,2, 44,3, 44,4, 53,2, 57,8, 69,8, 112,9, 121,4, 127,0, 133,7, 136,0, 139,6, 146,2 y 156,4. HPLC: 99,7%; HRMS (FAB+): hallado 419,21303 calc. 5 para  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{NS}$  419,21303

2-Etil-3-O-acetil-17-ciano-17-hidroxi-estrona

10



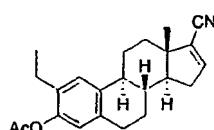
15

Se agitó una disolución de acetato de 2-etilestrona (5 mmoles) y KCN (3,26 g, 50 mmoles) en 20 ml de metanol y 5 ml de ácido acético a temperatura ambiente durante 3-5 días. Se añadieron hielo y agua a la mezcla y se filtró el sólido resultante y se lavó con cantidades abundantes de agua. Se disolvió el sólido blanco en acetato de etilo (100 ml), se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó el disolvente a vacío dando 2-ethyl-3-O-acetyl-17-ciano-17-hidroxi-estrona como un sólido blanco, 1,6 g (87%), que mostró  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,16 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,33-1,70 (m, 6H), 1,80-2,06 (m, 5H), 2,30 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2,25-2,35 (m, 1H), 2,38-2,58 (m, 3H), 2,70 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,82 (m, 2H, H6), 6,71 (s, 1H, ArH), 7,15 (s, 1H, ArH). 25

25

Éster 17-ciano-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido acético

30



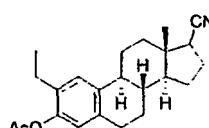
35

Se disolvió 2-ethyl-3-O-acetil-17-ciano-17-hidroxi-estrona (4 mmoles) en 10 ml de piridina seca y se añadió gota a gota  $\text{SOCl}_2$  (1,46 ml, 20 mmoles). Se sometió a refluo la disolución durante 1 hora bajo nitrógeno, se enfrió hasta 0°C y se hidrolizó hasta pH 1 con HCl acuoso 5 M. Se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con agua y salmuera sucesivamente, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el aceite oscuro resultante mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 8:1 a 6:1) dando éster 17-ciano-2-ethyl-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido acético como un polvo blanco, 0,50 g (36%), p.f. 176-177°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,16 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,36-1,52 (m, 1H), 1,60-1,73 (m, 4H), 1,84-1,94 (m, 1H), 2,05-2,26 (m, 3H), 2,30 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2,39-2,52 (m, 4H), 2,86 (m, 2H, H6), 6,65 (dd,  $J$  = 3,5 y 2,0 Hz, 1H, H16), 6,72 (s, 1H, ArH), 7,14 (s, 1H, ArH). 45

45

2-Etil-3-O-acetil-17-ciano-17-desoxiestrona

50



55

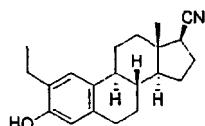
A una disolución de éster 17-ciano-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido acético (1 mmol) en THF (5 ml) y metanol (30 ml) se le añadió Pd al 5%/C (30 g) y se agitó la suspensión a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 24 horas. Se filtró la suspensión sobre celite/arena y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el sólido residual mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 8:1 a 6:1) dando 2-ethyl-3-O-acetyl-17-ciano-17-desoxiestrona como un polvo blanco, 330 mg (94%), p.f. = 195-196°C;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 270 MHz): 0,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,22-1,32 (m, 1H), 1,37-1,53 (m, 4H), 1,56-1,67 (m, 1H), 1,86-1,95 (m, 2H), 1,99-2,08 (m, 1H), 2,12-2,17 (m, 1H), 2,19-2,32 (m, 2H), 2,35 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2,38-2,47 (m, 2H), 2,53 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,88 (m, 2H, H6), 6,76 (s, 1H, ArH), 7,19 (s, 1H, ArH). 60

65

## 2-Etil-17-ciano-17-desoxiestrona

5

10



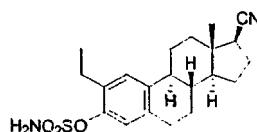
15 Se disolvió 2-etil-3-O-acetyl-17-ciano-17-desoxiestrona (0,8 mmoles) en acetona (10 ml) y metanol (10 ml) y se añadió  $K_2CO_3$  (0,55 g, 4 mmoles) a la disolución. Se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las sales por filtración y se evaporaron los disolventes. Se trató el sólido resultante con  $NH_4Cl$  acuoso (hasta pH 1) y se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con agua y salmuera sucesivamente, se secó sobre  $MgSO_4$ . Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el sólido resultante mediante cromatografía (hexano/acetato de etilo de 8:1 a 6:1) y se recristalizó en hexano/acetato de etilo (4:1) dando 2-  
20 etil-17-ciano-17-desoxiestrona como un polvo blanco, 210 mg (85%), p.f. = 284-285°C;  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 270 MHz): 0,95 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,21 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,30-1,60 (m, 6H), 1,79-1,91 (m, 2H), 1,94-2,07 (m, 2H), 2,09-2,24 (m, 2H), 2,33-2,42 (m, 2H), 2,58 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,78 (m, 2H, H6), 4,50 (s, 1H, OH), 6,49 (s, 1H, ArH), 7,03 (s, 1H, ArH);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz): 14,4( $CH_3$ ), 14,5, 23,1, 24,3, 26,4, 26,7, 27,8, 29,1, 37,1, 39,2, 40,4, 43,7, 44,7, 53,5, 115,2, 121,3, 126,4., 127,4, 131,9, 135,2 y 151,3; microanálisis: C: 81,15 (esperado 81,51); H: 8,72 (esperado 8,79); N: 4,33 (esperado 4,53).

25

## 2-Etil-3-O-sulfamoil-17-ciano-17-desoxiestrona

30

35



40

45

50

Se añadió una disolución de  $NH_2SO_2Cl$  (0,8 mmoles) en DMA (2 ml) enfriada hasta 0°C a 2-  
etil-17-ciano-17-desoxiestrona (0,3 mmoles) y se agitó la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la adición de agua (10 ml), se extrajeron los compuestos orgánicos con acetato de etilo (2x50 ml). Se lavó la fase orgánica sucesivamente con agua, salmuera y se secó sobre  $MgSO_4$ . Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el sólido residual mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo 5/1) y se recristalizó en hexano/acetato de etilo (5/1) dando 2-  
etil-3-O-sulfamoil-17-ciano-17-desoxiestrona como un polvo blanco, 100 mg (86%), p.f. = 193-194°C;  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 270 MHz): 0,95 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,20 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1,28-1,62 (m, 6H), 1,86 (m, 2H), 1,96-2,28 (m, 4H), 2,37 (m, 2H), 2,68 (q,  $J$  = 7,4 Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,83 (m, 2H, H6), 4,94 (s, 2H,  $NH_2$ ), 7,08 (s, 1H, ArH), 7,18 (s, 1H, ArH);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ , 400 MHz): 14,4 ( $CH_3$ ), 14,7, 23,1, 24,3, 26,1, 26,6, 27,5, 29,1, 37,0, 38,8, 40,3, 43,8, 44,6, 53,5, 121,2, 121,5, 127,0, 133,8, 135,7, 138,8 y 146,3. Microanálisis: C: 64,95 (esperado 64,92); H: 7,29 (esperado 7,26); N: 7,11 (esperado 7,21).

55

60

65

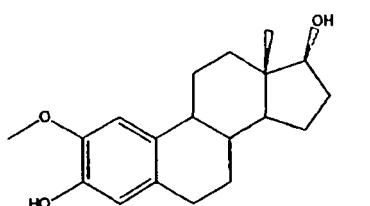
# ES 2 339 450 T3

## *Datos biológicos*

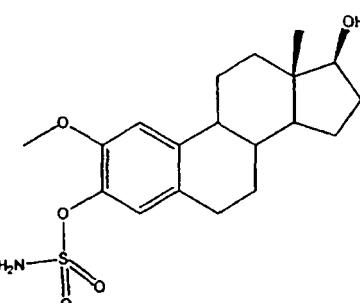
Los compuestos a los que se hace referencia en la presente memoria pueden identificarse o bien mediante los números de compuesto utilizados en la sección de síntesis anterior o bien mediante un código STX. Los números de compuesto se indican a continuación con sus códigos STX correspondientes.

	<b>Nº de compuesto</b>	<b>Código STX</b>
10	14a	441
	14b	442
	15	563
15	17a	590
	17b	504
	19	535
	20	537
20	22	506
	23	589
	27	505
	28	564
25	30	626
	31	639
	32	640
	33	641
30	36	621
	51	591
	59	941
	60	940

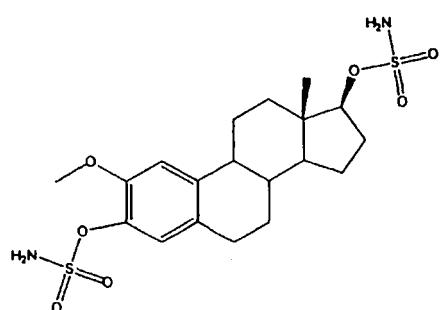
35 Además, se hace referencia a los siguientes compuestos:



STX 66



STX 68



STX 140

# ES 2 339 450 T3

## *Inhibición de la esteroide sulfatasa*

<b>N.º de compuesto</b>	<b>Valores de <math>IC_{50}</math> (nM) para la inhibición de la esteroide sulfatasa microsomal placentaria:</b>
28	945
31	9000
33	109
60	>10.000

## *Proliferación celular*

Se midió el efecto de los fármacos sobre la proliferación de células utilizando un ensayo de placa de microtitulación (ensayo de proliferación Cell Titer 96, Promega, Hampshire, RU).

<b>N.º de compuesto</b>	<b><math>IC_{50}</math> en <math>\mu</math>M para la inhibición del crecimiento de células MGF-7</b>
14a	30,6
14b	31,1
15	1,85
17a	0,67
17b	0,77
19	2,52
20	5,64
22	26,4
23	4,19
27	3,24
28	0,06
30	3,22
31	0,03
32	0,30
33	0,15
36	3,25
51	6,02
59	5,58
60	0,09

# ES 2 339 450 T3

Se utilizó el compuesto STX 140 como control en los siguientes ensayos.

Compuesto	Cl <sub>50</sub> (μM)		
	Células de cáncer de mama MCF-7	Células de cáncer de ovario A2780	Células de cáncer de próstata PC3
STX 140	0,25	0,28	0,27
STX 641	0,15	0,09	0,05

Células de vena umbilical humana; ensayo de proliferación MTS en placa de 96 pocillos, inhibición media de tres pocillos +/- DE.

Conc.	STX 140	Compuesto 33	Compuesto 28
0,05 μM	7% +/- 4	53% +/- 13	0% +/- 6
0,10 μM	18% +/- 1*	60% +/- 8	5% +/- 5
1,00 μM	59% +/- 3	48% +/- 6	54% +/- 10
5,00 μM	49% +/- 5	42% +/- 3	49% +/- 7

\* Lectura por duplicado sólo.

Fibroblastos dérmicos humanos; ensayo de proliferación MTS en placa de 96 pocillos, inhibición media de tres pocillos +/- DE.

Conc.	STX 140	Compuesto 33	Compuesto 28
0,05 μM	0% +/- 6	2% +/- 2*	2% +/- 1
0,10 μM	2% +/- 6	10% +/- 4	0% +/- 2
1,00 μM	9% +/- 9	8% +/- 4	1% +/- 4
5,00 μM	18% +/- 12	0% +/- 7	6% +/- 5

\* Lectura por duplicado sólo.

Células de cáncer de ovario A2780; estudio en tres días, número de células

Tratamiento	Número de células					
	Día 0	DE	Día 3	DE	Día 6	DE
no tratado	1326000	221873,8	7620500	149315,9	7709500	272843,8
STX 641, 0,5 μM	1326000	221873,8	345084	44136,09	78734,83	12213,5
STX 641®, 0,5 μM	1326000	221873,8	345084	44136,09	88680	5448,237
STX 140, 0,5 μM	1326000	221873,8	679663,3	25472,96	204255,5	24555,12
STX 140®, 0,5 μM	1326000	221873,8	679663,3	25472,96	462869,8	21542,44

# ES 2 339 450 T3

STX 641® y STX 140® significan que se estudiaron respectivamente la reversibilidad de los efectos inducidos por el fármaco de STX 641 y STX140. Para estos estudios, se retiró el fármaco en el día 3, se lavaron las células con PBS y entonces se añadió el medio de cultivo. Estos estudios mostraron que en la mayoría de los casos los efectos de los fármacos no eran reversibles.

5

Estos datos se muestran en la figura 8.

Células de cáncer de próstata PC3; estudio en tres días, número de células

10

Tratamiento	Número de células					
	Día 0	DE	Día 3	DE	Día 6	DE
no tratado	168552,3	24330,94	1402666,7	192756,5	3142111	422890,6
STX641, 0,5 µM	168552,3	24330,94	117351	9470,006	84,191,33	15036,01
STX 641®, 0,5 µM	168552,3	24330,94	117351	9470,006	95845,33	11029,65
STX 140, 0,5 µM	168552,3	24330,94	125218,67	16505,52	100059	10827,65
STX 140®, 0,5 µM	168552,3	24330,94	125218,67	16505,52	197780	3212,232

25 STX 641® y STX 140® significan que se estudiaron respectivamente la reversibilidad de los efectos inducidos por el fármaco de STX 641 y STX140. Para estos estudios, se retiró el fármaco en el día 3, se lavaron las células con PBS y entonces se añadió el medio de cultivo. Estos estudios mostraron que en la mayoría de los casos los efectos de los fármacos no eran reversibles.

30

Estos datos se muestran en la figura 9.

Clonogenicidad en células de cáncer de ovario A2780

35

Tratamiento		% de clonogenicidad (en relación con las células no tratadas)	DE
STX 140	0,25 µM	64,42	1,71
STX 140	1 µM	0,04	0,06
STX 641	0,25 µM	0,24	0,33
STX 641	1 µM	0,00	0,00

45

Estos datos se muestran en la figura 10.

## Inhibición de la polimerización de microtúbulos inducida por taxol

50

Se midió la capacidad de los fármacos para inhibir la polimerización de tubulina inducida por taxol mediante la turbidez a 350 nm. Se incubó tubulina (Cryoskeleton Inc., Denver, CO), a una concentración final de 1 mg/ml, a 32°C en tampón G-PEM [sal de sesquisodio de ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM y GTP 1 mM (pH 6,8)] en presencia de taxol con o sin derivados de estrona [20 µM].

55

La figura 3 muestra la inhibición de la polimerización de tubulina inducida por taxol mediante STX641 y compuestos relacionados. Se piensa que STX641 actúa como agente anti-microtúbulos, es decir, alterando la función de los microtúbulos. Para mostrar esto, se incubó tubulina en presencia de taxol (un compuesto que se sabe que estimula la polimerización de la tubulina). El taxol indujo un ensamblaje de microtúbulos *in vitro* eficaz tal como se refleja en el aumento de la turbidez medida a 350 nm. La adición de STX641, STX 505, STX564 o STX640 a la mezcla de reacción de tubulina y taxol bloqueó eficazmente el ensamblaje de la tubulina detectándose poco aumento en la turbidez. Los resultados muestran que STX641 y compuestos relacionados inhiben la polimerización de la tubulina *in vitro* y que es probable que tales compuestos alteren la dinámica de los microtúbulos *in vivo* (y por tanto el crecimiento tumoral).

65

*Inhibición de la captación de glucosa*

Para medir la inhibición de la captación de glucosa al interior de las células, se sembraron las células en placas de múltiples pocillos de 12 pocillos y se hicieron crecer hasta la confluencia. Se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron durante 15 min. en tampón de incubación que contenía 2-desoxi-D-[1-<sup>3</sup>H] glucosa 1  $\mu$ Ci (NEN-Dupont, RU) por pocillo en presencia o ausencia de posibles inhibidores (0,1-10  $\mu$ M). Se terminó la captación lavando las células en PBS frío (4°C). Se solubilizaron las células en Triton-X en hidróxido de sodio 0,01 M y se procesaron para el recuento de centelleo líquido (Singh *et al.*, Molecular and Cellular Endocrinology, 160: 61-66, 2000).

10

Compuesto	% de inhibición de la captación de glucosa	
	Células MCF-7	Células MDA MB 231
STX 66	37%	32%
STX 68	66%	70%
STX 140	68%	77%
STX 641	28%	60%

La figura 4 muestra la inhibición de la captación de glucosa. Un aumento de la captación de glucosa (como fuente de energía) es un rasgo característico de la mayoría de las células cancerosas. La glucosa se capta al interior de las células mediante varios transportadores de glucosa y un transportador de este tipo (GLUT 1) se sobreexpresa en tejidos de mama malignos. La figura 4 muestra que STX641 (y compuestos relacionados) inhibe la captación de glucosa por células de cáncer de mama MCF-7 (positivas para el receptor de estrógenos, RE+) y MDA-MB-231 (RE-). La inhibición de la captación de glucosa *in vivo* debe inhibir el crecimiento tumoral y éste puede ser un importante mecanismo mediante el cual STX441 y compuestos relacionados actuarán inhibiendo el crecimiento tumoral en pacientes.

*Efectos sobre la formación de túbulos*

Se evaluaron los efectos de los fármacos sobre la formación de túbulos (medidos como un marcador de su potencial anti-angiogénico) utilizando un kit Angiogenesis (TCS-Cellworks Ltd (Bucks, RU)). Para esto, se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en una placa de 24 pocillos dentro de una matriz de fibroblastos diploides humanos de origen dérmico. Se incubaron las células cocultivadas durante todo el experimento a 37°C bajo un 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado. En el día 1, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio que contenía los fármacos en investigación. En los días 4, 7 y 9, se sustituyó el medio por medio nuevo que contenía los fármacos en investigación. En el día 11, se lavaron las células con PBS y etanol al 70% (1 ml) añadidos a cada pocillo durante 30 min. para fijar las células. Tras la fijación, se lavaron las células con tampón de bloqueo (1 ml de PBS + 1% de albúmina sérica bovina, Sigma, RU) y se tiñeron o bien con factor de von Willebrand o bien con CD31. Se cuantificó el grado de formación de túbulos mediante puntuación manual o mediante análisis por ordenador. Se capturaron imágenes utilizando una cámara digital Kodak DC120 digital camera. Además, también se registraron detalles de cambios en la formación de túbulos inducidos por los fármacos mediante exploración de alta definición de las placas presentándose algunas de las exploraciones como imágenes procesadas por Photoshop.

La mayoría de los tumores sólidos sólo pueden crecer más allá de 1-2 mm de tamaño si desarrollan una red de vasos sanguíneos de modo que puedan obtener nutrientes esenciales para sustentar su crecimiento (un proceso conocido como angiogénesis). Por tanto, los fármacos que bloquean este proceso angiogénico deben inhibir el crecimiento de una amplia gama de tumores sólidos.

En este ensayo, se examinó la capacidad de STX641 (y compuestos relacionados) para actuar como un inhibidor de la angiogénesis utilizando un cocultivo de células HUVEC y fibroblastos dérmicos. En este sistema, las células endoteliales forman inicialmente pequeñas islas dentro de la matriz de fibroblastos. Posteriormente proliferan y entran en una fase migratoria durante la cual se mueven a través de la matriz formando estructuras de túbulos similares a hebras. Éstas coalescen formando una red de túbulos anastomosantes. Se muestran figuras representativas que muestran los efectos de STX641 sobre la formación de túbulos en las figuras 5 y 6. En la figura 5, para cocultivos no tratados (control) de células HUVEC y fibroblastos dérmicos, puede observarse claramente la naturaleza similar a una hebra de la extensa red de túbulos. En cambio, para células cocultivadas tratadas con STX641 (0,1  $\mu$ M), los túbulos se han destruido completamente, lo que muestra que este fármaco presenta potentes propiedades antiangiogénicas. En la figura 6, se han registrado las placas mediante exploración de alta definición y también se han procesado para dar imágenes pixeladas. De nuevo, pueden observarse claramente los túbulos similares a hebras para los cocultivos no tratados (control) mientras que STX641 (y STX140) a 0,05  $\mu$ M suprimieron completamente la formación de túbulos.

## ES 2 339 450 T3

Puede cuantificarse el grado de inhibición de la formación de túbulos mediante análisis por ordenador (figura 7). Tal como se muestra, STX641, STX564 y STX639 a 0,05  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M inhibieron completamente la formación de túbulos confirmando el potencial antiangiogénico de estos compuestos.

### 5 Inhibición de la formación de microvasos

Compuesto de prueba	Conc.	Área de campo	N.º de uniones	N.º de túbulos	Longitud de túbulos total	Longitud de túbulos media
Control			701290	29	150	20601,79
			695889	28	118	18467,03
			694610	20	138	21041,03
Control		VEGF 2 ng/ml	785729	120	312	37507,58
			762576	68	230	34816,21
			763322	93	246	35338,12
STX 140	40 nM	VEGF 2 ng/ml	627527	8	37	3064,85
			619251	5	40	3851,64
			638786	14	45	3619,74
	20 nM	VEGF 2 ng/ml	749415	25	115	13509,76
			687717	22	94	10489,22
			674918	26	92	8191,48
STX 641	20 nM	VEGF 2 ng/ml	593238	1	5	248,31
			605489	4	14	505,5
			582954	3	13	474,05
	40 nM	VEGF 2 ng/ml	588528	3	6	99,77
			597370	4	7	244,17
			591356	3	5	83,7
STX 564	20 nM	VEGF 2 ng/ml	661539	3	24	2152,74
			647067	2	14	1047,45
			686243	2	15	1182,8
	40 nM	VEGF 2 ng/ml	625377	0	7	497,27
			620605	4	7	431,5
			628052	2	9	565,8

En cada caso, la calibración fue de 1,0 píxeles y el área de la imagen fue de 3211216. VEGF es el factor de crecimiento endotelial vascular.

60 Estos datos se presentan en la figura 11.

### Detención del ciclo celular y apoptosis

### 65 Células de cáncer de mama MCF-7

Se realizó el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en poblaciones confluentes al 40% de células MCF-7 con 500 nM de compuesto.

## ES 2 339 450 T3

A las 8 h, STX 140, STX 640 y STX 641 indujeron una detención en G2/M significativa en comparación con el control (del 16% al 27%).

5 Tras 24 h de exposición a STX 641, el 68% de las células estaban detenidas en G2/M en comparación con el control (28%), STX 140 (28%) y STX 640 (18%). Este aumento en la población de células en G2/M venía acompañado por una disminución en las poblaciones en fase G1 y S (del 37% al 15%, y del 30% al 9% respectivamente). En células tratadas con STX 140, se observó un aumento significativo en la población sub-G1, indicativa normalmente de apoptosis (el 36%, en comparación con el 2% en células control).

10 Tras 48 h, las células tratadas con STX 641 todavía estaban detenidas en G2/M sin aumento significativo en la población sub-G1 apoptótica. Las células tratadas con STX 140 continuaron mostrando una población creciente de células sub-G1.

### *Células de cáncer de ovario A2780*

15 La figura 12 muestra el efecto de STX 641 a una concentración de 1  $\mu$ M sobre células de cáncer de ovario A2780, mostrando una detención en G2/M inducida por STX 641 tras 24 horas (gráficas izquierda y derecha). Las gráficas de la derecha muestran los resultados del análisis FACs para células teñidas con el anticuerpo frente a anexina V. Para los controles, no hay expresión en la superficie celular tal como se indica por la falta de un pico en la región M2. En 20 cambio, las células tratadas con STX 641 mostraron un marcado aumento en la tinción para este marcador apoptótico, tal como se indica por el aumento en la región M2, que muestra que el compuesto induce la apoptosis.

### *Modelo de ratón desnudo con xenoinjerto*

25 Modelo de ratón desnudo con cáncer de mama MCF-7

Se inyectaron a ratones desnudos (*nu/nu*) ICRF hembra adultos  $10 \times 10^6$  células MCF-7/0,1 ml de Matrigel por vía subcutánea y se monitorizó semanalmente el crecimiento tumoral. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 100-150  $\text{mm}^3$ , se dividieron los ratones en los siguientes grupos:

30 A: Control 0,1 ml de vehículo por vía oral 5 veces por semana durante un periodo de 3 semanas

B: STX 140 20 mg/kg por vía oral 5 veces por semana durante un periodo de 3 semanas

35 C: STX 641 20 mg/kg por vía oral 5 veces por semana durante un periodo de 3 semanas

Se inyectaron a los ratones por vía intravenosa 0,1 ml de disolución de FITC-dextrano 25 mg/ml 20 minutos antes de sacrificarlos para permitir la visualización y cuantificación de la angiogénesis tumoral.

40 Los resultados de este estudio se muestran en las siguientes figuras.

La figura 13 muestra el efecto de STX 140 y STX 641 (20 mg/kg por vía oral) sobre el crecimiento de tumores de células de cáncer de mama MCF-7 en ratones desnudos ICRF.

45 STX 140 dio como resultado un 59% de regresión tumoral y STX 641 dio un 25% de regresión tumoral a lo largo del periodo de dosificación de 3 semanas.

La figura 14 muestra fotografías fluorescentes que muestran los efectos del tratamiento con STX 140 y STX 641 (20 mg/kg por vía oral) sobre la vasculatura del tumor.

50 La obtención de imágenes de FITC de tumores reveló que los controles presentaban una vasculatura estructurada bien definida, mientras que en animales tratados con STX 140 y STX 641 la vasculatura del tumor estaba alterada y mal definida.

55 La figura 15 muestra el efecto de STX-140 y STX641 (20 mg/kg) sobre la angiogénesis tumoral en tumores de mama MCF-7.

La cuantificación mediante FITC de la angiogénesis tumoral mostró que tanto STX 140 como STX 641 producían una inhibición significativa del 40% y el 60% de la angiogénesis tumoral respectivamente.

60 La figura 16 muestra el efecto de STX 140 y 641 (20 mg/kg por vía oral) sobre la actividad sulfatasa tumoral y hepática en ratones desnudos.

La actividad sulfatasa hepática se inhibió casi completamente tanto mediante STX 140 como STX 641.

65 La figura 17 muestra el efecto de STX 140 y 641 (20 mg/kg por vía oral) sobre el peso de ratones desnudos tratados durante 3 semanas.

## ES 2 339 450 T3

5 No se observó pérdida de peso a lo largo del periodo de dosificación en ninguno de los grupos.

### 10 Anhidrasa carbónica

15	Compuesto	Cl <sub>50</sub> de CA2
10	Acetazolamida	25 nM
	STX 140	400 nM
	STX 641	1 μM
	2-Metoxiestradiol	sin inhibición detectable

15 Las actividades inhibidoras de CA2 y CA9 están relacionadas (Vullo 2003, *BioOrg. Med. Chem.*).

20 Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan a la presente memoria como referencia.

25 20 Diversas modificaciones y variaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse, por ello, del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a formas de realización preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse de manera indebida a dichas formas de realización específicas. De hecho, se prevé que diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en química, biología o campos relacionados estén comprendidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

30

35

40

45

50

55

60

65

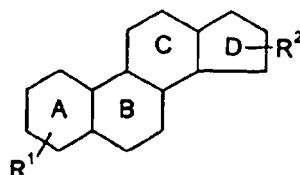
## REIVINDICACIONES

## 1. Compuesto de fórmula I

5

10

15

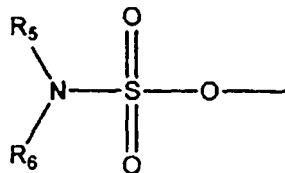


Fórmula I

en la que  $R^1$  es un grupo opcional seleccionado de uno de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato de fórmula

20

25



30

en la que  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan independientemente de entre H o un grupo hidrocarbilo, un grupo fosfonato de fórmula  $(R^{18})-P(O)(OH)-O-$ , en la que  $R^{18}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero, un grupo tiofosfonato de fórmula  $(R^{19})-P(S)(OH)-O-$ , en la que  $R^{19}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero, un grupo sulfonato de fórmula  $(R^{20})-S(O)(O)-O-$ , en la que  $R^{20}$  es H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, acilo o arilo, o combinaciones de los mismos, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero, o un grupo sulfonamida;

en la que el anillo D está sustituido por un grupo  $R^2$  de fórmula  $-L-R^3$ , en la que L es un grupo conector hidrocarbilo opcional y  $R^3$  es o comprende un grupo nitrilo;

en la que el anillo A está sustituido en la posición 2 ó 4 con un grupo  $R^4$ , en la que  $R^4$  es un grupo hidrocarbilo; y

en la que por lo menos uno de los grupos cíclicos de la estructura de anillo esteroideo es un anillo de arilo.

50 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto puede tener uno o más de otros sustituyentes seleccionados de entre: uno o más grupos sulfamato, uno o más grupos fosfonato, uno o más grupos tiofosfonato, uno o más grupos sulfonato, uno o más grupos sulfonamida, uno o más grupos halo, uno o más grupos O, uno o más grupos hidroxilo, uno o más grupos amino, uno o más grupos que contienen azufre y uno o más grupos hidrocarbilo.

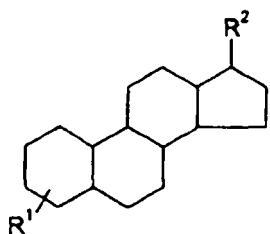
55 3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el sistema de anillos ABCD puede contener uno o más hidroxilo, alquilo inferior ( $C_1-C_6$ ), alcoxilo inferior ( $C_1-C_6$ ), alquinilo o halógenos.

60 4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que el sistema de anillos ABCD puede contener uno o más sustituyentes de hidroxilo; alquilo inferior ( $C_1-C_6$ ) seleccionado de entre metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros de pentilo, y n-hexilo y otros isómeros de hexilo; alcoxilo inferior ( $C_1-C_6$ ) seleccionado de entre metoxilo, etoxilo y propoxilo; etinilo; o flúor.

65

5. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula II

5 **Fórmula II**

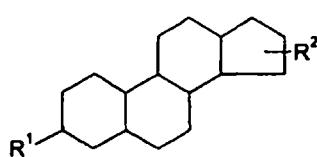


10

15 en la que R<sup>1</sup> es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida y R<sup>2</sup> es tal como se definió en la reivindicación 1.

20 6. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula III

25 **Fórmula III**



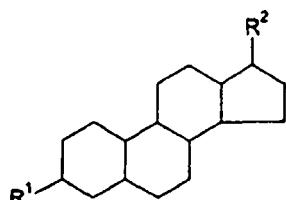
30

en la que R<sup>1</sup> es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida y R<sup>2</sup> es tal como se definió en la reivindicación 1.

35

7. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula IV

40 **Fórmula IV**



45

50 en la que R<sup>1</sup> es un grupo opcional seleccionado de entre cualquiera de -OH, un grupo sulfamato, un grupo fosfonato, un grupo tiofosfonato, un grupo sulfonato o un grupo sulfonamida y R<sup>2</sup> es tal como se definió en la reivindicación 1.

55 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>4</sup> es un grupo oxihidrocarbilo.

9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que R<sup>4</sup> es un grupo alcoxilo.

10. Compuesto según la reivindicación 9, en el que R<sup>4</sup> es metoxilo.

60 11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R<sup>4</sup> es un grupo hidrocábulo.

12. Compuesto según la reivindicación 11, en el que R<sup>4</sup> es un grupo alquilo.

65 13. Compuesto según la reivindicación 12, en el que R<sup>4</sup> es etilo.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>4</sup> está en la posición 2 del anillo A.

ES 2 339 450 T3

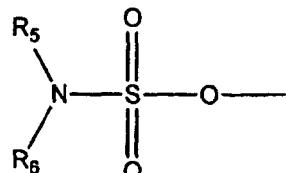
15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cuando el anillo A está sustituido con  $R^1$  y  $R^4$ ,  $R^4$  está orto-sustituido con respecto a  $R^1$ .

16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que está presente  $R^1$ .

5 17. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $R^1$  es -OH o un grupo sulfamato.

18. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $R^1$  es -OH.

10 19. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que  $R^1$  es un grupo sulfamato de fórmula



en la que  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan independientemente de entre H, alquilo, cicloalquilo, alquenilo y arilo, o combinaciones de los mismos, o juntos representan alquieno, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alquenilo o arilo contiene opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos hetero.

- 30 20. Compuesto según la reivindicación 19, en el que por lo menos uno de entre  $R^5$  y  $R^6$  es H.

21. Compuesto según la reivindicación 20, en el que cada uno de entre  $R^5$  y  $R^6$  es H.

22. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $R^3$  es un grupo de fórmula



35 en la que  $n$  es 0 ó 1,  $p$  es un número entero:

$R^7$  se selecciona de entre  $=CH-$ ,  $-O-$  y  $NR^{13}$ ;

40 R<sup>8</sup> es -C≡N.

$R^{13}$  se selecciona de entre H e hidrocarbilo:

y  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo.

23. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $R^3$  es un grupo de fórmula  $-(CR^{14}R^{15})_p$ ,  $R^8$ ,  $p$  es un número entero;  $R^8$  es  $-C\equiv N$ ;  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo.

50 24. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que  $R^3$  es un grupo de fórmula  $-(CH_2)_p$ ,  $R^3$  no es un número entero;  $R^8$  es  $C_6N$ .

55 25. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que  $R^3$  es un grupo de fórmula  $-(R^7)_nR^8$ , en la que  $n$  es 0 ó 1,  $R^7$  se selecciona de entre  $-\text{CH}_2-\text{O}-$  y  $-\text{N}^{\text{H}^+}(\text{R}^{\text{H}^+})^2$ ;  $R^8$  es  $-\text{C}=\text{N}-$ ;  $\text{R}^{\text{H}^+}$  se selecciona de entre H o hidrocarbilo.

26. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en el que  $n$  es desde 0 hasta 5.

27. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que n es 1

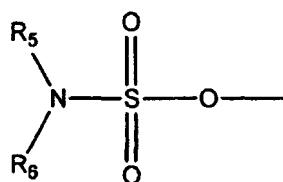
60 28. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, en el que  $R^{13}$  se selecciona de entre H y alquilo

29. Comuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en el que R<sup>13</sup> es -H.

30. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en el que  $R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo.

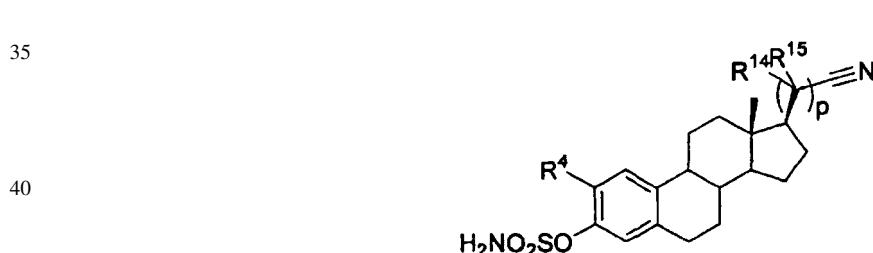
ES 2 339 450 T3

31. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>3</sup> es un grupo seleccionado de entre -CH<sub>2</sub>C≡N y =CHC≡N.
- 5 32. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L es un grupo hidrocarbilo.
33. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L es un grupo hidrocarburo.
- 10 34. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L es un grupo alquileno.
35. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L es un alquileno C<sub>1-10</sub>.
- 15 36. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que R<sup>2</sup> es de fórmula -R<sup>3</sup>.
37. Compuesto según la reivindicación 36, en el que R<sup>2</sup> es un grupo seleccionado de entre -CH<sub>2</sub>C≡N y =CHC≡N.
- 15 38. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



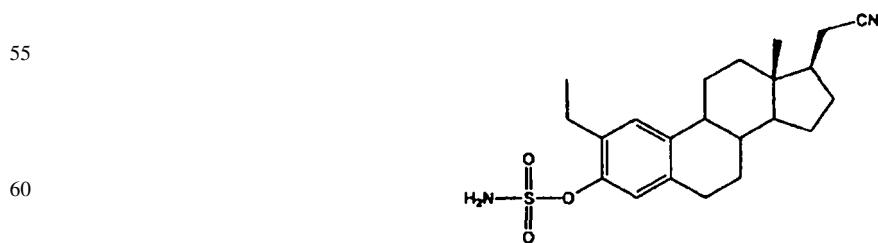
en la que R<sup>4</sup> es un grupo hidrocarbilo y R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre H e hidrocarbilo y p es un número entero.

- 30 39. Compuesto según la reivindicación 38 de fórmula:

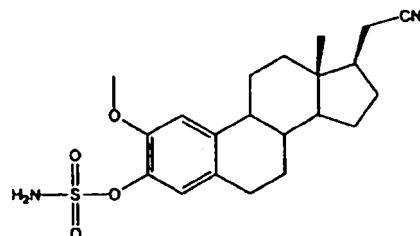


45 en la que R<sup>4</sup> es un grupo oxihidrocarburo o un grupo hidrocarburo y R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre H y alquilo C<sub>1-10</sub> y p es un número entero desde 0 hasta 5.

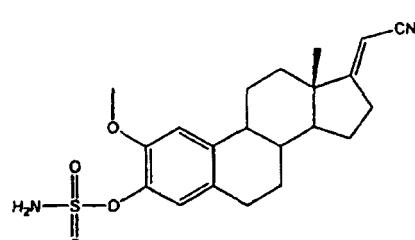
- 50 40. Compuesto según la reivindicación 39, en el que R<sup>4</sup> es un alcoxilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) o un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).
41. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es



42. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es



43. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es



#### 44. Composición que comprende

- i) un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y
  - ii) un modificador de la respuesta biológica seleccionado de entre un/una o más citocinas, moduladores inmunitarios, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimulantes de colonias, factores quimiotácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de superficie celular, ligandos, moléculas de adhesión de leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de la matriz extracelular y fibronectina.

45. Composición según la reivindicación 44, en la que el modificador de la respuesta biológica es una citocina.

46. Composición según la reivindicación 45, en la que la citocina es un factor de necrosis tumoral (TNF).

47. Composición según la reivindicación 46, en la que el TNF es TNF $\alpha$ .

#### 48. Composición farmacéutica, que comprende

- (a) (i) un compuesto tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o  
(ii) una composición tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, y  
(b) un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

49. (i) Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) composición según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, para su utilización en medicina.

50. Utilización de (i) un compuesto tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento destinado a prevenir y/o a inhibir el crecimiento tumoral.

60 51. Utilización de (i) un compuesto tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una  
composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento  
para su utilización en la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de entre actividad esteroide  
sulfatasa (STS); ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral;  
formación de microtúbulos; y apoptosis.

52. Utilización de (i) un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento para su utilización en

## ES 2 339 450 T3

la terapia de una enfermedad o un estado asociado con uno o más de entre actividad esteroide sulfatasa (STS) adversa; ciclo celular; apoptosis; crecimiento celular; captación de glucosa por un tumor; angiogénesis tumoral; formación de microtúbulos; y apoptosis.

5        53. Utilización de (i) un compuesto tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento para uno o más de entre inhibir la actividad esteroide sulfatasa (STS); modular el ciclo celular; modular la apoptosis; modular el crecimiento celular; prevenir y/o suprimir la captación de glucosa por un tumor; prevenir y/o inhibir la angiogénesis tumoral; alterar los microtúbulos; e inducir la apoptosis.

10       54. Utilización de (i) un compuesto tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento destinado a inhibir la actividad esteroide sulfatasa (STS).

15       55. Utilización de (i) un compuesto tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, o (ii) una composición tal como se definió según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en la fabricación de un medicamento destinado a modular el crecimiento celular.

20

25

30

35

40

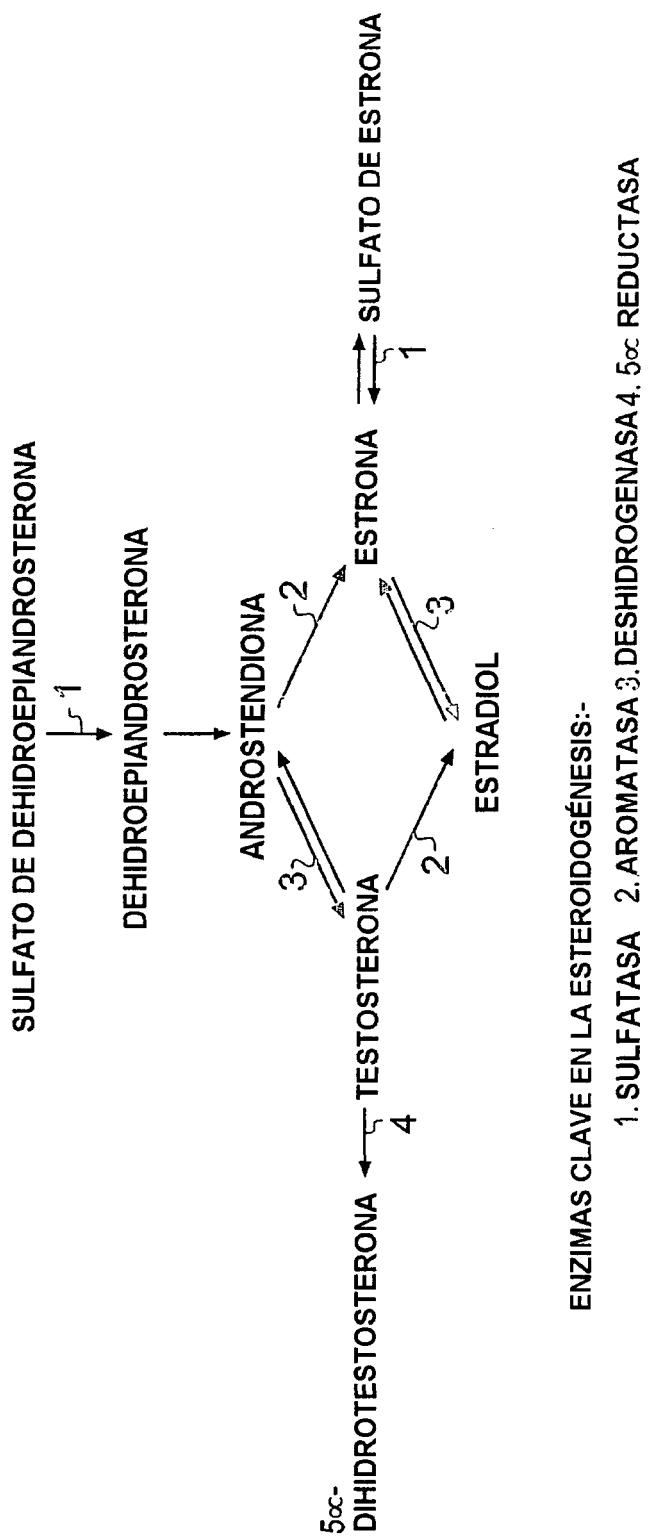
45

50

55

60

65

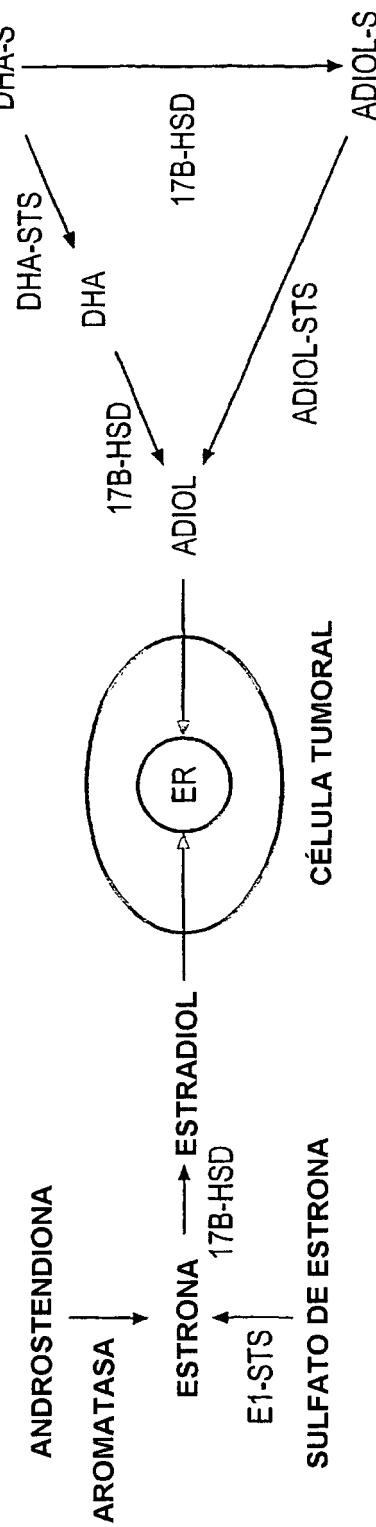


ENZIMAS CLAVE EN LA ESTEROIDOGÉNESIS:-

1. SULFATASA 2. AROMATASA 3. DESHIDROGENASA 4. 5 $\alpha$  REDUCTASA

Fig. 1

## ORIGEN DE LOS ESTEROIDES ESTROGÉNICOS EN MUJERES POSMENOPÁUSICAS



ER= RECEPTOR DE ESTRÓGENOS, DHA / -S=SULFATO DE DEHIDROPIANDROSTERONA,  
 ADIOL= ANDROSTENDIOL, E1-STS= ESTRONA SULFATASA, DHA-STS= DHA-SULFATASA, ADIOL-STS=SULFATASA , 17B-HSD= ESTRADIOL 17B-HIDROXESTEROIDE DESHIDROGENASA

Fig. 2

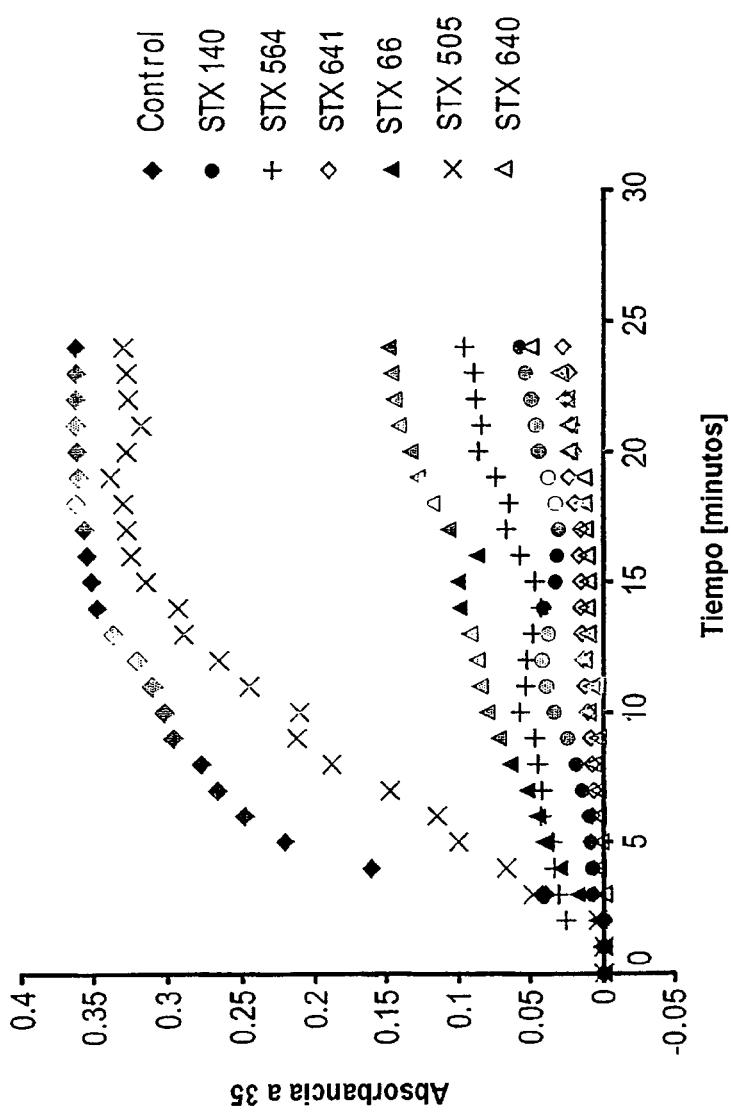
Efecto de derivados de E2 2-sustituidos [20  $\mu$ M] sobre la polimerización de la tubulina inducida por taxol

Fig. 3

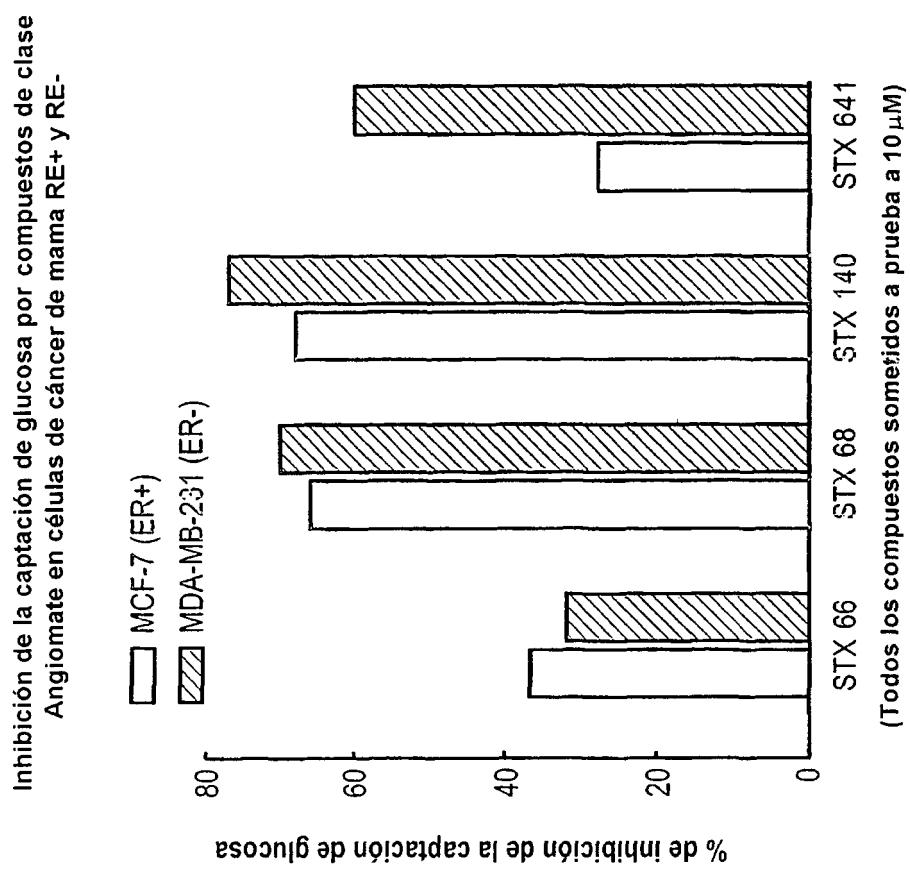


Fig. 4

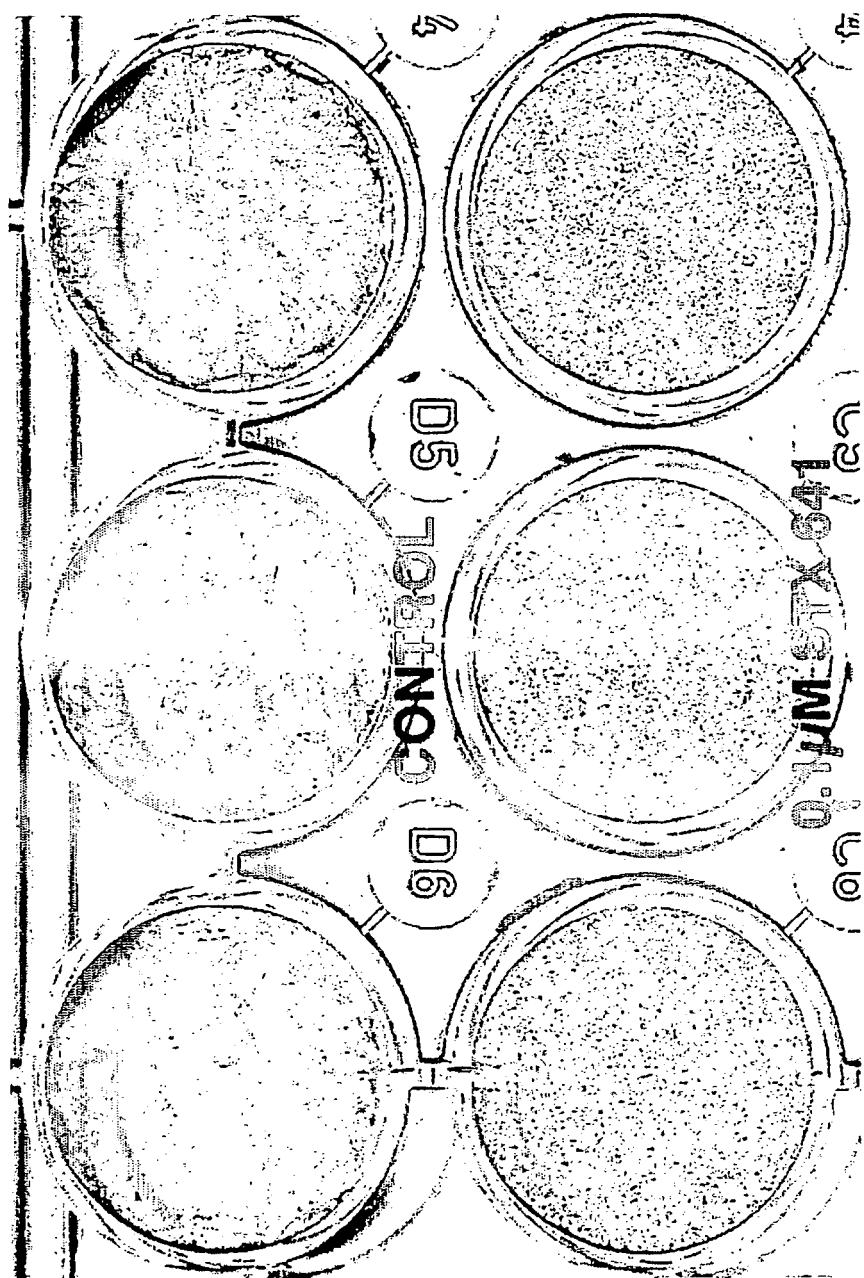
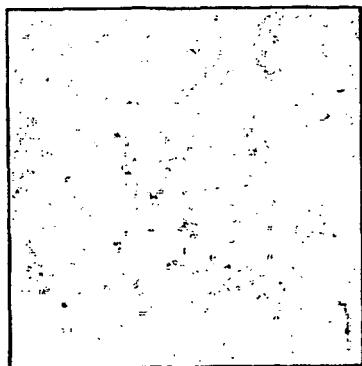
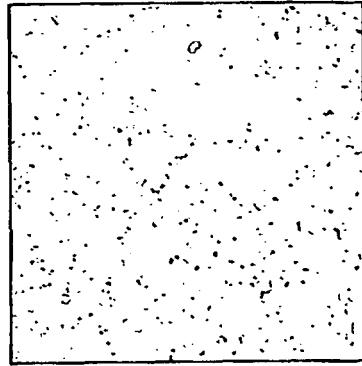


Fig. 5

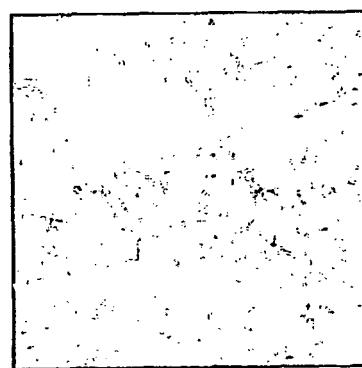
ES 2 339 450 T3



0.05 $\mu$ M STX641



0.05 $\mu$ M STX140



Control

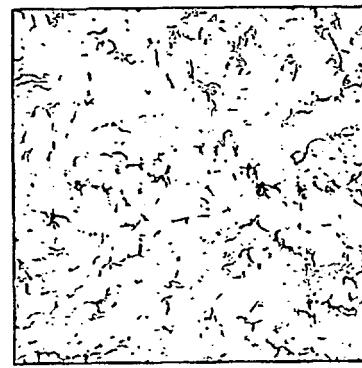
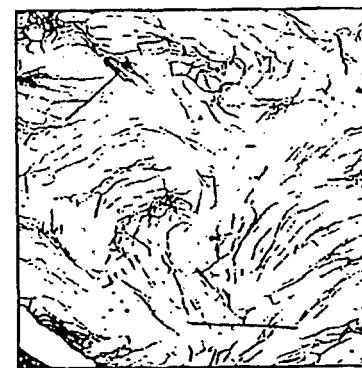
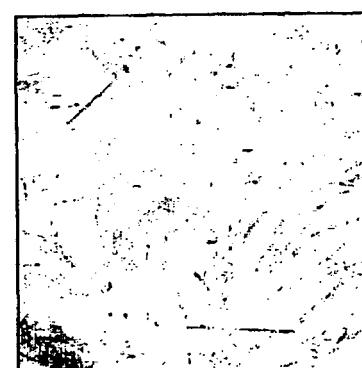


Fig. 6



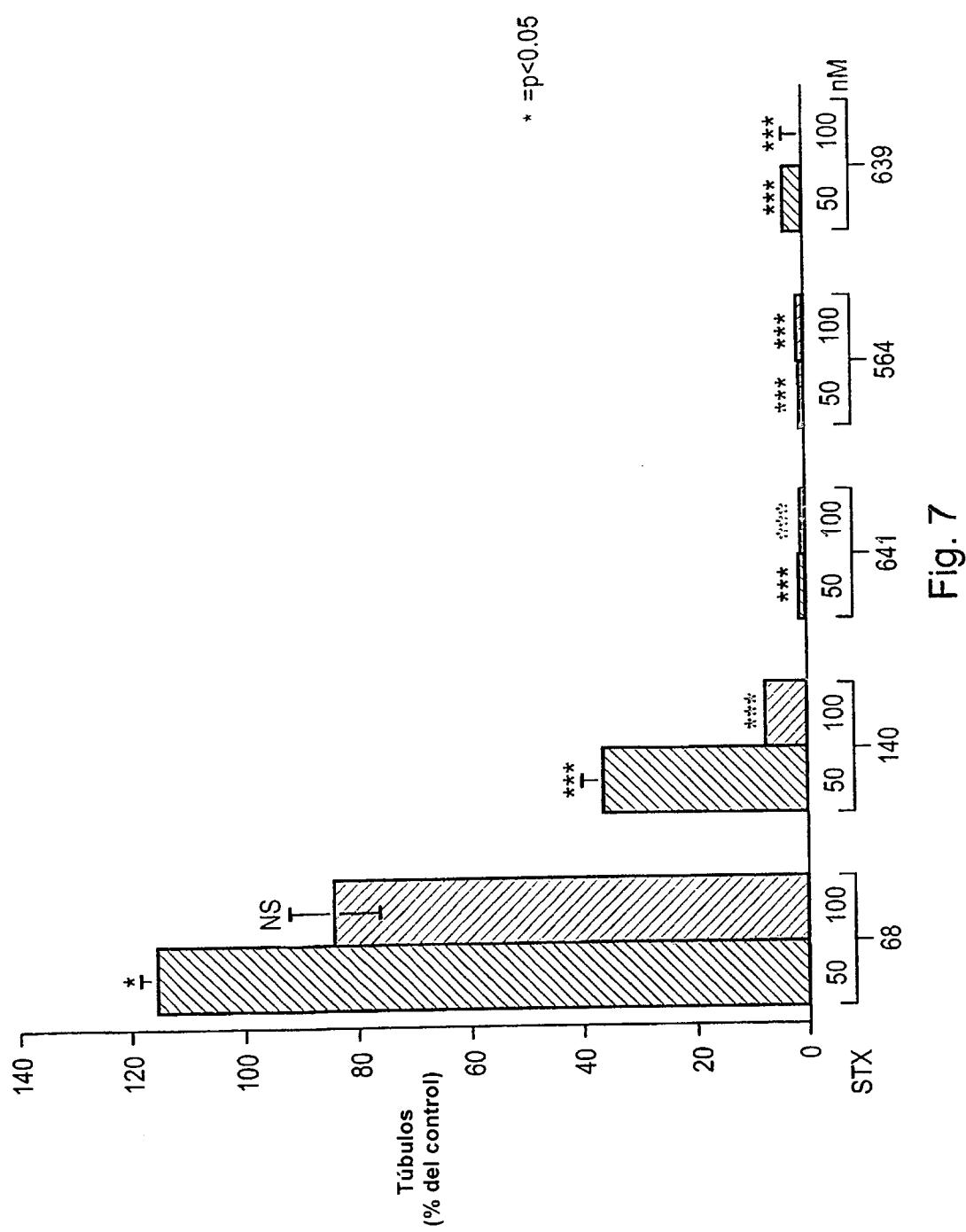


Fig. 7

# ES 2 339 450 T3

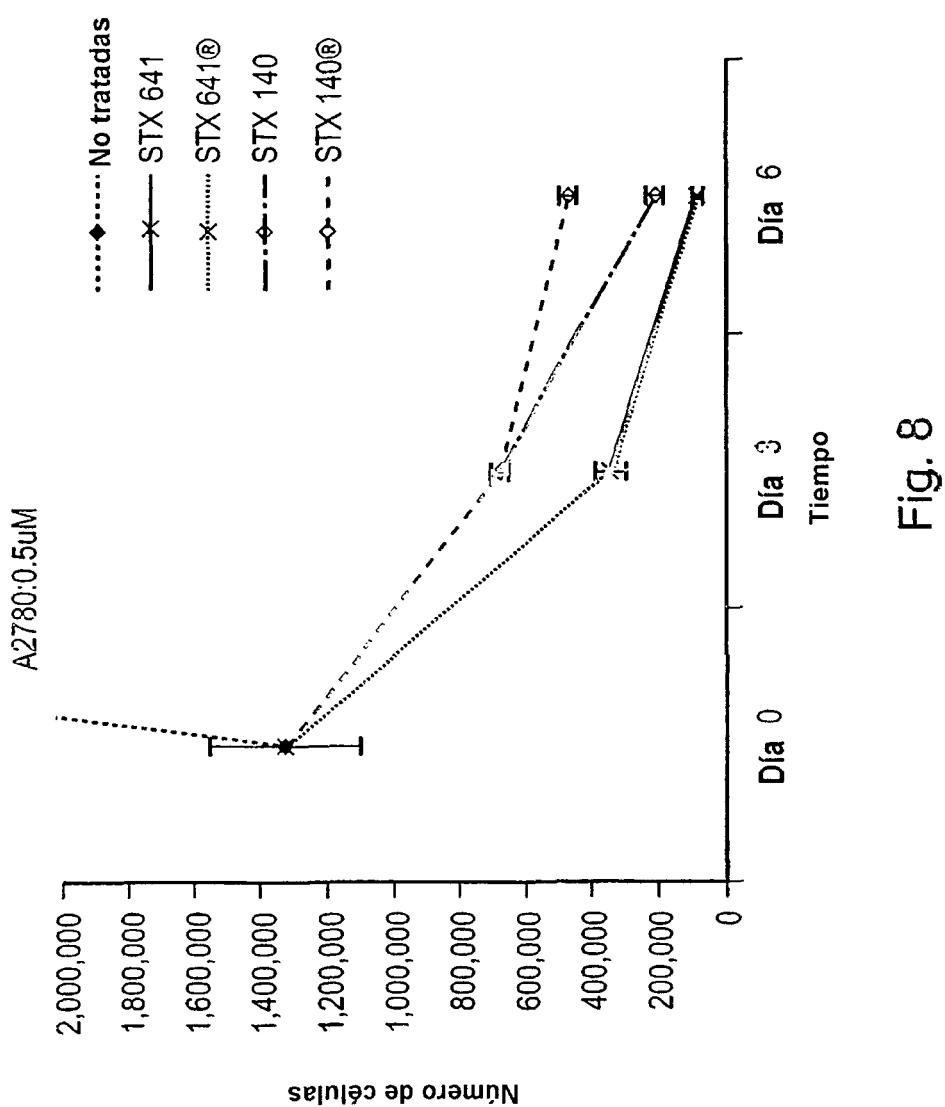


Fig. 8

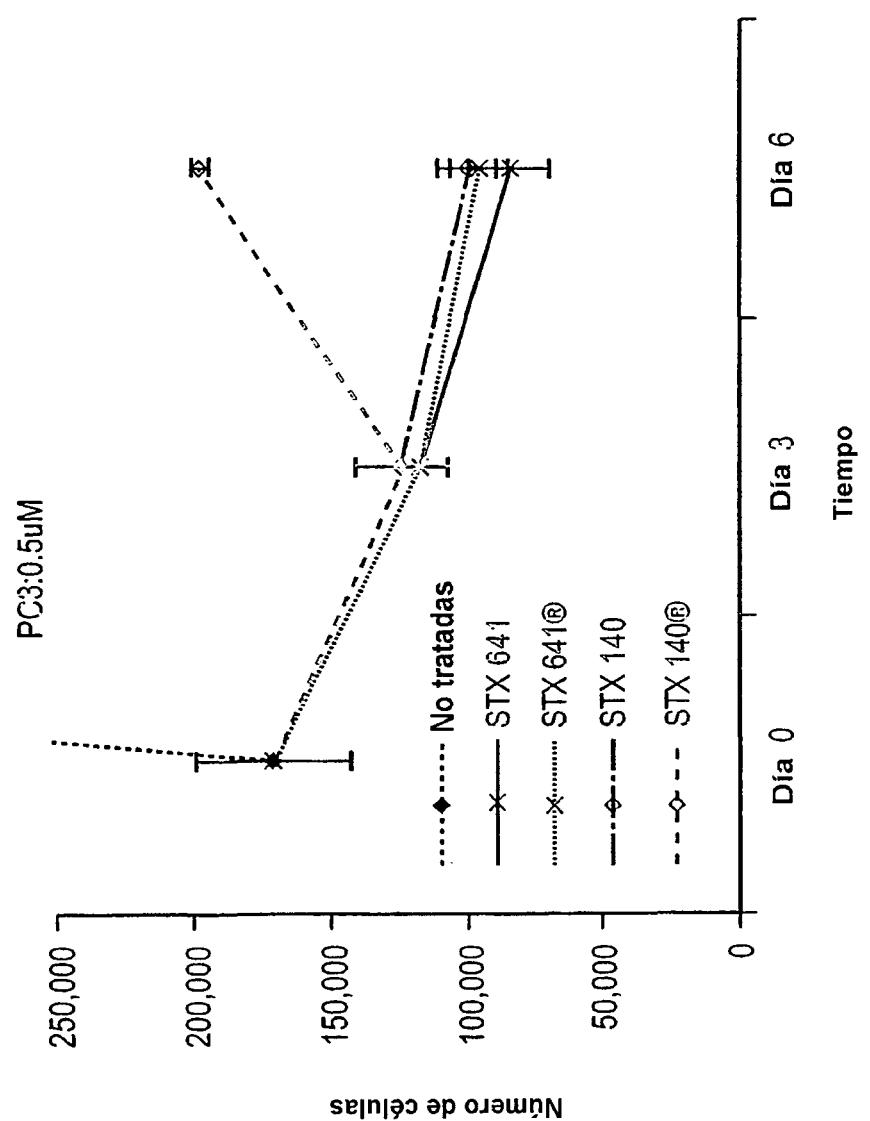


Fig. 9

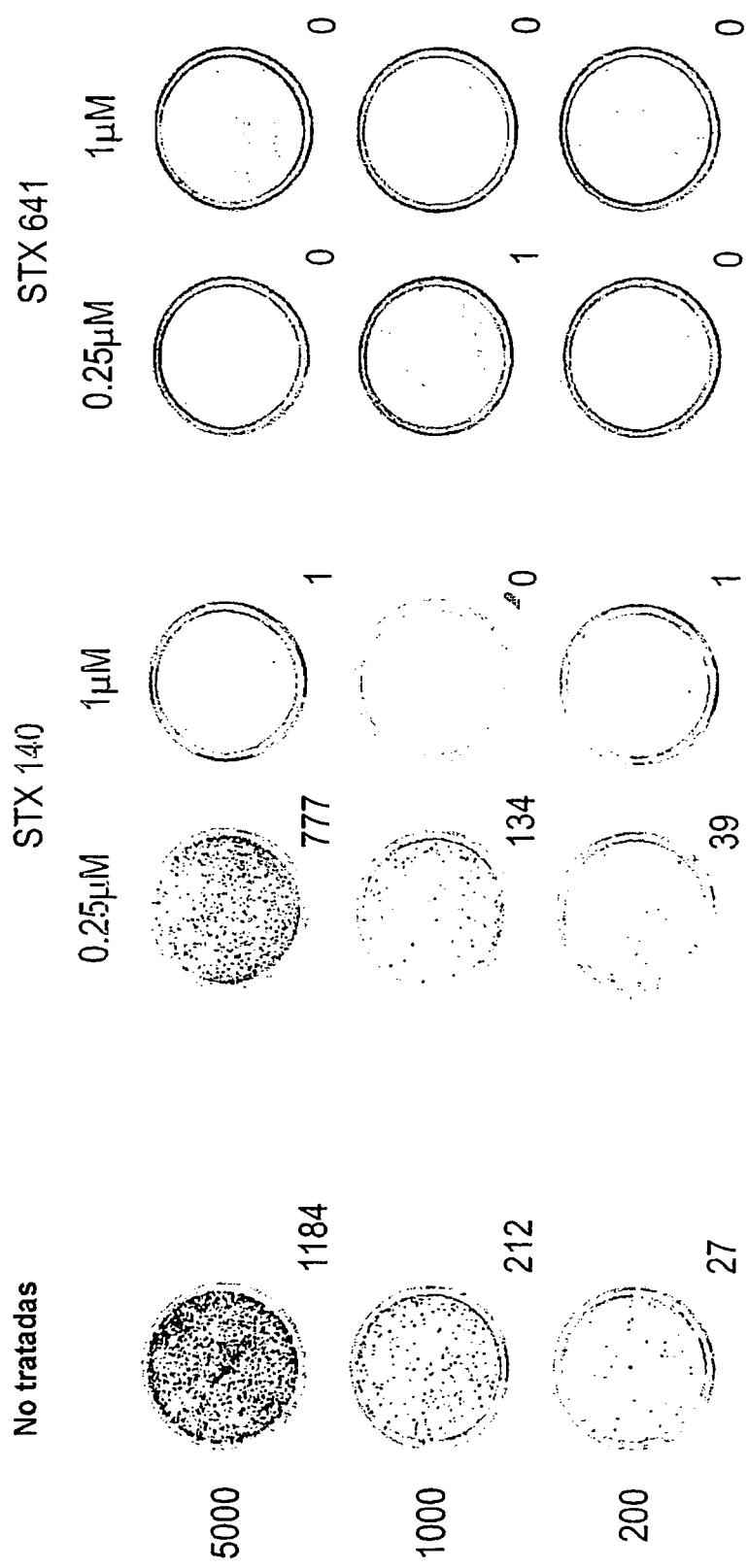


Fig. 10

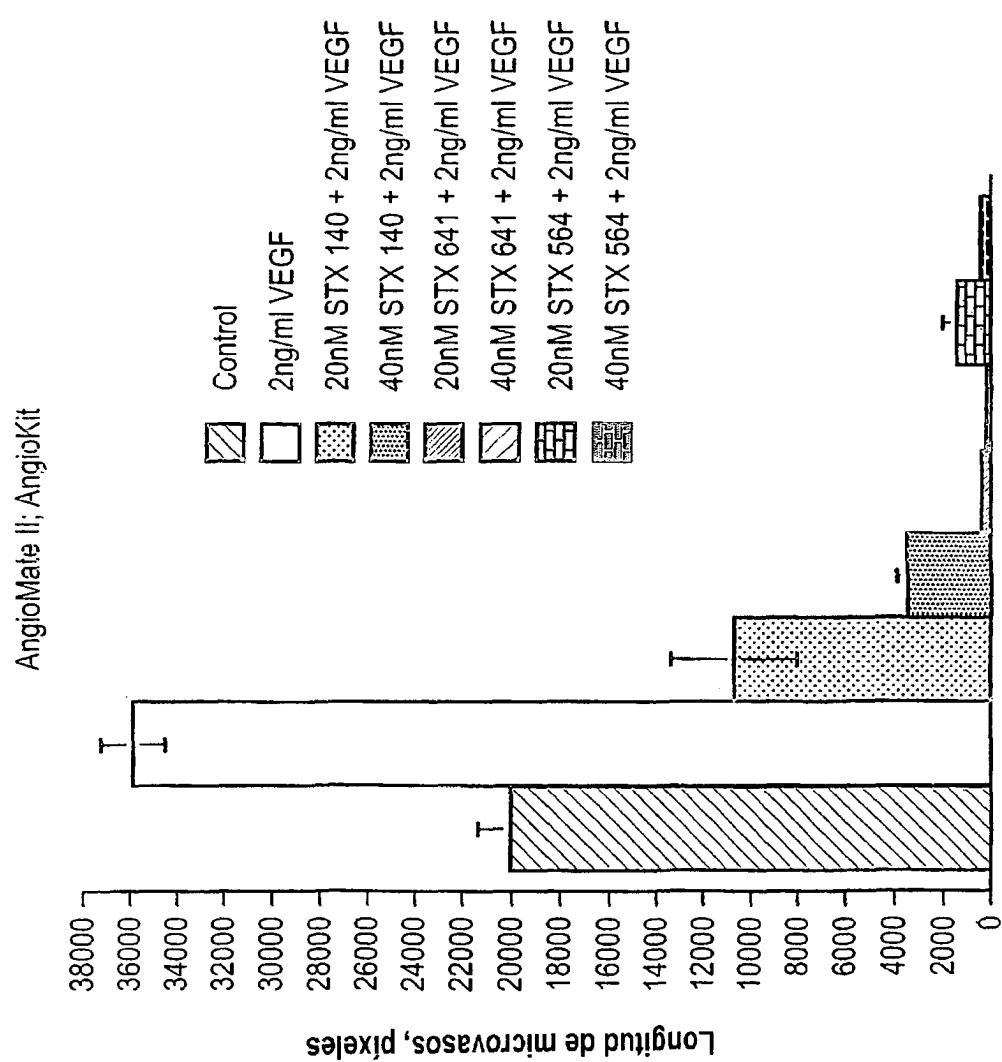


Fig. 11

# ES 2 339 450 T3

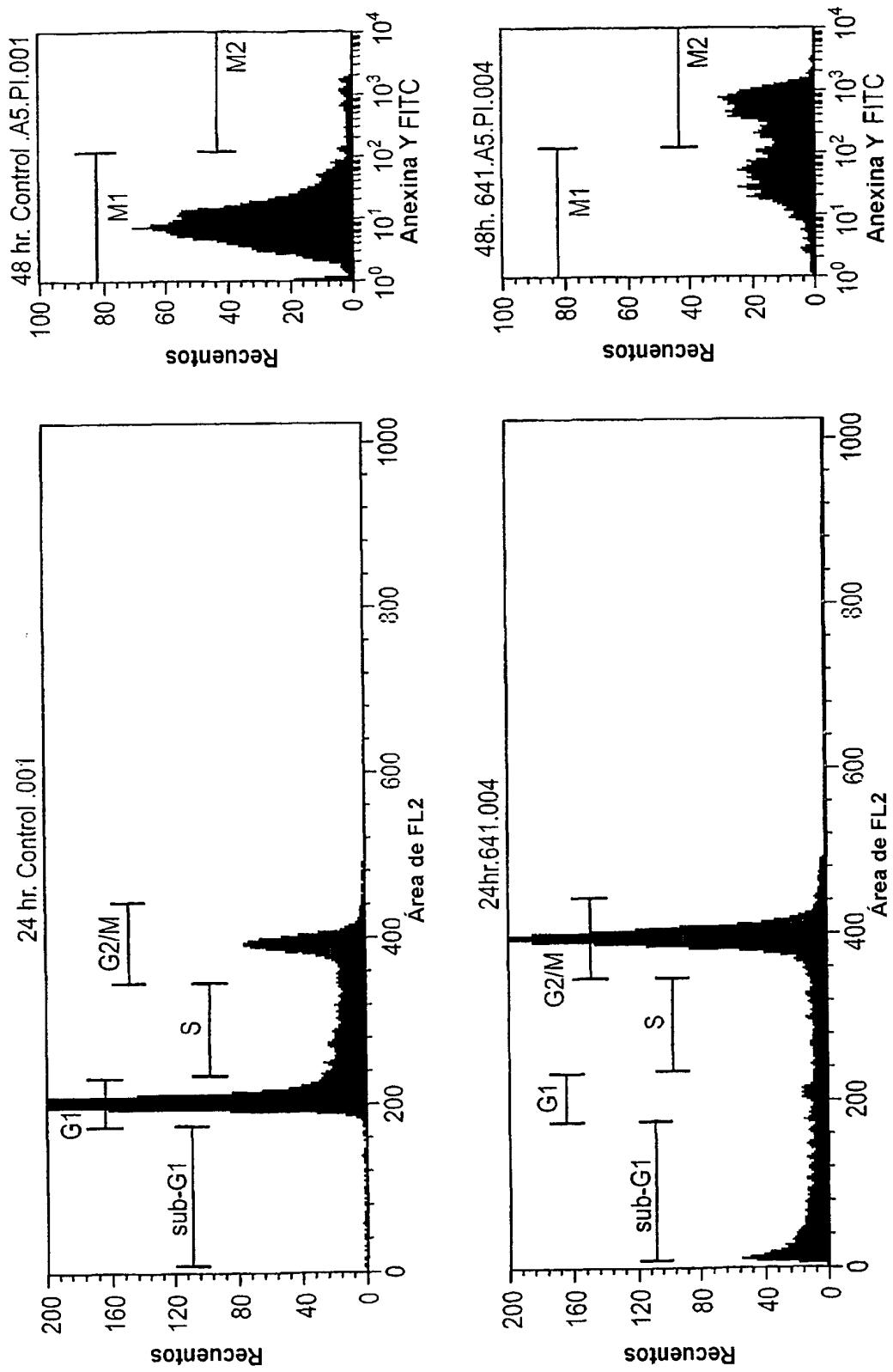


Fig. 12

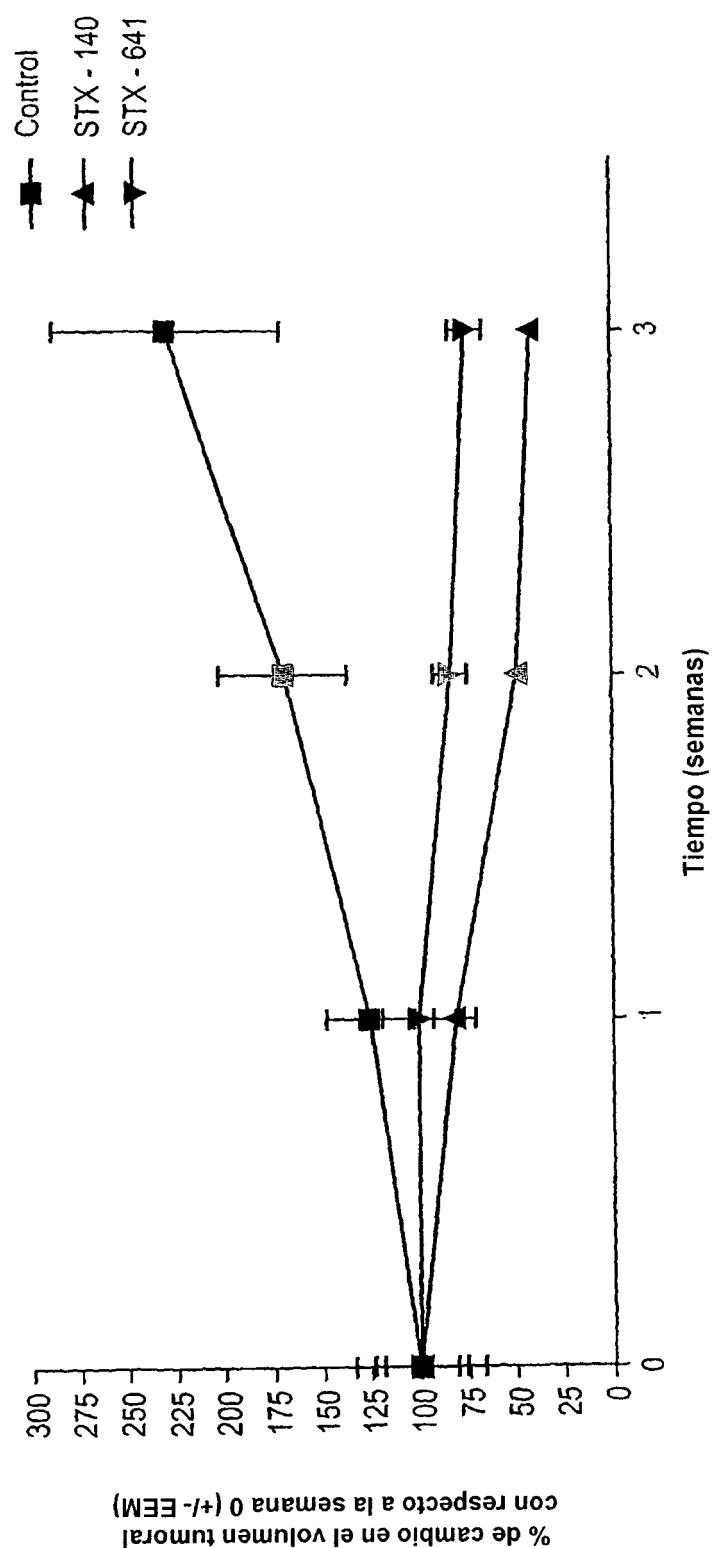


Fig. 13



STX 641

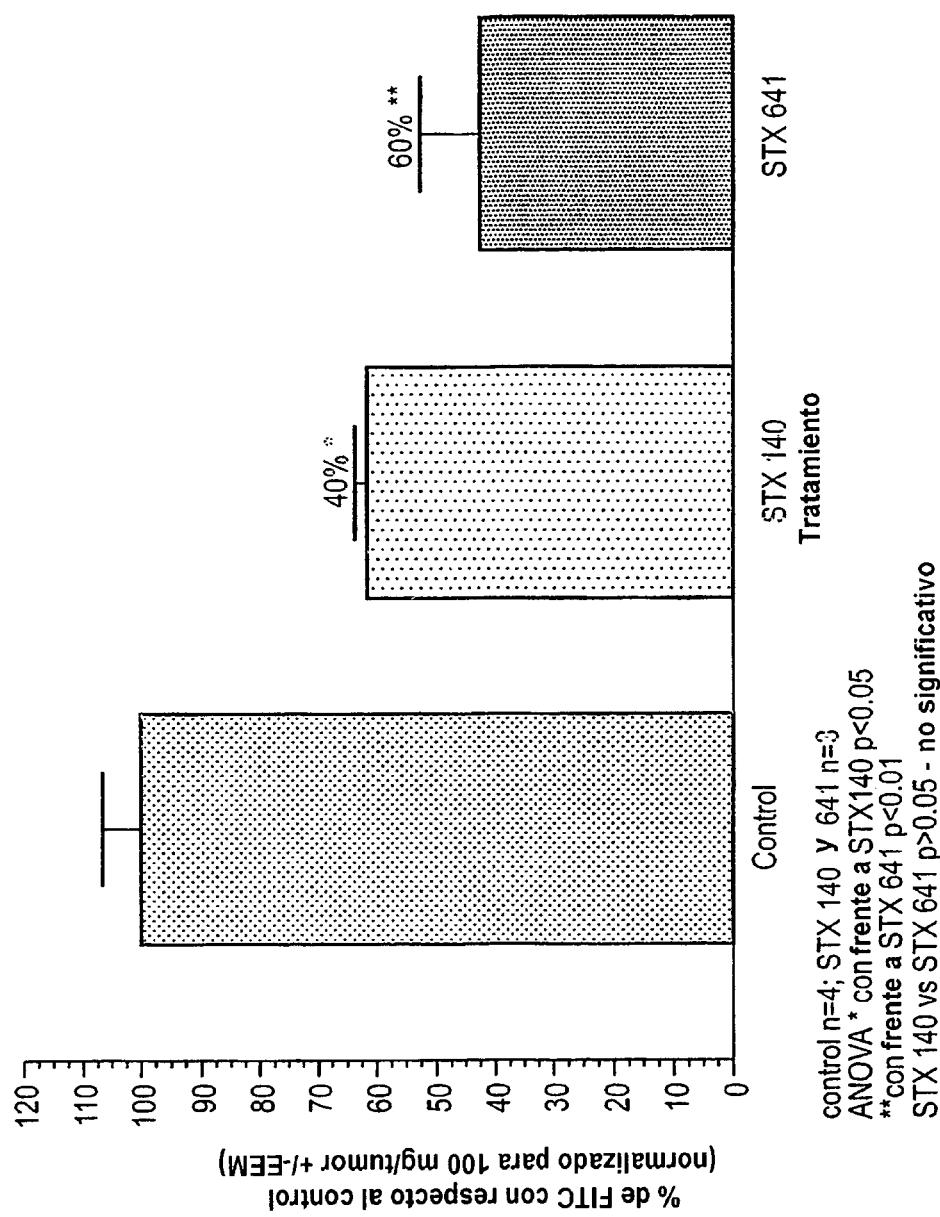


STX 140



Control

Fig. 14



ES 2 339 450 T3

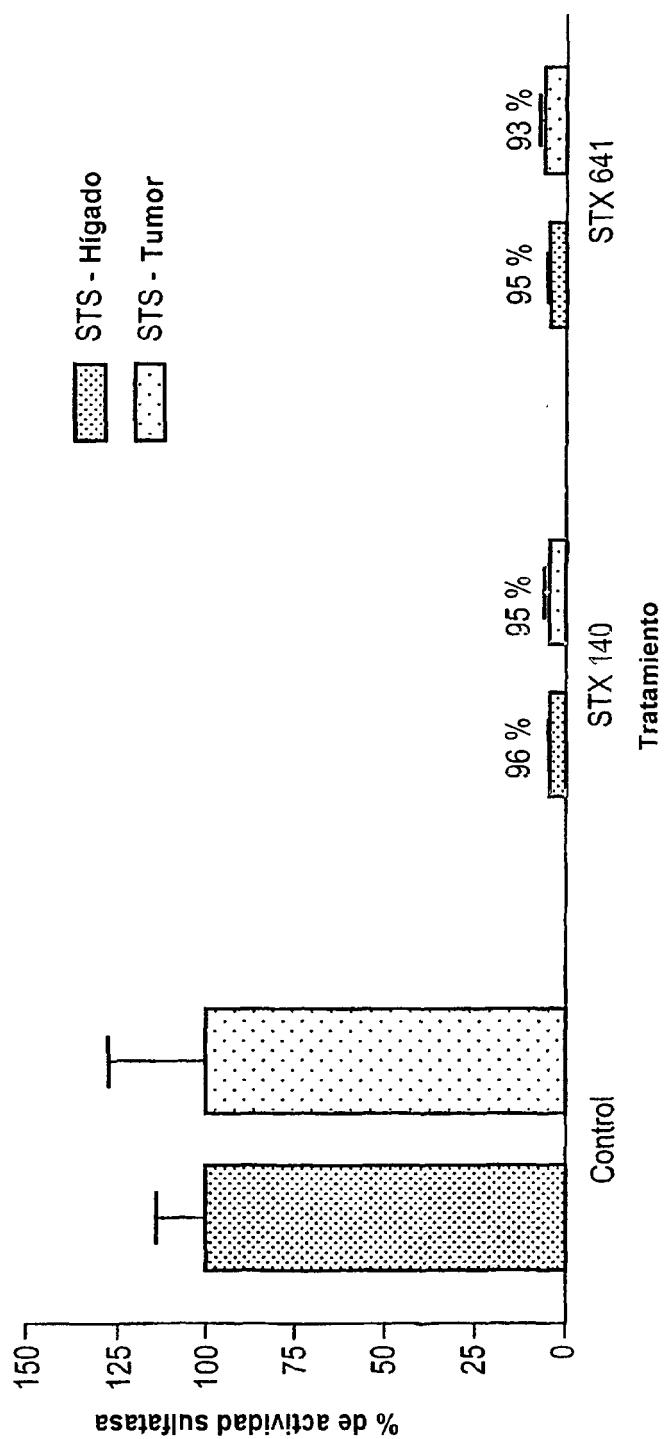


Fig. 16

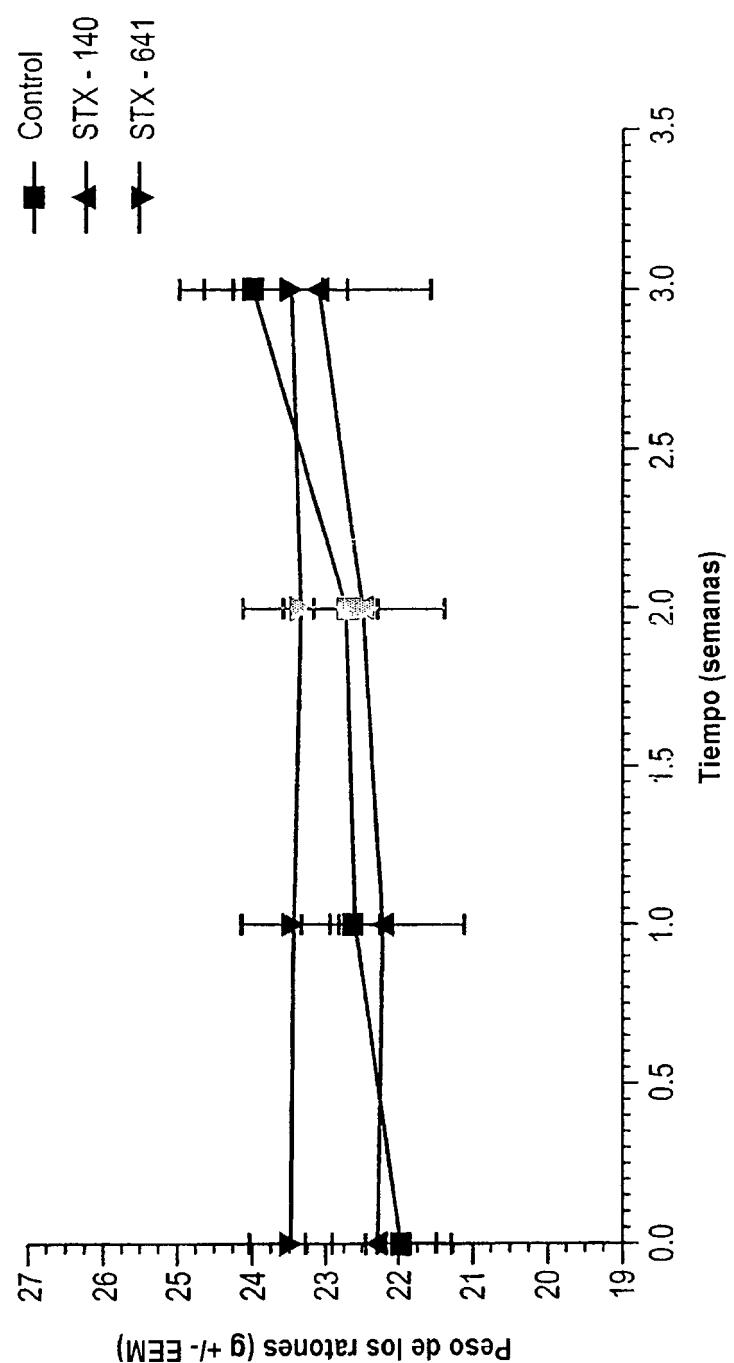


Fig. 17