



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 630**

51 Int. Cl.:
C07J 41/00 (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 5/30 (2006.01)
A61P 5/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01956710 .6**
96 Fecha de presentación : **17.08.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1311532**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **Estrógeno-17-sulfamatos como inhibidores de la esteroide sulfatasa.**

30 Prioridad: **18.08.2000 GB 0020498**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2009

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

72 Inventor/es: **Potter, Barry Victor Lloyd;**
Reed, Michael John;
Purohit, Atul;
Leese, Matthew Paul y
Leblond, Bertrand

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 323 630 T3

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

Estrógeno-17-sulfamatos como inhibidores de la esteroide sulfatasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto.

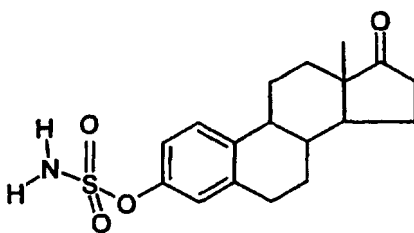
10 En particular la presente invención se refiere a un compuesto y a una composición farmacéutica que comprende el compuesto. Asimismo, la presente invención se refiere a la utilización del compuesto o composición en aplicaciones terapéuticas.

Antecedentes de la invención

15 Los datos disponibles sugieren que los estrógenos son los principales mitógenos implicados en la estimulación del crecimiento de tumores en los tejidos endocrino-dependientes, tales como la mama y el endometrio. Aunque las concentraciones plasmáticas de estrógeno son similares en mujeres con y sin cáncer de mama, los niveles de estrona y estradiol del tumor mamario son significativamente más elevados que en el tejido mamario normal o que en la sangre. La síntesis *in situ* de estrógeno se cree que presenta una contribución importante a los niveles elevados de estrógenos en los tumores y por lo tanto los inhibidores, en particular los inhibidores específicos, de la biosíntesis de estrógenos resultan de valor potencial en el tratamiento de los tumores endocrino-dependientes.

25 A lo largo de las últimas dos décadas ha habido un interés considerable en el desarrollo de inhibidores de la ruta de la aromatasasa, que convierte el precursor de andrógeno llamado androstenediona en estrona. Sin embargo, en la actualidad existen datos que apoyan que la ruta de la estrona sulfatasa (E1-STS), es decir la hidrólisis del sulfato de estrona para formar estrona (E1S a E1), y no la ruta de la aromatasasa, es la fuente principal de estrógeno en los tumores mamarios. Esta teoría se basa en que se produce una reducción modesta de la concentración plasmática de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama tratado con inhibidores de aromatasasa, tales como la aminoglutetimida y la 4-hidroxiandrostenediona, y también en el hecho de que la concentración plasmática de E1S en estos pacientes tratados con inhibidor de aromatasasa se mantiene relativamente elevada. La prolongada vida media de E1S en sangre (10 a 12 horas) en comparación con los estrógenos no conjugados (20 minutos), y los niveles elevados de actividad de esteroide sulfatasa en el hígado y en tejidos mamarios normales y malignos también apoyan esta teoría.

35 La patente PCT/GB92/01587 da a conocer nuevos inhibidores de esteroide sulfatasa, y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, para la utilización en el tratamiento de tumores dependientes de estrona, especialmente del cáncer de mama. Estos inhibidores de esteroide sulfatasa son ésteres de sulfamato, tales como N,N-dimetil-estrona-3-sulfamato y, preferentemente, estrona-3-sulfamato (también conocido como "EMATE"). EMATE presenta la estructura siguiente:



50 Es conocido que EMATE es un potente inhibidor de E1-STS, debido a que muestra una inhibición superior al 99% de la actividad de E1-STS en células MCF-7 intactas a una concentración de 0,1 mM. EMATE también inhibe el enzima E1-STS de un modo dependiente del tiempo y de la concentración, indicando que actúa como un inactivador sitio-dirigido activo. Aunque EMATE se diseñó originalmente para la inhibición de E1-STS, también inhibe la deshidroepiandrosterona sulfatasa (DHA-STS), que es un enzima que se cree que presenta un papel crucial en la regulación de la biosíntesis del esteroide estrogénico llamado androstenediol. Además, en la actualidad se dispone de datos que sugieren que podría ser incluso más importante como promotor del crecimiento de los tumores mamarios. EMATE también se encuentra activo *in vivo*, ya que resultaron actividades de inhibición prácticamente completa de E1-STS de hígado de rata (99%) y de DHA-STS (99%) al administrarlo oral o subcutáneamente. Además, se ha demostrado que EMATE presenta un efecto potenciador de la memoria en ratas. Los estudios en ratones sugieren una asociación entre la actividad de DHA-STS y la regulación de una parte de la respuesta inmunológica. Se cree que lo expuesto anteriormente también podría producirse en el ser humano. El átomo puente de O del grupo sulfamato en EMATE resulta importante para la actividad de inhibición. De esta manera, al sustituir el átomo 3-O por otros heteroátomos, tal como en la estrona-3-N-sulfamato y en el 3-S-sulfamato, los análogos que resultan son inactivadores no dependientes del tiempo más débiles.

65 Aunque podría haberse conseguido que EMATE presente una potencia óptima de inhibición de E1-STS, posiblemente se libera estrona durante la inhibición de la sulfatasa y EMATE y su congénere estradiol podrían presentar actividad estrogénica.

Ahmed *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun. 254(3):811-5, 27 de enero de 1999) informan de un estudio sobre la relación estructura-actividad de los inhibidores esteroideos y no esteroideos de la STS.

5 La presente invención pretende proporcionar nuevos compuestos adecuados para la inhibición de E1-STS, así como para otras aplicaciones terapéuticas.

Aspectos de resumen de la presente invención

10 La presente invención se basa en el inesperado resultado de que determinados compuestos podrían utilizarse como inhibidores efectivos de la esteroide sulfatasa y/o como agentes que podrían influir sobre el ciclo celular y/o como agentes que podrían influir sobre la apoptosis.

15 En un aspecto, la presente invención se basa en el inesperado resultado de que determinados compuestos bis-sulfamato podrían utilizarse como inhibidores efectivos de la esteroide sulfatasa y/o como moduladores del ciclo celular y/o como moduladores de la apoptosis.

Los compuestos comprenden dos grupos sulfamato.

Aspectos detallados de la presente invención

20 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto según la reivindicación 1.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto según la presente invención para la utilización en medicina.

25 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la presente invención opcionalmente mezclado con un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

30 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto según la presente invención en la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la terapia de una afección o enfermedad asociada a STS y/o al ciclo celular y/o a la apoptosis y/o al crecimiento celular.

35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un compuesto según la presente invención en la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la terapia de una afección o enfermedad asociada a niveles adversos de STS y/o al ciclo celular y/o a la apoptosis y/o al crecimiento celular.

40 Con el fin de facilitar la referencia, dichos aspectos y aspectos adicionales de la presente invención se comentan a continuación bajo los títulos de sección correspondientes. Sin embargo, las enseñanzas bajo cada sección no se encuentran necesariamente limitadas a cada sección particular.

Para algunas aplicaciones, los compuestos preferentemente no presentan ningún efecto estrogénico o un efecto estrogénico mínimo.

45 Para algunas aplicaciones, los compuestos preferentemente presentan un efecto estrogénico.

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

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

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

Algunas ventajas

55 Una ventaja clave de la presente invención es que los compuestos sulfamato de la presente invención pueden actuar como inhibidores de STS.

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

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser compuestos no estrogénicos. En la presente memoria, la expresión "no estrogénico" se refiere a mostrar una actividad estrogénica nula o sustancialmente nula.

65 Otra ventaja es que algunos de los compuestos pueden no ser capaces de ser metabolizados para formar compuestos que formen o induzcan actividad hormonal.

Algunos de los compuestos de la presente invención también resultan ventajosos en el aspecto de que pueden ser oralmente activos.

ES 2 323 630 T3

Algunos de los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles para el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de mama, así como (o alternativamente) afecciones no malignas, tal como la prevención de enfermedades autoinmunitarias, particularmente en el caso de que resulte necesaria la administración de fármacos a partir de una edad temprana.

De esta manera, algunos de los compuestos de la presente invención también se cree que presentan usos terapéuticos diferentes del tratamiento de los cánceres endocrino-dependientes, tales como el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Los compuestos de la presente invención también pueden resultar útiles como inductores de la apoptosis.

Los compuestos de la presente invención también pueden resultar útiles como inhibidores del crecimiento celular.

Esteroides sulfatasa

La esteroide sulfatasa, que en ocasiones se denomina esteril sulfatasa o abreviadamente "STS", hidroliza algunos esteroides sulfatados, tales como el sulfato de estrona, el sulfato de deshidroepiandrosterona y el sulfato de colesterol. A STS se le ha asignado el número de enzima EC 3.1.6.2.

La STS ha sido clonada y expresada. Por ejemplo ver Stein *et al.* (J. Biol. Chem. 264:13865-13872, (1989) y Yen *et al.* (Cell 49:443-454, (1987).

La STS es un enzima que se ha implicado en varias afecciones de enfermedad.

A título de ejemplo, algunos trabajadores han encontrado que una deficiencia total de STS produce ictiosis. Según algunos autores, la deficiencia de STS es bastante prevalente en Japón. Los mismos autores (Sakura *et al.*, J. Inher. Metab. Dis. 20(6):807-10, noviembre de 1997) también han informado de que algunas enfermedades alérgicas, tales como el asma bronquial, la rinitis alérgica o la dermatitis atópica, podrían encontrarse asociadas a la deficiencia de esteroide sulfatasa.

Además de los estados de enfermedad producidos por una falta completa de actividad de STS, un nivel incrementado de actividad de STS también puede producir afecciones de enfermedad. A título de ejemplo, y tal como se ha indicado anteriormente, existe evidencia fuerte que apoya el papel de la STS en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama.

También se ha implicado la STS en otras afecciones de enfermedad. A título de ejemplo, Le Roy *et al.* (Behav. Genet. 29(2):131-6, marzo de 1999) han determinado que podría existir una correlación genética entre la concentración de esteroide sulfatasa y el inicio del comportamiento de ataque en ratones. Los autores concluyen que el sulfatado de los esteroides podría ser el motor principal de una red compleja, incluyendo genes que se ha demostrado mediante mutagénesis que se encuentran implicados en el comportamiento de agresión.

Inhibición de la STS

Se cree que algunas afecciones de enfermedad asociadas a la actividad de STS se deben a la conversión de una estrona sulfatada no activa en una estrona no sulfatada activa. En las afecciones de enfermedad asociadas a la actividad de STS, resultaría deseable inhibir la actividad de la STS.

En la presente memoria, el término "inhibir" incluye reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o prevenir la acción perjudicial de la STS.

Inhibidor de la STS

Según la presente invención, el compuesto de la presente invención es capaz de actuar como inhibidor de la STS.

En la presente memoria, el término "inhibidor" tal como se utiliza en la presente invención con respecto al compuesto de la presente invención se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad de STS, tal como reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o prevenir la acción perjudicial de la STS. El inhibidor de STS puede actuar como un antagonista.

La capacidad de los compuestos de inhibir la actividad de la estrona sulfatasa puede evaluarse utilizando células de cáncer mamario MCF-7 intactas o microsomas placentarios. Además, puede utilizarse un modelo animal. Se presentan detalles sobre los protocolos de ensayo adecuados en las secciones siguientes. Debe indicarse que podrían utilizarse otros ensayos para determinar la actividad de STS y, de esta manera, la inhibición de la STS. Por ejemplo, también puede hacerse referencia a las enseñanzas de la patente WO-A-99/50453.

ES 2 323 630 T3

Preferentemente, para algunas aplicaciones, el compuesto se caracteriza además por la característica de que, si se sustituyese el grupo sulfamato por un grupo sulfato para formar un derivado sulfato, el derivado sulfato sería hidrolizable por un enzima que presentase actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), es decir, al incubarlo con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y a 37°C.

5

En una forma de realización preferida, en el caso de que el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto sulfato, el compuesto sulfato sería hidrolizable por un enzima que presentase actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) y rendiría un valor de Km inferior a 200 mmolar, preferentemente inferior a 150 mmolar, preferentemente inferior a 100 mmolar, preferentemente inferior a 75 mmolar, preferentemente inferior a 50 mmolar, al incubarlo con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y a 37°C.

10

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

15

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

20

Debe indicarse que el compuesto de la presente invención puede presentar otras propiedades beneficiosas además de su capacidad de inhibir la actividad de STS, o alternativamente a la misma.

25

Ensayo para determinar la actividad de sts utilizando células de cáncer

Protocolo 1

30

Inhibición de la actividad de esteroide sulfatasa en las células MCF-7

35

Se midió la actividad de esteroide sulfatasa *in vitro* utilizando células de cáncer mamario humano MCF-7 intactas. Esta línea celular dependiente de hormonas se utiliza ampliamente para estudiar el control del crecimiento de las células de cáncer mamario humano. Presenta actividad significativa de esteroide sulfatasa (MacIndoe *et al.*, Endocrinology 123:1281-1287, 1988; Purohit y Reed, Int. J. Cancer 50:901-905, 1992) y se encuentra disponible en los Estados Unidos en la American Type Culture Collection (ATCC) y en el Reino Unido (por ejemplo de The Imperial Cancer Research Fund).

40

Las células se mantienen en medio esencial mínimo (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Escocia) que contiene HEPES 20 mM, suero fetal bovino al 5%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y bicarbonato sódico al 0,075%. Se siembran hasta 30 matraces-réplica de cultivo de tejido de 25 cm² con aproximadamente 1 x 10⁵ células/matraz utilizando el medio anteriormente indicado. Las células se cultivan hasta el 80% de confluencia y el medio se cambia cada tercer día.

45

Las monocapas intactas de células MCF-7 en matraces de cultivo de tejido de 25 cm² por triplicado se lavan con solución salina equilibrada de Earle (EBSS, de ICN Flow, High Wycombe, Reino Unido) y se incuban durante 3 a 4 horas a 37°C con 5 pmoles (7 x 10⁵ dpm) de [6,7-³H]estrona-3-sulfato (actividad específica: 60 Ci/mmol, de New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A.) en MEM libre de suero (2,5 ml) conjuntamente con estrona-3-sulfamato (11 concentraciones: 0, 1 fM, 0,01 pM, 0,1 pM, 1 pM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 0,01 mM, 0,1 mM y 1 mM). Tras la incubación, cada matraz se enfría y el medio (1 ml) se pipetea en tubos separados que contienen [¹⁴C]estrona (7 x 10³ dpm) (actividad específica: 97 Ci/mmol, de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, Reino Unido). La mezcla se agita vigorosamente durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que >90% de la [¹⁴C]estrona y <0,1% de la [³H]estrona-3-sulfato se elimina de la fase acuosa mediante este tratamiento. Se elimina una parte (2 ml) de la fase orgánica, se evapora y se determina el contenido de ³H y ¹⁴C del residuo mediante espectrometría de centelleo. Se calculó la masa de estrona-3-sulfato hidrolizado a partir de los pulsos de ³H obtenidos (corregidos para los volúmenes de medio y de fase orgánica utilizados, y para la recuperación de [¹⁴C]estrona añadida) y la actividad específica del sustrato. Cada serie de experimentos incluía incubaciones de microsomas preparadas a partir de una placenta humana positiva para sulfatasa (control positivo) y matraces sin células (para evaluar la hidrólisis no enzimática aparente del sustrato). Se determinó el número de núcleos celulares por matraz utilizando un contador Coulter tras tratar las monocapas celulares con Zaponin. Se utilizó un matraz en cada serie para evaluar el estado y la viabilidad de las membranas celulares utilizando el procedimiento de exclusión de azul tripán (Phillips, H.J., 1973, en: Tissue culture and applications [editores: Kruse, D.F. y Patterson, M.K.], páginas 406 a 408, Academic Press, New York).

50

55

60

Los resultados de actividad de esteroide sulfatasa se expresan como medias ± 1 S.D. de producto total (estrona + estradiol) formado durante el periodo de incubación (20 horas) calculado para 10⁶ células y, para los valores que mostraban significancia estadística, como porcentaje de reducción (inhibición) respecto a las incubaciones que no contenían estrona-3-sulfamato. Se utilizó el ensayo t de Student no apareado para someter a ensayo la significancia estadística de los resultados.

65

ES 2 323 630 T3

Ensayo para determinar la actividad de STS utilizando microsomas placentarios

Protocolo 2

5 *Inhibición de la actividad de esteroide sulfatasa en microsomas placentarios*

Se trituraron por completo utilizando tijeras, placentas humanas positivas para sulfatasa procedentes de embarazos a término y se lavaron una vez con tampón fosfato frío (pH 7,4, 50 mM), después se resuspendieron en tampón fosfato frío (5 ml/g de tejido). La homogeneización se consiguió con un homogeneizador Ultra-Turrax utilizando tres pulsos de 10 segundos separados por periodos de enfriamiento en hielo de 2 minutos. Se eliminaron los núcleos y residuos celulares mediante centrifugación (4°C) a 2.000 g durante 30 minutos y se almacenaron a 20°C partes (2 ml) del sobrenadante. Se determinó la concentración de proteínas de los sobrenadantes mediante el procedimiento de Bradford (Anal. Biochem. 72:248-254, (1976)).

Se llevaron a cabo incubaciones (1 ml) utilizando una concentración de proteínas de 100 mg/ml, una concentración de sustrato de 20 mM [6,7-³H]estrona-3-sulfato (actividad específica: 60 Ci/mmol, de New England Nuclear, Boston, Mass., US) y un tiempo de incubación de 20 minutos a 37°C. En caso necesario se utilizaron ocho concentraciones de los compuestos: 0 (es decir, el control), 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM y 1,0 mM. Tras la incubación, cada muestra se enfrió y se pipeteó el medio (1 ml) en tubos separados que contenían [¹⁴C]estrona (7 x 10³ dpm) (actividad específica: 97 Ci/mmol, de Amersham International Radiochemical Centre, Amersham, Reino Unido). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos con tolueno (5 ml). Los experimentos han demostrado que >90% de la [¹⁴C]estrona y <0,1% de la [³H]estrona-3-sulfato son eliminados de la fase acuosa mediante este tratamiento. Se eliminó una parte (2 ml) de la fase orgánica, se evaporó y el contenido de ³H y ¹⁴C del residuo se determinó mediante espectrometría de centelleo. Se calculó la masa de estrona-3-sulfato hidrolizado a partir de los pulsos de ³H obtenidos (corregidos para los volúmenes de medio y fase orgánica utilizados, y para la recuperación de [¹⁴C]estrona utilizada) y la actividad específica del sustrato.

Modelo de ensayo animal para determinar la actividad de STS

30 Protocolo 3

Inhibición de la actividad de la estrona sulfatasa in vivo

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

El compuesto (0,1 mg/kg/día durante cinco días) se administró oralmente en ratas, recibiendo un grupo adicional de animales únicamente vehículo (propilenglicol). Al final del estudio, se obtuvieron muestras de tejido hepático y se analizó la actividad de estrona sulfatasa utilizando sulfato de ³H-estrona como sustrato, tal como se ha descrito anteriormente (ver la patente PCT/GB95/02638).

Modelo de ensayo animal para determinar la actividad estrogénica

45 Protocolo 4

Falta de estrogénica in vivo

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

El compuesto (0,1 mg/kg/día durante cinco días) se administró oralmente en ratas, recibiendo otro grupo de animales únicamente vehículo (propilenglicol). Al final del estudio se obtuvieron los úteros y se pesaron, expresando los resultados como peso uterino/peso corporal total x 100.

Los compuestos que no presentan ningún efecto significativo sobre el crecimiento uterino no son estrogénicos.

60 *Ensayos biotecnológicos para determinar la actividad de STS*

Protocolo 5

La actividad de los compuestos de inhibir la actividad de estrona sulfatasa también puede evaluarse utilizando secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos codificantes de STS, o fragmentos activos, derivados, homólogos o variantes de los mismos en, por ejemplo, cribados de alto rendimiento.

ES 2 323 630 T3

Puede utilizarse una o más dianas apropiadas cualesquiera, tales como una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos para identificar un agente capaz de modular la STS en cualquiera de entre una diversidad de técnicas de cribado de fármacos. La diana utilizada en este tipo de ensayo puede encontrarse libre en solución, fija a un soporte sólido, adherida a una superficie celular o localizada intracelularmente. Puede medirse la eliminación de la actividad diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente sometido a ensayo.

Informadores

Puede utilizarse una amplia diversidad de informadores en los procedimientos de ensayo de la presente invención, proporcionando los informadores las señales preferidas convenientemente detectables (por ejemplo mediante espectroscopía). A título de ejemplo, un gen informador puede codificar un enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de la luz.

Entre otros protocolos se incluyen el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la separación celular actividad por fluorescencia (FACS). Incluso puede utilizarse un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítopos no interfirientes. Éste y otros ensayos se describen, entre otros referencias, en Hampton, R. *et al.* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, MN) y en Maddox, D.E. *et al.*, J. Exp. Med. 15(8):1211, 1983).

Entre los ejemplos de moléculas de informadores se incluyen, aunque sin limitación, β -galactosidasa, invertasa, proteína fluorescente verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, (-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Alternativamente, pueden incorporarse nucleótidos marcados radioactivamente o marcados con etiqueta fluorescente en transcritos nuevos que después se identifican tras la unión a sondas oligonucleótidas.

A título de ejemplos adicionales, varias compañías, tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH), suministran kits comerciales y protocolos de procedimientos de ensayo. Entre las moléculas de informador o marcajes adecuados se incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Entre las patentes que enseñan la utilización de dichos marcajes se incluyen las patentes US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241.

Células huésped

La expresión “célula huésped” en relación a la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana para el agente de la presente invención.

De esta manera, otra forma de realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es la diana de la presente invención o que expresa la misma. Preferentemente dicho polinucleótido se transporta en un vector para la replicación y expresión de polinucleótidos destinados a ser la diana o a expresar la diana. Las células se seleccionan para ser compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levaduras o vegetales.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión génica heteróloga. Sin embargo, tiende a acumularse gran cantidad de proteínas heterólogas dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada a partir del conjunto de proteínas intracelulares de *E. coli* en ocasiones puede resultar difícil.

En contraste con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* resultan 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*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido codificante del polipéptido de la presente invención y/o de la conveniencia del procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden resultar preferidas los huéspedes eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, resultan preferidas las células de levaduras respecto a las células fúngicas debido a que resultan más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son pobremente secretadas a partir de las células de levadura o, en algunos casos, no son tratadas correctamente (por ejemplo la hiperglucosilación en levaduras). En estos casos, debería seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

Son ejemplos de huéspedes de expresión adecuados comprendidos dentro del alcance de la presente invención: hongos, tales como especies de *Aspergillus* (tales como aquéllas indicadas en las patentes EP-A-0 184 438 y EP-A-0 284 603) y especies de *Trichoderma*; bacterias, tales como especies de *Bacillus* (tales como aquéllas indicadas en las patentes EP-A-0 134 048 y EP-A-0 253 455), especies de *Streptomyces* y especies de *Pseudomonas*; y levaduras, tales como especies de *Kluyveromyces* (tales como aquéllas indicadas en las patentes EP-A-0 096 430 y EP-A-0 301 670) y especies de *Saccharomyces*. A título de ejemplo, pueden seleccionarse huéspedes de expresión típicos de entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

ES 2 323 630 T3

La utilización de células huésped adecuadas, tales como células huésped de levadura, fúngicas y vegetales puede permitir modificaciones post-traduccionales (por ejemplo miristoilación, glucosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosinas, serinas o treoninas) según resulte necesario para proporcionar una actividad biológica óptima a productos de expresión recombinante de la presente invención.

5

Organismo

El término “organismo” en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos a partir de la misma. Entre los ejemplos de organismo pueden incluirse un hongo, una levadura o una planta.

10

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

15

Transformación de células huésped/organismos huésped

Tal como se ha indicado anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Entre los ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas de transformaciones de huéspedes procarióticos se encuentran bien documentadas en la técnica, por ejemplo ver Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, (1995), John Wiley & Sons, Inc.

20

Si se utiliza un huésped procariótico, puede resultar necesario modificar convenientemente la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de intrones.

25

En otra forma de realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, también se han utilizado levaduras como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* presenta una larga historia de uso 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.* (Yeast Biotechnology, D.R. Berry *et al.*, editores, páginas 401 a 429, Allen y Unwin, London, 1987) y por King *et al.* (Molecular and Cell Biology of Yeasts, editores: E.F. Walton y G.T. Yarronton, páginas 107 a 133, Blackie, Glasgow, 1989).

30

Por varios motivos *Saccharomyces cerevisiae* resulta muy adecuado para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, es no patógeno para el ser humano y no es capaz de producir determinadas endotoxinas. En segundo lugar, presenta una larga historia de uso seguro tras siglos de explotación comercial con diversos fines. Ello ha conducido a su amplia aceptación pública. En tercer lugar, la utilización comercial e investigación extensivas dedicadas al organismo han resultado en que se conoce mucho sobre la genética y fisiología, así como las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

35

40

Se proporciona una revisión de los principios de expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de productos génicos en E. Hinchcliffe, E. Kenny (“Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes”, Yeasts, vol. 5, editores: Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, 2ª edición, Academic Press Ltd., 1993).

45

Se encuentran disponibles varios tipos de vectores levaduras, incluyendo vectores integrativos, que requieren la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento, y vectores plásmidos de replicación autónoma.

Con el fin de preparar *Saccharomyces* transgénico, se preparan constructos de expresión mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos en un constructo diseñado para la expresión en levaduras. Se han desarrollado varios tipos de constructo que se utilizan para la expresión heteróloga. Los constructos contienen un promotor activo en levaduras fusionado a la secuencia de nucleótidos, habitualmente se utiliza un promotor originado en una levadura, tal como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia de señal originada en una levadura, tal como la secuencia codificante del péptido de señal SUC2. Un terminador activo en levaduras es el extremo del sistema de expresión.

55

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

60

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación se encuentran varios marcadores auxotróficos, tales como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores dominantes de resistencia a antibióticos, tales como los marcadores de antibiótico aminoglucósido, por ejemplo G418.

65

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es la inserción de información genética en el genoma de la planta de manera que se consigue el mantenimiento estable del material genético insertado. Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los dos principios

fundamentales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante la utilización de un sistema vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 42:205-225, (1991)) y en Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, marzo/abril de 1994, 17 a 27). Pueden encontrarse enseñanzas adicionales sobre la transformación de plantas en la patente EP-A-0 449 375.

De esta manera, la presente invención también proporciona un procedimiento para transformar una célula huésped con una secuencia de nucleótidos destinada a ser la diana o a expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse bajo afecciones adecuadas para la expresión de la proteína codificada. La proteína producida por una célula recombinante puede expresarse sobre la superficie de la célula. Si se desea, como apreciará el experto en la materia, los vectores de expresión que contienen secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias víricas que dirijan la secreción de las secuencias codificantes a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia codificante a la secuencia de nucleótidos codificante de un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll, D.J. *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53, (1993)).

Variantes/homólogos/derivados

Además de las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente memoria, la presente invención también comprende la utilización de variantes, homólogos y derivados de los mismos. En la presente memoria, el término "homología" puede igualarse al de "identidad".

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

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

El % de homología puede calcularse para secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Lo anterior se denomina "alineación sin huecos". Típicamente estas alineaciones sin huecos se llevan a cabo únicamente a lo largo de un número relativamente corto de residuos.

Aunque éste es un procedimiento muy simple y consistente, no toma en consideración que, por ejemplo en una pareja de secuencias idénticas, una inserción o delección causará que los residuos aminoácidos siguientes se encuentren desalineados, potencialmente resultando de esta manera en un gran reducción del % de homología al llevar a cabo una alineación global. En consecuencia, la mayoría de procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que toman en consideración posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación total de homología. Lo anterior se consigue insertando "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco presente en la alineación, de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con el mínimo número posible de huecos, que refleja un parentesco más estrecho entre las dos secuencias comparadas, alcanzará una puntuación más alta que una con muchos huecos. Típicamente se utilizan los "costes de huecos afines", que cargan un coste relativamente elevado a la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos utilizado más comúnmente. Evidentemente las penalizaciones de hueco elevadas producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, resulta preferido utilizar los valores por defecto al utilizar estos programas de comparación de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (ver posteriormente), la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el cálculo del % máximo de homología en primer lugar requiere la producción de una alineación óptima, tomando en consideración las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, Nucleic Acids Research 12:387, 1984). Entre los ejemplos de otros programas que pueden llevar a cabo comparaciones de secuencias se incluyen, aunque sin limitación, el paquete BLAST (ver Ausubel *et al.*, *ibid*, 1999, capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, J. Mol. Biol. 403-410, 1990) y el grupo GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA se encuentran disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (ver Ausubel *et al.*, *ibid*, 1999, páginas 7 a 58 y 7 a 60). Sin embargo, resulta preferente utilizar el programa GCG Bestfit.

Una referencia útil adicional se encuentra en FEMS Microbiol. Lett. 174(2):247-50, 15 de mayo de 1999 (aparece una fe de erratum publicada en FEMS Microbiol. Lett 177(1):187-8, 1 de agosto de 1999).

ES 2 323 630 T3

Aunque el % final de homología puede medirse en términos de identidad, el procedimiento de alineación mismo típicamente no se basa en una comparación todo o nada. Por el contrario, generalmente se utiliza una matriz de escala de puntuaciones de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de este tipo de matriz, utilizado comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el grupo BLAST de programas. Los programas Wisconsin GCG generalmente utilizan los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida en caso de suministrarse (ver el manual para el usuario para más detalles). Resulta preferido utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otros programas, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Tras producir el programa una alineación óptima, resulta posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El programa típicamente realiza lo anterior como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

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

Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la Tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Vectores de expresión

La secuencia de nucleótidos para la utilización como diana o para la expresión de la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en una célula huésped compatible y/o procedente de la misma. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulos. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia procedentes de dos o más promotores diferentes de entre los indicados anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede encontrarse contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Las secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias de señal que dirijan la secreción de las secuencias codificantes de la sustancia a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

Proteínas de fusión

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse en forma de proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Entre los ejemplos de parejas de proteína de fusión se incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión de ADN y/o de activación transcripcional) y (-galactosidasa). También puede resultar conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la pareja proteína de fusión y la secuencia de interés de la proteína para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente la proteína de fusión no interferirá en la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico fusionado a la sustancia de la presente invención. En la presente forma de realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen natural que comprende una sustancia que puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar un estímulo generalizado del sistema inmunológico. El antígeno o determinante antigénico puede unirse al extremo aminoterminal o carboxi-terminal de la sustancia.

La secuencia de aminoácidos puede ligarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de las bibliotecas de péptidos para agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede resultar útil codificar una sustancia química que exprese un epítipo heterólogo que resulte reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

5

Terapia

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse como agentes terapéuticos, es decir, en aplicaciones de terapia.

10

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

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

15 *Composiciones farmacéuticas*

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

20

Las composiciones farmacéuticas puede estar destinadas al uso humano o animal en medicina humana o veterinaria y típicamente comprende uno o más cualesquiera de entre diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. Los portadores o diluyentes aceptables para la utilización terapéutica son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Genaro, editor, 1985). La elección de portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse considerando la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como portador, excipiente o diluyente, o además de uno de ellos, cualquier ligante o ligantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento o agente o agentes solubilizantes adecuados.

30

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, pigmentos e incluso agentes saborizantes en la composición farmacéutica. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

35

Pueden existir diferentes requisitos de composición/formulación, dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A título de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para administrarse utilizando una minibomba o mediante una vía mucosal, por ejemplo en forma de spray nasal o aerosol para la inhalación o solución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para la administración mediante, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente la formulación puede diseñarse para la administración por ambas vías.

40

En el caso de que el agente deba administrarse mucosalmente a través de la mucosa gastrointestinal, debe ser capaz de mantenerse estable durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, por ejemplo debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

45

En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en forma de supositorio o pesario, tópicamente en forma de loción, solución, crema, pomada o polvos para uso externo, mediante la utilización de un parche epidérmico, oralmente en la forma de comprimidos que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsula u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para que la solución resulte isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de un modo convencional.

55

Farmacéutico de combinación

El compuesto de la presente invención puede utilizarse en combinación con otro u otros agentes activos, tales como otro u otros agentes farmacéuticamente activos.

60

A título de ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en combinación con otros inhibidores de STS y/o con otros inhibidores, tales como un inhibidor de aromatasa (tal como, por ejemplo, 4-hidroxiandrostenediona (4-OHA)) y/o esteroides, tales como los ésteres neuroesteroides sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS) de origen natural y sulfato de pregnenolona (PS) y otros compuestos orgánicos estructuralmente similares. Pueden encontrarse ejemplos de otros inhibidores de STS en las referencias anteriormente indicadas. A título de ejemplo, entre los inhibidores de STS para la utilización en la presente invención se incluyen EMATE y uno de entre los compuestos 2-etilo y 2-metoxi-17-desoxi o ambos.

65

Además, o alternativamente, el compuesto de la presente invención puede utilizarse en combinación con un modificador de la respuesta biológica.

La expresión “modificador de respuesta biológica” (“BRM”) incluye citoquinas, moduladores inmunológicos, factores de crecimiento, factores reguladores de la hematopoyesis, factores estimuladores de colonias, factores quimio-tácticos, hemolíticos y trombolíticos, receptores de superficie celular, moléculas de adhesión a leucocitos, anticuerpos monoclonales, vacunas preventivas y terapéuticas, hormonas, componentes de la matriz extracelular, fibronectina, etc. Para algunas aplicaciones, preferentemente, el modificador de respuesta biológica es una citoquina. Entre los ejemplos de citoquinas se incluyen: interleuquinas (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, el factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- α , interferón alfa, beta y gamma, TGF- β . Para algunas aplicaciones, preferentemente la citoquina es el factor de necrosis tumoral (TNF). Para algunas aplicaciones el TNF puede ser cualquier tipo de TNF, tal como TNF- α , TNF- β , incluyendo derivados o mezclas de los mismos. Más preferentemente la citoquina es TNF- α . Las enseñanzas sobre el TNF pueden encontrarse en la técnica, tal como las patentes WO-A-98/08870 y WO-A-98/13348.

Administración

Típicamente un médico determinará la dosis real que resultará más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis posteriormente son ejemplares del caso medio. Evidentemente pueden presentarse casos individuales que justifiquen intervalos de dosis más altos o más bajos.

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

A título 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 o dos veces al día. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden modificarse y dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la severidad de la afección particular y el huésped sometido a terapia.

Además de los modos típicos de administración (indicados anteriormente), el término “administrado” también incluye la administración mediante técnicas tales como la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfifilos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de los mismos. Entre las vías para dichos mecanismos de administración se incluyen, aunque sin limitación, las vías mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

El término “administrado” incluye, aunque sin limitación, la administración mediante una vía mucosal, por ejemplo en forma de un spray nasal o aerosol para la inhalación o como solución ingerible, una ruta parenteral en la que la administración es mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

De esta manera, para la administración farmacéutica, los inhibidores de STS de la presente invención pueden formularse de cualquiera manera adecuada utilizando técnicas de formulación farmacéutica convencionales y portadores, adyuvantes, excipientes, diluyentes, etc. farmacéuticos y habitualmente para la administración parenteral. Las tasas de dosis efectiva aproximadas pueden encontrarse comprendidas en el intervalo de entre 1 y 1.000 mg/día, tal como entre 10 y 900 mg/día o incluso entre 100 y 800 mg/día, dependiendo de las actividades individuales de los compuestos en cuestión y para un paciente de peso corporal medio (70 kg). Las tasas de dosificación más habituales para los compuestos preferentes y más activos se encuentran comprendidas en el intervalo de entre 200 y 800 mg/día, más preferentemente entre 200 y 500 mg/día, todavía más preferentemente entre 200 y 250 mg/día. Pueden administrarse en regímenes de dosis única, en regímenes de dosis dividida y/o en regímenes de dosis múltiples que duren varios días. Para la administración oral pueden formularse en comprimidos, cápsulas, solución o suspensión que contenga entre 100 y 500 mg de compuesto por cada dosis unitaria. Alternativamente y preferentemente los compuestos se formulan para la administración parenteral en un portador parenteralmente administrable adecuado y que proporcione tasas de dosis diaria única comprendidas en el intervalo de entre 200 y 800 mg, preferentemente entre 200 y 500, más preferentemente entre 200 y 250 mg. Sin embargo, dichas dosis diarias efectivas variarán dependiendo de la actividad inherente del ingrediente activo y del peso corporal del paciente, encontrándose estas variaciones comprendidas dentro de los conocimientos y criterio del médico.

Ciclo celular

Los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en el procedimiento de tratamiento de un trastorno del ciclo celular.

ES 2 323 630 T3

Tal como se comenta en “Molecular Cell Biology”, 3ª edición, Lodish *et al.*, páginas 177 a 181, diferentes células eucarióticas pueden crecer y dividirse a tasas bastante diferentes. Las células de levadura, por ejemplo, pueden dividirse cada 120 minutos y las primeras divisiones de los huevos fertilizados en las células embrionarias de erizos de mar e insectos tardan sólo 1.530 minutos debido a que una gran célula preexistente se encuentra subdividida. Sin embargo, la mayoría de las células vegetales y animales en crecimiento tardan 10 a 20 horas en doblarse en número, y algunas se duplican a una tasa mucho más lenta. Muchas células en adultos, tales como las células nerviosas y las células de músculo estriado, no se dividen en absoluto; otras, por ejemplo los fibroblastos que asisten en la cicatrización de heridas, crecen según demanda y normalmente son quiescentes.

10 Sin embargo, cada célula eucariótica que se divide debe encontrarse preparada para donar el mismo material genético a dos células hijas. La síntesis de ADN en eucariotas no se produce durante todo el ciclo de división celular sino que se restringe a una parte del mismo antes de la división celular.

15 La relación entre la síntesis del ADN eucariótico y la división celular ha sido analizada profundamente en cultivos de células de mamífero en los que todas las células eran capaces de crecer y dividirse. En contraste con las bacterias, se descubrió que las células eucarióticas dedican únicamente una parte de su tiempo a la síntesis del ADN, y se completa horas antes de la división celular (mitosis). De esta manera, transcurre un periodo de tiempo después de la síntesis del ADN y antes de la división celular; se descubrió otro hueco de tiempo después de la división y antes de la siguiente ronda de síntesis de ADN. Este análisis condujo a la conclusión de que el ciclo de la célula eucariótica está constituido por una etapa M (mitótica), una etapa G₁ (el primer hueco), la etapa S (síntesis de ADN), una etapa G₂ (el segundo hueco) y nuevamente la etapa M. Las etapas entre mitosis (G₁, S y G₂) se conocen colectivamente como interfase.

25 Muchas células que no se dividen en los tejidos (por ejemplo todos los fibroblastos quiescentes), suspenden el ciclo después de la mitosis y inmediatamente antes de la síntesis del ADN; estas células “quiescentes” se dice que han salido del ciclo celular y que se encuentran en el estado G₀.

30 Resulta posible identificar células que se encuentran en cualquiera de las tres etapas de la interfase del ciclo celular, mediante la utilización de un separador celular activado por fluorescencia (FACS) para medir el contenido relativo de ADN de las mismas, una célula que se encuentra en G₁ (antes de la síntesis del ADN) presenta una cantidad definida de ADN; durante la etapa S (replicación del ADN), presenta entre x y $2x$, y al encontrarse en G₂ (o en M), presenta $2x$ de ADN.

Las etapas de la mitosis y la citoquinesis en una célula animal son las siguientes:

- 35 (a) Interfase. La etapa G₂ de la interfase es inmediatamente anterior al inicio de la mitosis. El ADN cromosómico se ha replicado y unido a proteína durante la etapa S, aunque los cromosomas todavía no son visibles como estructuras diferenciadas. El nucleolo es la única subestructura nuclear visible bajo el microscopio óptico. En una célula diploide antes de la replicación del ADN existen dos cromosomas morfológicos de cada tipo, y la célula se dice que es $2n$. En G₂, tras la replicación del ADN, la célula es $4n$. Existen cuatro copias de cada ADN cromosómico. Debido a que los cromosomas hermanos todavía no se han separado, se denominan cromátidas hermanas.
- 40 (b) Profase temprana. Los centriolos, cada uno con un centriolo hijo recién formado, empiezan a desplazarse hacia polos opuestos de la célula; los cromosomas son visibles como filamentos largos. La membrana nuclear empieza a desagregarse en vesículas pequeñas.
- 45 (c) Profase media y tardía. Se ha completado la condensación de los cromosomas; cada estructura cromosómica visible está compuesta de dos cromátidas que se mantienen juntas a través de los centrómeros de las mismas. Cada cromátida contiene una de las dos moléculas hijas de ADN recién replicadas. El huso microtubular empieza a radiar desde las regiones inmediatamente contiguas a los centriolos, que se desplazan aproximándose a sus polos. Algunas fibras del huso se han alargado hasta extenderse de polo a polo; la mayoría llegan a una cromátida y se encuentran unidas en los cinetocoros.
- 50 (d) Metafase. Los cromosomas se desplazan hacia el ecuador de la célula, donde se alinean en el plano ecuatorial. Las cromátidas hermanas todavía no se han separado.
- 55 (e) Anafase. Las dos cromátidas hermanas se separan en cromosomas independientes. Cada una contiene un centrómero que se encuentra unido mediante una fibra del huso a un polo, hacia el que se desplazan. De esta manera, se dona una copia de cada cromosoma a cada célula hija. Simultáneamente la célula se alarga, al igual que los husos de polo a polo. Se inicia la citoquinesis a medida que empieza a formarse el surco de escisión.
- 60 (f) Telofase. Se forman nuevas membranas circundando los núcleos de las células hija; los cromosomas se desenrollan y se hacen más borrosos, el nucleolo nuevamente resulta visible, y se forma la membrana nuclear circundando cada núcleo de las células hija. La citoquinesis prácticamente se ha completado y el huso desaparece a medida que los microtúbulos y otras fibras se despolimerizan. Durante toda la mitosis el centriolo “hijo” en cada polo crece hasta alcanzar su longitud completa. En la telofase, se completa la duplicación de cada uno de los centriolos originales y se generan nuevos centriolos hijos durante la siguiente interfase.
- 65

ES 2 323 630 T3

- (g) Interfase. Al completarse la citoquinesis, la célula entra en la etapa G₁ del ciclo celular y pasa nuevamente por el ciclo.

Se apreciará que el ciclo celular es un proceso celular extremadamente importante. Las desviaciones del ciclo celular normal puede resultar en varios trastornos médicos. El ciclo celular incrementado y/o no restringido puede resultar en cáncer. Un ciclo celular reducido puede resultar en afecciones degenerativas. La utilización del compuesto de la presente invención puede proporcionar un medio para tratar dichos trastornos y afecciones.

De esta manera, el compuesto de la presente invención puede resultar adecuado para la utilización en el tratamiento de trastornos del ciclo celular, tales como cánceres, incluyendo los cánceres dependientes de hormonas y los independientes de hormonas.

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

En algunas aplicaciones, el ciclo celular se inhibe y/o se impide y/o se bloquea, preferentemente se impide y/o se bloquea. En un aspecto, el ciclo celular puede inhibirse y/o impedirse y/o bloquearse en la etapa G₂/M. En un aspecto, el ciclo celular puede impedirse y/o inhibirse y/o bloquearse irreversiblemente, preferentemente se impide y/o se bloquea irreversiblemente el ciclo celular.

La expresión “irreversiblemente impedido y/o inhibido y/o bloqueado” se refiere a que, tras la aplicación de un compuesto de la presente invención, al retirar el compuesto, todavía son observables los efectos del compuesto, es decir que se ha impedido y/o inhibido y/o bloqueado el ciclo celular. Más particularmente, la expresión “irreversiblemente impedido y/o inhibido y/o bloqueado” se refiere a que, al someter a células al protocolo de ensayo del ciclo celular presentado en la presente memoria, las células tratadas con un compuesto de interés muestran un menor crecimiento tras la Etapa 2 del protocolo I que las células de control. Se presentan posteriormente los detalles de este protocolo.

De esta manera, la presente invención proporciona compuestos que: causan la inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama positivas para receptores de estrógenos (ER+) y ER negativas (ER-) *in vitro* al impedir y/o inhibir y/o bloquear el ciclo celular; y/o causar la regresión de los tumores mamarios inducidos por nitrosometilurea (NMU) en animales intactos (es decir, no ovariectomizados), y/o impedir y/o inhibir y/o bloquear el ciclo celular en células de cáncer; y/o actuar *in vivo* impidiendo y/o inhibiendo y/o bloqueando el ciclo celular y/o actuar como agonista del ciclo celular.

Ensayo de ciclo celular

Protocolo 6

Procedimiento

Etapa 1

Se siembran células de cáncer mamario MCF-7 en placas de cultivo multipocillo a una densidad de 10⁵ células/pocillo. Se dejó que las células se uniesen y creciesen hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 30%, momento en el que se trataron de la manera siguiente:

Control - sin tratamiento

Compuesto de interés (COI), 20 μM

Las células se cultivaron durante 6 días en medio de crecimiento que contenía el COI con cambios de medio/COI cada 3 días. Al final de este periodo se contó el número de células utilizando un contador celular Coulter.

Etapa 2

Tras el tratamiento de las células durante un periodo de 6 días con el COI, las células se sembraron nuevamente a una densidad de 10⁴ células/pocillo. No se añadieron tratamientos adicionales. Se dejó que las células continuasen creciendo durante 6 días adicionales en presencia de medio de crecimiento. Al final de este periodo se contó nuevamente el número de células.

65 *Cáncer*

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

El cáncer sigue siendo una causa importante de mortalidad en la mayoría de los países occidentales. Las terapias del cáncer desarrolladas hasta el momento han incluido el bloqueo de la acción o de la síntesis de hormonas con el fin de inhibir el crecimiento de los tumores dependientes de hormonas. Sin embargo, en la actualidad se utiliza quimioterapia más agresiva para el tratamiento de los tumores independientes de hormonas.

Por lo tanto, el desarrollo de un fármaco para el tratamiento anticáncer 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.

Es conocido que los estrógenos pasan varias reacciones de hidroxilación y conjugación tras su síntesis. Hasta recientemente se creía que dichas reacciones eran parte de un proceso metabólico que finalmente provocaba que los estrógenos fuesen solubles en agua y que facilitaba su eliminación del cuerpo. Ahora resulta evidente que algunos metabolitos hidroxilados (por ejemplo 2-hidroxi y 16alfa-hidroxi) y conjugados (por ejemplo sulfato de estrona, E1S) resultan importantes para determinar algunas de las acciones complejas que presentan los estrógenos en el cuerpo.

Algunos autores han investigado la formación de estrógenos 2-hidroxilados y 16-hidroxilados en relación a la afecciones que alteran el riesgo de cáncer de mama. Ahora existen datos que apoyan que los factores que incrementan la actividad de la 2-hidroxilasa se encuentran asociados a un riesgo reducido de cáncer, mientras que aquellos que incrementan la 16alfa-hidroxilación pueden elevar el riesgo de cáncer de mama. La cantidad creciente de datos que apoyan que el 2-metoxiestradiol es un metabolito endógeno con propiedades antimitóticas ha estimulado un mayor interés en el papel biológico de los metabolitos de los estrógenos. La catecol estrógeno metiltransferasa, un enzima ampliamente distribuido en todo el cuerpo, forma 2-MeOE2 a partir de 2-hidroxiestradiol (2-OHE2).

Algunos autores han demostrado que 2-MeOE2 *in vivo* inhibe el crecimiento de tumores iniciados a partir de la inyección subcutánea de sarcoma MetA, melanoma B16 o células de cáncer de mama negativas para receptor de estrógeno (ER-) MDA-MB-435. También inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales y la angiogénesis *in vitro*. Se ha sugerido que la capacidad del 2-MeOE2 de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* podría deberse a su capacidad de inhibir la angiogénesis inducida por el tumor, y no por la inhibición directa de la proliferación de las células tumorales.

El mecanismo por el que 2-MeOE2 ejerce sus potentes efectos antimitogénicos y antiangiogénicos todavía se está investigando. Existen datos de que, a concentraciones elevadas, puede inhibir la polimerización de los microtúbulos y actuar como un inhibidor débil de la unión de la colchicina a la tubulina. Sin embargo, recientemente, a concentraciones que bloquean la mitosis, se ha encontrado que los filamentos de tubulina en las células no se encontraban despolimerizados sino que presentaban una morfología idéntica a la observada tras el tratamiento de taxol. Por lo tanto, resulta posible que, al igual que el taxol, un fármaco que se utiliza para la terapia del cáncer de mama y de ovario, 2-MeOE2 actúe estabilizando la dinámica de los microtúbulos.

Aunque la identificación del 2-MeOE2 como nueva terapia para el cáncer representa un avance importante, la biodisponibilidad de los estrógenos de administración oral es pobre. Además, pueden experimentar un metabolismo extensivo durante su primer pase por el hígado. Como parte de un programa de investigación para desarrollar un inhibidor esteroide sulfatasa para la terapia del cáncer de mama, se ha identificado la estrona-3-*O*-sulfamato (EMATE) como potente inhibidor dirigido por sitio activo. Inesperadamente EMATE demostró que presentaba potentes propiedades estrogénicas, siendo su actividad uterotrófica oral en ratas 100 veces superior a la del estradiol. Su estrogénicidad incrementada se cree que es el resultado de su absorción por parte de los glóbulos rojos (rbc), que lo protegen de la inactivación durante su paso a través del hígado y que actúan como reservorio para su liberación lenta durante un periodo de tiempo prolongado. Se sintetizaron y sometieron a ensayo varios análogos de anillo A modificado, incluyendo 2-metoxiestrona-3-*O*-sulfamato. Aunque este compuesto era equipotente a EMATE como inhibidor de esteroide sulfatasa, carecía de estrogénicidad.

Los presentes inventores creen que el compuesto de la presente invención proporciona un medio para el tratamiento de cánceres y, especialmente, del cáncer de mama.

Además, o alternativamente, el compuesto de la presente invención puede resultar útil para bloquear el crecimiento de cánceres, incluyendo leucemias y tumores sólidos, tales como tumores de mama, endometrio, próstata, ovario y páncreas.

Terapia centrada en los estrógenos

Los presentes inventores creen que algunos de los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en el control de los niveles de estrógenos en el cuerpo, en particular en mujeres. De esta manera, algunos de los compuestos pueden resultar útiles como medio de control de fertilidad, tal como un comprimido, píldora, solución o pastilla anticonceptiva oral. Alternativamente, el compuesto podría encontrarse en la forma de un implante o como un parche.

De esta manera, los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles para tratar afecciones hormonales asociadas a estrógenos.

Además, o alternativamente, el compuesto de la presente invención puede resultar útil para tratar afecciones hormonales además de las asociadas a estrógenos. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención también puede ser capaz de afectar a la actividad hormonal y también puede ser capaz de afectar a una respuesta inmunológica.

5 *Enfermedades neurodegenerativas*

Los presentes inventores creen que algunos de los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y afecciones similares.

10 A título de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS pueden resultar útiles para incrementar la función de memoria de los pacientes que sufren enfermedades tales como amnesia, lesiones de la cabeza, enfermedad de Alzheimer, demencia epiléptica, demencia presenil, demencia postraumática, demencia senil, demencia vascular y demencia posictal o individuos que buscan mejorar su memoria.

15 *TH1*

Los presentes inventores creen que algunos de los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en aplicaciones de TH1.

20 A título de ejemplo, se cree que la presencia de inhibidores de STS dentro de los macrófagos o de otras células presentadoras de antígenos puede conducir a una capacidad reducida de las células T sensibilizadas de montar una respuesta TH1 (IL-1 elevado, IFN γ , IL-4 reducido). Por lo tanto, predominará la influencia reguladora normal de otros esteroides, tales como los glucocorticoides.

Afecciones inflamatorias

30 Los presentes inventores creen que algunos de los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en el tratamiento de afecciones inflamatorias, tales como afecciones asociadas a uno o más de entre: autoinmunidad, incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de tipo I y II, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, tiroiditis, vasculitis, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, trastornos de la piel, por ejemplo soriasis y dermatitis por contacto, enfermedad de injerto contra huésped, eccema, asma y rechazo de órgano tras el trasplante.

35 A título de ejemplo, se cree que los inhibidores de STS podrían impedir el efecto fisiológico normal de DHEA o esteroides relacionados sobre respuestas inmunológicas y/o inflamatorias.

40 Los compuestos de la presente invención pueden resultar útiles en la preparación de un medicamento para revelar un efecto similar al de un glucocorticoide endógeno.

Otras terapias

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

Por ejemplo, el compuesto o composición de la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en el documento WO-A-99/52890, es decir:

50 Además, o alternativamente, el compuesto o composición de la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, a continuación se proporciona parte de dicha lista: cáncer, enfermedad inflamatoria o inflamación, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, infección por VIH, estados de shock, reacciones huésped contra injerto, enfermedad autoinmune, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina, crecimiento tumoral, invasión y proliferación, angiogénesis, metástasis, efusión pleural maligna o ascitis maligna, isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, ictus, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; soriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolisis bullosa; ulceración de la córnea, retinopatía y curación de herida quirúrgica; rinitis, conjuntivitis alérgica, eccema, anafilaxis; restenosis, fallo cardíaco congestivo, endometriosis, aterosclerosis o endosclerosis.

65 Además, o alternativamente, el compuesto o composición de la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en la patente WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, a continuación se proporciona parte de dicha lista: citoquinas y actividad de proliferación/diferenciación celular, actividad inmunosupresora o inmunostimuladora (por ejemplo para tratar las inmunodeficiencias, incluyendo la infección con virus de la inmunodeficiencia humana, regulación del crecimiento de linfocitos, tratamiento del cáncer y de muchas enfer-

medades autoinmunitarias, y para evitar el rechazo del trasplante o inducir la inmunidad tumoral), regulación de la hematopoyesis, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides, estimular el crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, por ejemplo para cicatrizar heridas, el tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y la neurodegeneración, inhibición o activación de la hormona folículo-estimulante (modulación de la fertilidad), actividad quimiotáctica/quimiocinética (por ejemplo para movilizar tipos celulares específicos a sitios de daño o infección), actividad homeostática y trombolítica (por ejemplo para tratar la hemofilia y el ictus), actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo, el choque séptico o la enfermedad de Crohn), como antimicrobianos, moduladores de, por ejemplo, el metabolismo o el comportamiento, como analgésicos, para el tratamiento de trastornos de deficiencia específicos, en el tratamiento de, por ejemplo, la soriasis, en medicina humana o veterinaria.

Además, o alternativamente, la composición de la presente invención puede resultar útil en el tratamiento de los trastornos indicados en el documento WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, parte de dicha lista se proporciona a continuación: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de células T y, de esta manera, actividad antiinflamatoria, actividad antiinmunitaria, es decir efectos inhibidores frente a una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada a inflamación, inhibición de la capacidad de los macrófagos y de las células T de adherirse a los componentes de la matriz extracelular y a la fibronectina, así como la expresión del receptor *fas* regulada positivamente en las células T, inhibición de las reacciones inmunitarias e inflamación no deseadas, incluyendo la artritis, incluyendo la artritis reumatoide, la inflamación asociada a hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada a aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, daño por reperfusión, fallo cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome del estrés respiratorio u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada a 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 epidídimo-orquitis, infertilidad, traumatismo orquidal u otras enfermedades testiculares de tipo inmunitario, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunitarias o de tipo inmunitario, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, corioretinitis, uveoretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fondo del ojo, componentes inflamatorios del traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vítreo-retinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo tras la operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o inflamatoria contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunitarias y de tipo inflamatorio, inflamación asociada a enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunitarios en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, resultaría beneficiosa la supresión inmunitaria y/o de la inflamación, enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionado con el SIDA, encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de ictus, síndrome posterior a la poliomielitis, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia gravis, pseudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de la compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas o distrofas musculares, y enfermedades, afecciones o trastornos de tipo inmunitario e inflamatorio de los sistemas nerviosos central y periférico, inflamación post-traumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante de médula ósea o de otros trasplantes, complicaciones inflamatorias y/o inmunitarias y efectos secundarios de la terapia génica, por ejemplo debida a infección con un portador vírico o inflamación asociada al SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para tratar o mejorar las enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo la leucemia, mediante la reducción del número de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células naturales o artificiales, tejidos y órganos, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos o tejido de piel natural o artificial.

Preparación de compuesto

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro adecuado. A título de ejemplo, pueden prepararse los compuestos sulfamato de la presente invención haciendo reaccionar un alcohol apropiado con un cloruro de sulfamoilo adecuado de fórmula $R^4R^5NSO_2Cl$.

Las afecciones típicas para llevar a cabo la reacción son las siguientes.

Se añaden hidruro sódico y un cloruro de sulfamoilo a una solución agitada del alcohol en dimetilformamida anhidra a 0°C. Posteriormente, la reacción se deja que se caliente hasta la temperatura ambiente, continuando después la agitación durante 24 horas más. La mezcla de reacción se vierte sobre una solución saturada fría de bicarbonato sódico y la fase acuosa resultante se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secan sobre $MgSO_4$

anhidro. La filtración seguida de la evaporación del solvente in vacuo y la coevaporación con tolueno proporciona un residuo crudo que se purifica adicionalmente mediante cromatografía flash.

5 Preferentemente el alcohol se derivatiza, según resulte apropiado, antes de la reacción con el cloruro de sulfamoilo. En caso necesario los grupos funcionales en el alcohol pueden protegerse de manera conocida y eliminarse el grupo o grupos protectores al final de la reacción.

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

También se presentan las preparaciones preferidas en el texto a continuación.

Sumario

15 Sumariamente, la presente invención proporciona nuevos compuestos para la utilización como inhibidores de esteroide sulfatasa y/o moduladores de la apoptosis y/o moduladores del ciclo celular y/o del crecimiento celular, y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

Ejemplos

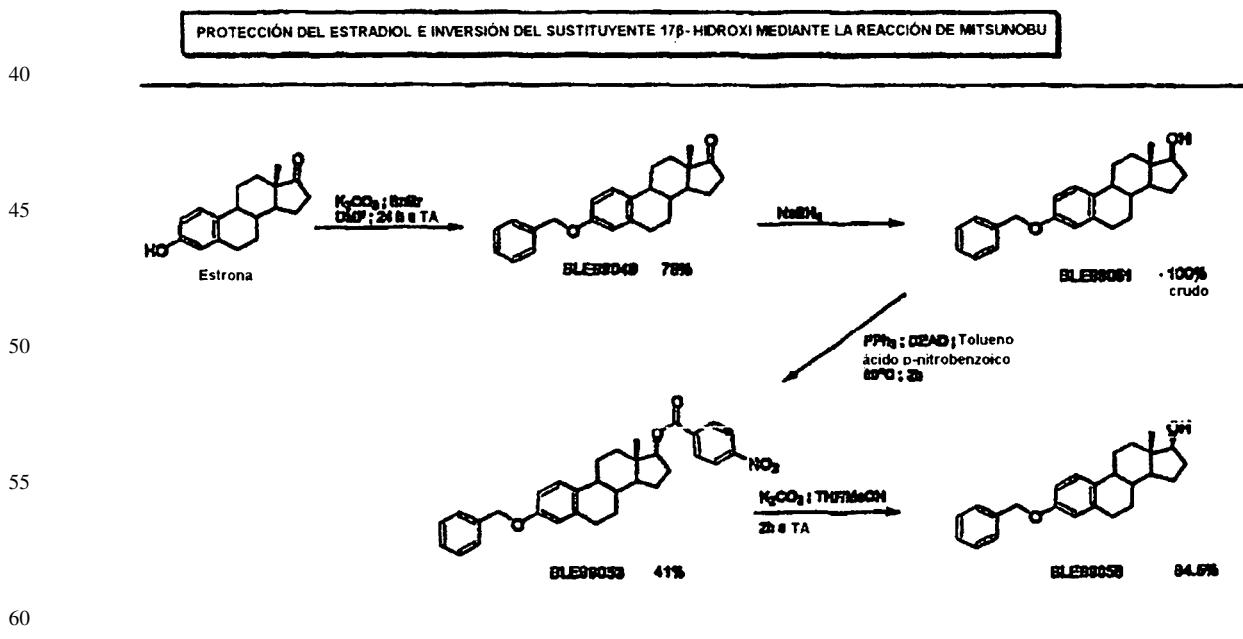
20 A continuación se describe la presente invención únicamente a título de ejemplo. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos también presentan compuestos preferidos de la presente invención, así como vías preferidas para preparar los mismos y productos intermedios útiles en la preparación de los mismos.

Síntesis

Las síntesis siguientes se refieren a compuestos no comprendidos dentro del alcance según las reivindicaciones.

30 *Preparación de 3-O-bencil-17- α -O-sulfamoilo y 3-O-bencil-17- β -O-sulfamoil-estradiol*

35 Partiendo de estrona (disponible comercialmente, Aldrich), se realizó la protección de la posición 3-O mediante bencilación, proporcionando BLE99049. La reducción del borohidruro sódico proporcionó 3-O-bencil-17- β -estradiol BLE99051 de una manera prácticamente cuantitativa.



65 La inversión de la configuración de la posición 17 del estradiol se consiguió mediante una reacción de Mitsunobu. El complejo formado por la trifenilfosfina y DEAD se hizo reaccionar con 3-O-bencil-17- β -estradiol BLE99051 y ácido p-nitrobenzoico a 80°C en tolueno, proporcionando 3-O-bencil-17- α -p-nitrobenzoato-estradiol BLE99053.

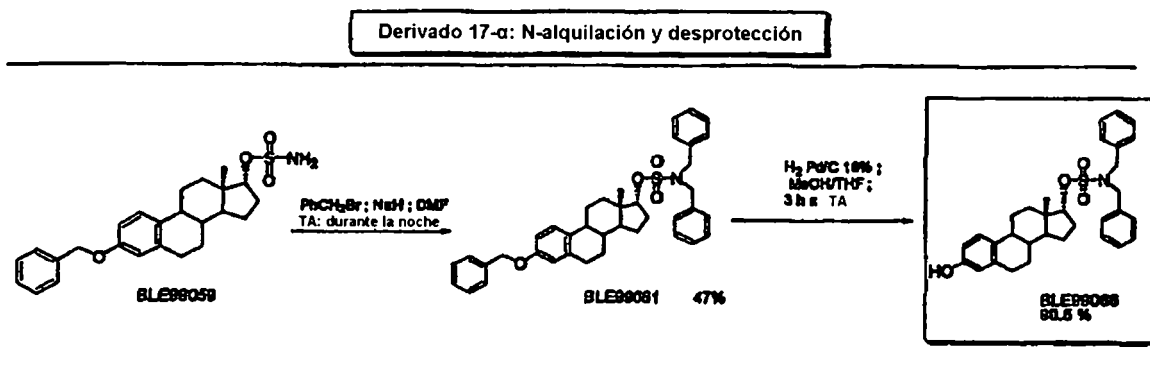
ES 2 323 630 T3

La hidrólisis del grupo éster de BLE99053 utilizando carbonato de potasio proporcionó limpiamente 3-*O*-bencil-17- β -estradiol BLE99056, con un rendimiento de 84,5%.

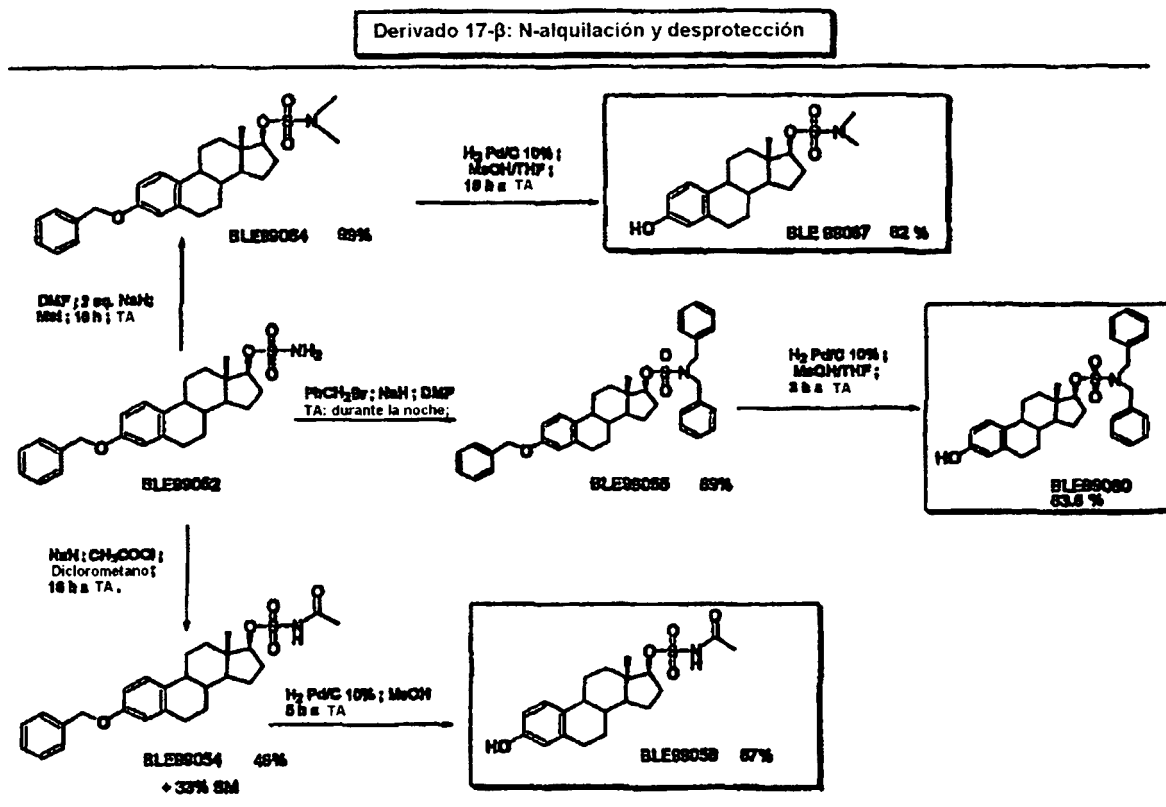
La sulfamoilación en la posición 17 se llevó a cabo utilizando un nuevo procedimiento que implicaba 1,2 equivalentes de *t*-BuOK 1 M en THF como base y 5 equivalentes de cloruro de sulfamoilo (0,7 M en tolueno), que proporcionó rendimientos elevados de los derivados sulfamato BLE99052 y BLE99059.

Bis-alquilación o acilación, hidrogenolisis y sulfamoilación final de los derivados 17- α y 17- α -estradiol

La bis-alquilación con cloruro de bencilo del compuesto 17- α BLE99059 condujo al compuesto bis-alquilado BLE99061, con un rendimiento de 47%; la desprotección posterior del bencilo mediante hidrogenolisis proporcionó BLE99066, con un rendimiento de 90,5%.

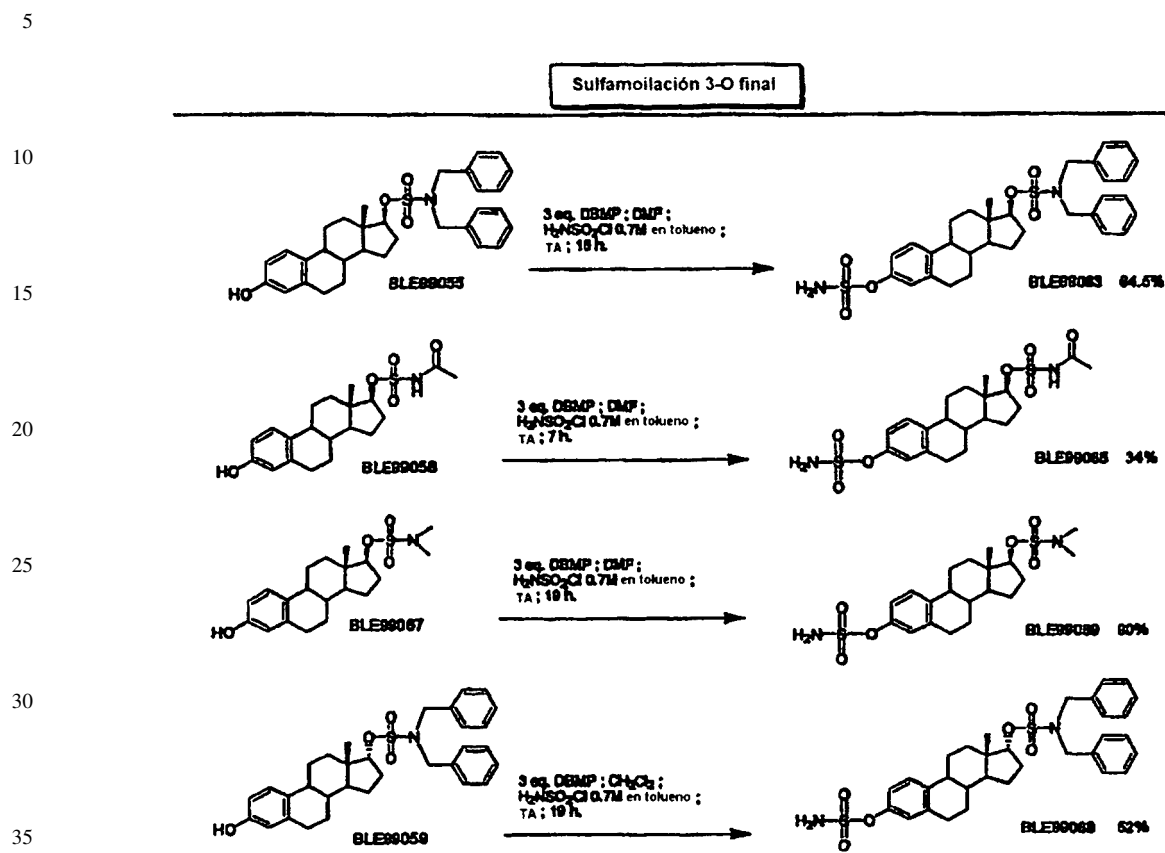


La bis-alquilación con cloruro de bencilo, yoduro de metilo y la acilación con cloruro de acetilo del derivado 17- β BLE99052 proporcionaron, respectivamente, los compuestos deseados BLE99060, BLE99067 y BLE99058 con buenos rendimientos. La posterior desprotección de los bencilos mediante hidrogenolisis utilizando H_2 y Pd/C al 10%, respectivamente, condujo a los estradiolos 17-sulfamatos BLE99060, BLE99064 y BLE99058.



ES 2 323 630 T3

La sulfamoilación final en la posición 3-O se llevó a cabo utilizando 3 equivalentes de DBMP como base en diclorometano o dimetilformamida, dependiendo de la solubilidad del material de partida, y 5 equivalentes de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno.



40 Siguiendo la estrategia anteriormente indicada (ver anteriormente), los presentes inventores prepararon los dos compuestos siguientes:

- 3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00074
- 3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083A

45

3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00074

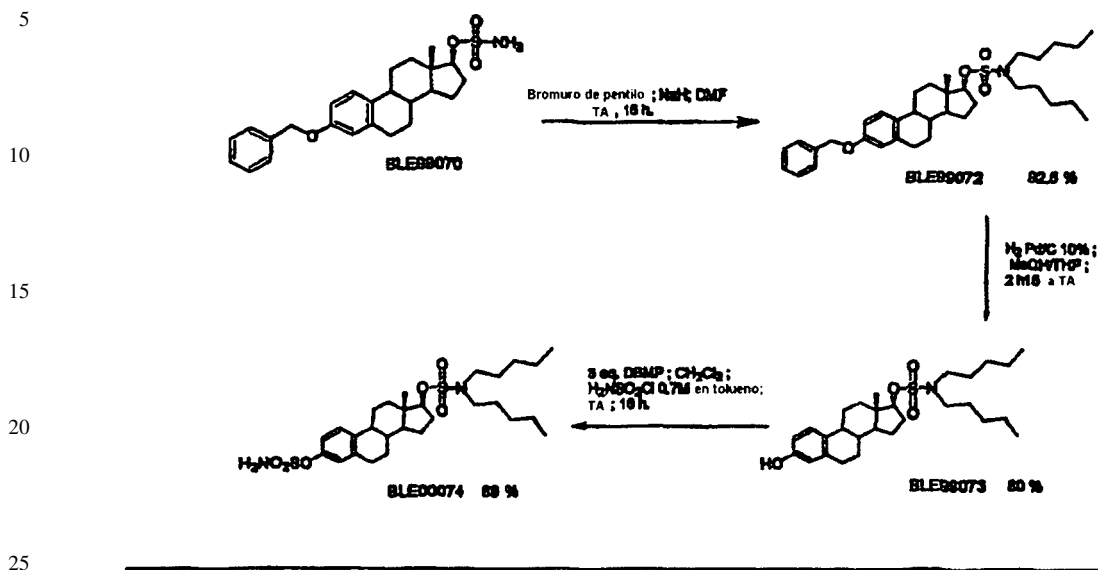
50 La bis-alkilación con bromuro de pentilo del 17- β -O-sulfamato BLE99070 (ver el procedimiento de preparación en el informe 2) condujo al compuesto bis-alkilado BLE99072, con un rendimiento de 92,5%, la posterior desprotección de los bencilos mediante hidrogenólisis proporcionó BLE99073, con un rendimiento de 80%. La sulfamoilación final en la posición 3-O se produjo con un rendimiento de 89%, utilizando 3 equivalentes de DBMP como base en diclorometano y 5 equivalentes de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno, obteniendo el derivado bisulfamato BLE00074.

55

60

65

3-O-sulfamoil-estra-1,3,6(10)-trien-17β-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00074



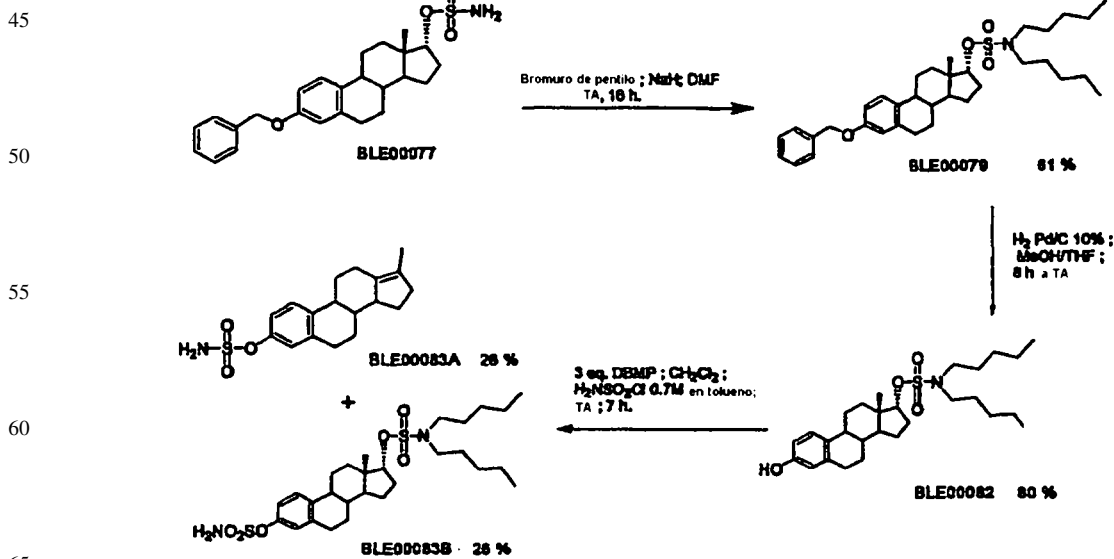
3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17α-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083B

30

35

La vía utilizada para preparar el bis-sulfamato BLE00083B es la misma que para BLE00074. El rendimiento inferior de la alquilación de 17-O-α-sulfamato BLE00077 en comparación con el de 17-O-β-sulfamato BLE00070 se debe al hecho de que los derivados 17-O-α-sulfamatos de estradiol no son muy estables en medio ácido o en solvente polar (SiO₂ o CDCl₃ en ocasiones son suficientemente ácidos para estimular esta degradación). En la sulfamoiación final del compuesto BLE00082, los presentes inventores aislaron, tras la purificación mediante cromatografía flash, dos 3-O-sulfamatos: 17-metil-gona-1,3,5(10),13(17)-tetraen-3-O-sulfamato BLE00083A y 3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17α-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083B.

3-O-sulfamoil-estra-1,3,6(10)-trien-17α-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083B



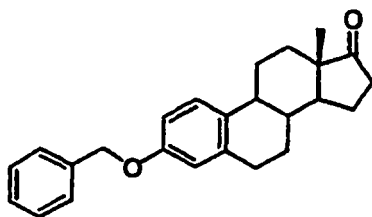
ES 2 323 630 T3

Parte experimental

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona BLE99049

5 A una solución de estrona (3,35 g, 12,39 mmoles) en DMF (50 ml) se añadió carbonato de potasio (3,45 g, 25 mmoles) y bromuro de bencilo (2,25 ml, 18,75 mmoles) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas, después se refrescó con H₂O y se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas agrupadas se lavaron con H₂O, NaCl acuoso saturado y después se secaron (MgSO₄). El desecante se separó mediante filtración y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se trituró con Et₂O, se filtró y se evaporó, proporcionando 3,48 g (rendimiento: 78%) de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona BLE99049 en forma de sólido blanco.

15



20

C₂₅H₂₈O₂

25

PM: 360,50

Pf.: 127 a 130°C (lit. 126°C a 127°C) patente SRI WO 99/33858, Tanabe *et al.*

30

RMN ¹H 270 MHz (CDCl₃): 0,91 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,35-1,75 (m, 6H), 1,85-2,60 (m, 7H), 2,80-3,00 (m, 2H), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,73 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,79 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,02 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,27 a 7,49 (m, 5H, ArH).

M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 360,3 [66, M⁺], 91,1 (100)

35

HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₂₅H₂₈O₂ (M⁺) 360,20893, observada: 360,20876.

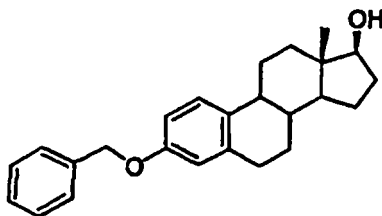
R_f=0,76 (EtOAc, hexano=1:2), SM R_f=0,52.

40

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-ol BLE99051

A una suspensión de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)trien-17-ona BLE99049 (3,46 g, 9,59 mmoles) en THF (15 ml) y MeOH (38 ml) se le añadió borohidruro sódico (0,36 g, 9,58 mmoles) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se refrescó con 10 ml de solución acuosa saturada de NH₄Cl y se añadieron 50 ml de H₂O. El precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con H₂O, proporcionando 3,50 g de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-ol BLE99051 (rendimiento crudo de 100%) en forma de sólido blanco.

50



55

C₂₅H₃₀O₂

60

PM: 362,50

Pf.: 93°C a 95°C (lit. 118°C a 119°C) patente SRI WO-99/33858, Tanabe *et al.*

M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 362,2 (81, M⁺), 345,2 (13), 91,1 (100)

65

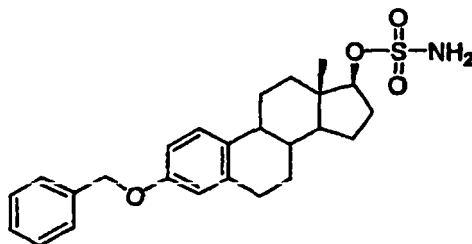
HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₂₅H₃₀O₂ (M⁺) 362,22458, observado: 362,22522

R_f 0,49 (EtOAc:hexano=1:2), SM R_f 0,76

ES 2 323 630 T3

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-sulfamato BLE99052

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-ol BLE99051 (1,20 g, 3,31 mmoles) en 35 ml de DMF anhidro tratada a 0°C bajo una atmósfera de N₂ se le añadió una solución de t-BuOK 1 M en THF (4 ml, 4,00 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0°C, después se añadió gota a gota a 0°C una solución de cloruro de sulfamoilo aproximadamente 0,7 M en tolueno (24 ml, 16,32 mmoles). La solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de NH₄Cl a 0°C (15 ml), después agua (60 ml) y la solución se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). La capa orgánica se lavó con solución hipersalina (3 x 100 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, proporcionando 1,48 g de un sólido amarillento crudo. La recrystalización (2x) en EtOAc/hexano proporcionó 1,29 g (rendimiento: 88%) de cristales blancos de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-sulfamato BLE99052.



C₂₅H₃₁NO₄S

PM: 441,58

Pf.: 108°C a 109°C

RMN ¹N 400 MHz (CDCl₃): 0,87 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,15-2,40 (m, 13H), 2,80-2,90 (m, 2H, C-6-H), 4,51 (t, 1H, J=8,2 Hz, 17α-H), 4,55-4,80 (s br, 2H int. D₂O, NH₂), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,71 (d, 1H, J=2,3 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,3 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,19 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,26-7,45 (m, 5H, ArH).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 441,3 (41, M⁺), 345,3 (19), 91,1 (100).

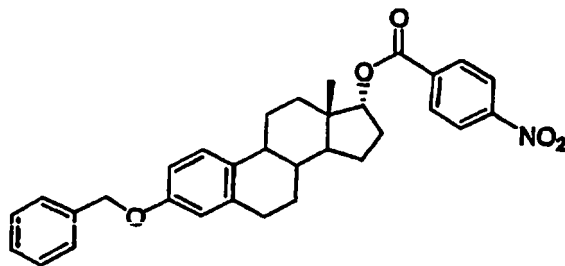
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 440,2 [100, (M-H)⁻].

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para C₂₅H₃₁NO₄S (M⁺) 441,19738, observado: 441,19769

R_f 0,45 (EtOAc:hexano=1:2), SM R_f 0,48

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-O-p-nitrobenzoato BLE99053

A una solución de trifetilfosfina (2,10 g, 8,0 mmoles) en tolueno seco (13,3 ml) se le añadió, gota a gota a una temperatura de entre 0°C y 5°C, dietilazodicarboxilato (1,26 ml, 8,0 mmoles), y la solución se agitó a una temperatura de entre 0°C y 5°C durante 1 hora. Se añadió una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-ol BLE99051 (1,45 g, 4,0 mmoles) y ácido p-nitrobenzoico (2,67 g, 16 mmoles) a temperatura ambiente, después la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 80°C. Tras enfriar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, se añadió H₂O y la mezcla se extrajo con EtOAc (3x80 ml). Las capas orgánicas agrupadas se lavaron con H₂O, NaCl acuoso saturado y después se secaron (MgSO₄). El desecante se separó mediante filtración y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna (Ø de columna = 3 cm, h = 23 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=10:1 a 7:1, proporcionó (tras la recrystalización en hexano:EtOAc), 0,85 g de un sólido blanco/rosa pálido: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-O-p-nitrobenzoato BLE99053.



C₃₂H₃₃NO₅

ES 2 323 630 T3

PM: 511,61

Pf.: 129°C a 135°C (litt. 135°C a 136°C), patente de SRI WO 99/33858, Tanabe *et al.*

5 RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃): 0,88 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,20-1,82 (m, 8H), 1,90-2,02 (m, 2H), 2,20-2,44 (m, 3H), 2,78-2,96 (m, 2H, C-6-H), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 5,15 (d, 1H, J=6,25 Hz, 17β-H), 6,73 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,19 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H), 7,28-7,46 (m, 5H, ArH) y 8,18-8,34 (m, 4H, ArH).

10 M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 511,3 (50, M⁺), 345,3 (15), 91,1 (100).

M/S *m/z* (FAB negativo, rel. int.): 511,2 (100, M⁻).

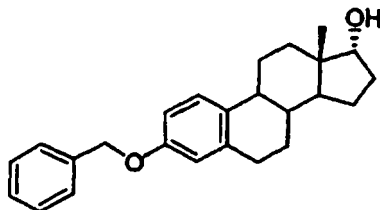
HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₃₂H₃₃NO₅ (M⁺) 511,23587, observado: 511,23547

15 R_f 0,42 (EtOAc:hexano=7:1), SM R_f 0,09

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-ol BLE99056

20 A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-*O*-*p*-nitrobenzoato BLE99053 (0,82 g, 1,60 mmoles) en THF (6 ml) y MeOH (6 ml) se le añadió carbonato de potasio (0,22 g, 1,60 mmoles) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se refrescó con H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas agrupadas se lavaron con H₂O, NaCl acuoso saturado y después se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (∅ de columna=3 cm, h=22 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=5:1 a 3:1, proporcionando 0,49 g (rendimiento: 84,5%) de un sólido blanco: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-ol BLE99056.

30



35

C₂₅H₃₀O₂

40 PM: 362,50

Pf.: 84°C a 85°C (lit. 85°C a 86°C), patente de SRI WO 99/33858, Tanabe *et al.*

45 RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃): 0,70 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,18-1,97 (m, 8H), 2,16-2,28 (m, 2H), 2,30-2,40 (m, 1H), 2,76-2,94 (m, 2H, C-6-H), 3,80 (d, 1H, J=5,86 Hz, 17β-H), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,72 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,22 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,29-7,45 (m, 5H, ArH), -OH no observado.

M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 362,3 (70, M⁺), 345,2 (16), 91,1 (100).

50 HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₂₅H₃₀O₂ (M⁺) 362,22458, observado: 362,22425

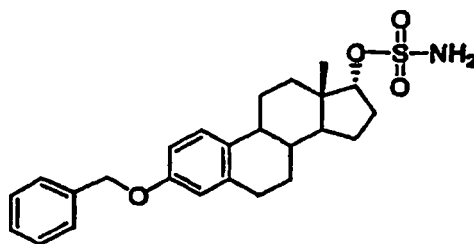
R_f 0,15 (EtOAc:hexano=1:5), SM R_f 0,54

55 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-*O*-sulfamato BLE99059

60 A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-ol BLE99056 (0,49 g, 1,35 mmoles) en 15 ml de DMF anhidro tratada a 0°C bajo atmósfera de N₂ se añadió una solución de *t*-BuOK 1 M en THF (1,62 ml, 1,62 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0°C, después se añadió gota a gota a 0°C una solución de cloruro de sulfamilo aproximadamente 0,7 M en tolueno (9,93 ml, 6,76 mmoles). La solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió una solución saturada de NH₄Cl a 0°C (5 ml), después agua (20 ml) y la solución se extrajo con EtOAc (3 x 70 ml). La capa orgánica se lavó con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, proporcionando 0,59 g (rendimiento: 98%) de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-*O*-sulfamato BLE99059 en forma de sólido blanco.

65

ES 2 323 630 T3



$C_{25}H_{31}NO_4S$

PM: 441,58

Pf.: 91°C a 93°C

RMN 1H 270 MHz ($CDCl_3$): 0,80 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,20-2,45 (m, 13H), 2,70-2,95 (m, 2H, C-6-H), 4,26 (d, 1H, J=Hz, C-17 β -H), 4,75 (s br, 2H int. D_2O , NH_2), 5,03 (s, 2H, $-OCH_2Ph$), 6,72 (d, 1H, J=2,5 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,5 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,20 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,30-7,50 (m, 5H, ArH).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 441,2 (9, M^+), 344,3 (84), 91,1 (100).

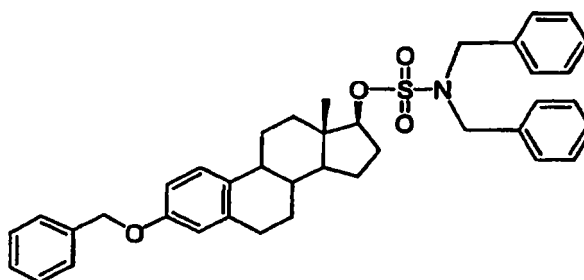
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 440,2 [61, ($M-H$) $^-$], 402,1 (33), 249,0 (100), 171,0 (50), 96,0 (86).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{25}H_{31}NO_4S$ (M^+) 441,19738, observado: 441,19757

R_f 0,34 (EtOAc:hexano=1:2), SM R_f 0,46

3-benciloxiestra-1,3,5-(10)-trien-17 β -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99055

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-sulfamato BLE99052 (0,30 g, 0,68 mmoles) y bromuro de bencilo (0,33 ml, 2,72 mmoles) en 10 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 , hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 0,06 g, 1,36 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (30 ml). Tras la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=23 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=5:1, proporcionando 0,38 g (rendimiento: 89%) en forma de un sólido blanco: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99055.



$C_{39}H_{43}NO_4S$

PM: 621,83

Pf.: 92°C a 93°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,78 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,16-2,34 (m, 13H), 2,78-2,93 (m, 2H), 4,32 (s, 4H, $-NCH_2Ph$), 4,48 (t, 1H, J=9 Hz, 17 α -H), 5,03 (s, 2H, $-OCH_2Ph$), 6,71 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,19 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,28-7,45 (m, 15H, ArH).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 621,3 (34, M^+), 345,2 (56), 91,1 (100).

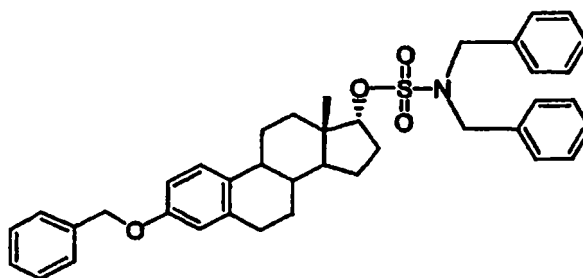
HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{39}H_{43}NO_4S$ (M^+) 621,29128, observado: 621,29056

R_f 0,46 (EtOAc:hexano=1:5), SM R_f 0,05

ES 2 323 630 T3

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99061

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-sulfamato BLE99059 (0,30 g, 0,68 mmoles) y bromuro de bencilo (0,33 ml, 2,72 mmoles) en 10 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂, hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 0,06 g, 1,36 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 28 horas. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (50 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, proporcionando un producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=9:1, proporcionando 0,20 g (rendimiento: 47%) de un sólido blanco (tras la recristalización en hexano): 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99061.



C₃₉H₄₃NO₄S

PM: 621,83

Pf.: 115°C a 116°C

RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃): 0,73 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,20-2,34 (m, 13H), 2,78-2,94 (m, 2H, C-6-H), 4,26 (d, 2H, J_{BA}=15,6 Hz, 2 x NCH_AH_BPh), 4,40 (d, 2H, J_{AB}=15,6 Hz, 2xNCH_AH_BPh), 4,60 (d, 1H, J=5,4 Hz, 17 β -H), 5,04 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,73 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,79 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,20 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y 7,27-7,46 (m, 15H, ArH).

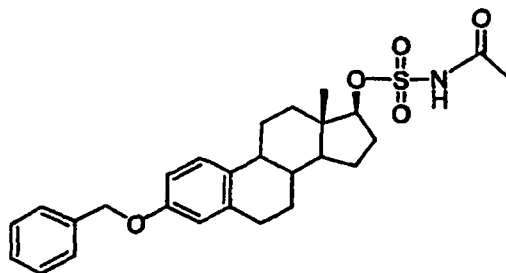
M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 621,2 (32, M⁺), 345,2 (78), 91,1 (100).

HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₃₉H₄₃NO₄S (M⁺) 621,29128, observado: 621,29028

R_f 0,67 (EtOAc:hexano=1:4), SM R_f 0,00

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N-acetil)sulfamato BLE99054

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-sulfamato BLE99052 (0,30 g, 0,68 mmoles) en 20 ml de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂, hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 0,027 g, 0,68 mmoles) y cloruro de acetilo (53,1 μ l, 0,75 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. El solvente se eliminó *in vacuo* y la mezcla cruda se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=23 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=2:1 a 1:1, proporcionando 0,10 g (rendimiento: 33%) de material de partida BLE99052, y después 0,15 g (rendimiento: 46%) de un sólido blanco: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N-acetil)sulfamato BLE99054.



C₂₇H₃₃NO₅S

PM: 483,62

ES 2 323 630 T3

P.f.: 82°C a 85°C

RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃): 0,89 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,20-2,36 (m, 13H), 2,23 (s, 3H, CH₃CO-), 2,77-2,93 (m, 2H, C-6-H), 4,68 (t, 1H, J=8,4 Hz, 17β-H), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,72 (d, 1H, J=2,9 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,9 y 8,6 Hz, C-2-H), 7,18 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H), 7,28-7,46 (m, 5H, ArH) y 8,70 (s br, 1H int. D₂O, NH-).

M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 483,3 (34, M⁺), 345,3 (30), 91,1 (100).

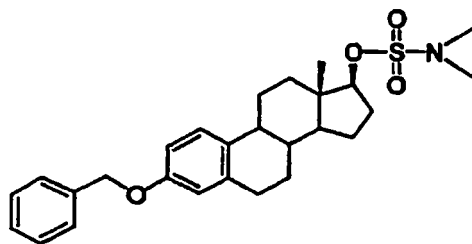
M/S *m/z* (FAB negativo, rel. int.): 482,2 [100, (M-H)⁻].

HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₂₇H₃₃NO₅S (M⁺) 483,20794, observado: 483,20785

R_f 0,18 (EtOAc:hexano=1:1)

3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE99064

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-sulfamato BLE99052 (0,30 g, 0,68 mmoles) en 10 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂, hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 0,060 g, 1,36 mmoles) y yoduro de metilo (0,169 ml, 2,72 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (50 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, proporcionando 0,31 g (rendimiento crudo: 99%) de un sólido amarillo pálido crudo: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE99064.



C₂₇H₃₅NO₄S

PM: 469,64

P.f.: 117°C a 121°C

RMN ¹H 270 MHz (CDCl₃): 0,86 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,15-2,40 (m, 13H), 2,23 (s, 3H, CH₃CO-), 2,75-2,90 (m, 2H, C-6-H), 2,87 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 4,46 (t, 1H, J=7,9 Hz, 17β-H), 5,03 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6,72 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, J=2,7 y 8,4 Hz, C-2-H), 7,19 (d, 1H, J=8,4 Hz, C-1-H) y 7,25-7,45 (m, 5H, ArH).

M/S *m/z* (FAB positivo, rel. int.): 469,2 (50, M⁺), 345,2 (45,6), 91,1 (100).

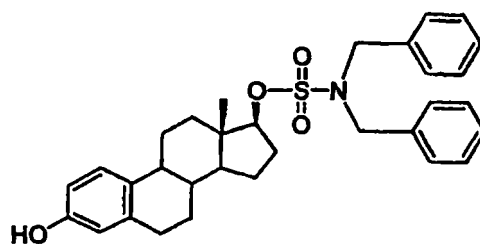
HRMS (FAB positivo) *m/z* calculado para C₂₇H₃₅NO₄S (M⁺) 469,22868, observado: 469,22845

R_f 0,46 (AcOEt:hexano=1:4), SM R_f 0,13

3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99060

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99055 (0,20 g, 0,38 mmoles) en 20 ml de MeOH se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,10 g). La mezcla de reacción se agitó durante 7 horas bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se evaporó a presión reducida, proporcionando 0,23 g (rendimiento: 83,5%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99060 en forma de sólido blanco.

ES 2 323 630 T3



$C_{32}H_{37}NO_4S$

PM: 531,71

Pf.: 60°C a 63°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,78 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,27-2,34 (m, 13H), 2,76-2,84 (m, 2H), 4,32 (s, 4H, 2x N(CH_2)-), 4,49 (t, 1H, J=8,5 Hz, 17 α -H), 6,56 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,63 (dd, 1H, J=2,7 y 8,2 Hz, C-2-H), 7,14 (d, 1H, J=8,2 Hz, C-1-H), 7,28-7,39 (m, 10H, ArH) y -OH no observado.

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 531,2 (28, M^+), 255,2 (100), 91,1 (84).

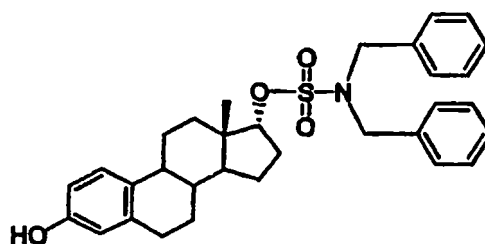
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 530,2 [56, (M-H)], 276,1 (100).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{32}H_{37}NO_4S$ (M^+) 531,24433, observado: 531,24232

R_f 0,15 (EtOAc:hexano=1:5), SM R_f 0,43

3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99066

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dibencil)sulfamato BLE99061 (0,195 g, 0,31 mmoles) en 10 ml de MeOH y 5 ml de THF se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,075 g). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se evaporó a presión reducida, proporcionando 0,15 g (rendimiento: 90,5%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N,dibencil)sulfamato BLE99066 en forma de un sólido blanco.



$C_{32}H_{37}NO_4S$

PM: 531,71

Pf.: 57°C a 60°C

RMN 1H 270 MHz ($CDCl_3$): 0,73 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,20-2,40 (m, 13H), 2,75-3,00 (m, 2H), 4,26 (d, 2H, $J_{BA}=15,4$ Hz, 2xN CH_2 A H_B Ph), 4,40 (d, 2H, $J_{AB}=15,4$ Hz, 2xN CH_2 A H_B Ph), 4,59 (d, 1H, J=5,5 Hz, 17 β -H), 6,55-6,70 (m, 2H, C-4-H y C-2-H), 7,15 (d, 1H, J=8,4 Hz, C-1-H) y 7,25-7,45 (m, 10H, ArH) y -OH no observado.

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 531,3 (10, M^+), 255,2 (100), 91,1 (98).

M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 530,2 [6, (M-H)], 276,1 (100).

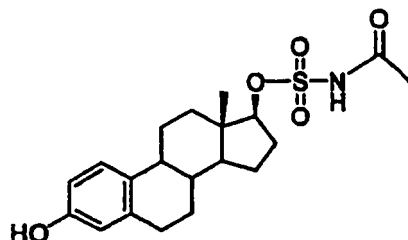
HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{32}H_{37}NO_4S$ (M^+) 531,24433, observado: 531,24255

R_f 0,43 (EtOAc:hexano=1:4), SM R_f 0,66

ES 2 323 630 T3

3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99058

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99054 (0,11 g, 0,23 mmoles) en 10 ml de MeOH se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,05 g). La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se evaporó a presión reducida, proporcionando 0,09 g (rendimiento: 87%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99058 en forma de un sólido blanco.



$C_{20}H_{27}NO_5S$

PM: 393, 50

P.f.: 130°C a 134°C (dec.)

RMN 1H 400 MHz ($CD_3OD/CDCl_3$): 0,88 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,18-2,34 (m, 13H), 2,13 (s, 3H, CH_3CO-), 2,70-2,90 (m, 2H, C-6-H), 3,48 (s br, 2H inter. D_2O , -NH- y -OH), 4,63 (dd, 1H, J=7,8 y J=9,4 Hz, 17β-H), 6,56 (s, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,63 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H) y 7,11 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 393,2 (86, M^+), 255,2 (100).

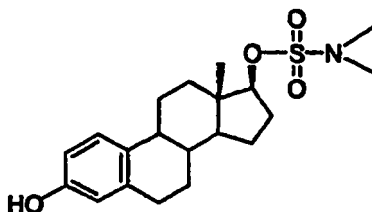
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 392,1 [100, (M-H) $^-$].

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{20}H_{27}NO_5S$ (M^+) 393,16099, observado: 393,16132

R_f 0,12 (EtOAc:hexano=1:1) SM R_f 0,18

3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE99067

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE99064 (0,31 g, 0,66 mmoles) en 20 ml de MeOH y 5 ml de THF se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,15 g). La mezcla de reacción se agitó durante la noche bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se evaporó a presión reducida, proporcionando 0,205 g (rendimiento: 82%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE99067 en forma de un sólido blanco.



$C_{20}H_{29}NO_4S$

PM: 379,51

P.f.: 170°C a 173°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,86 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,18-2,36 (m, 13H), 2,13 (s, 3H, CH_3CO-), 2,74-2,90 (m, 2H, C-6-H), 2,87 (s, 6H, - NMe_2), 4,63 (dd, 1H, J=7,8 y J=9,4 Hz, 17β-H), 6,56 (s, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 6,63 (dd, 1H, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H) y 7,11 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H) y -OH no observado.

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 379,2 (16, M^+), 255,2 (58), 111,1 (59), 97,1 (100).

ES 2 323 630 T3

M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 378,1 [100, (M-H)⁻], 124(52).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para C₂₀H₂₉NO₄S (M⁺) 379,18173, observado: 379,18177.

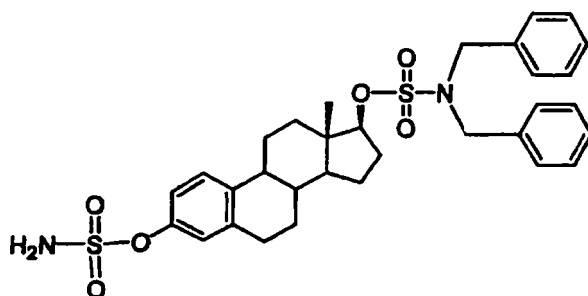
5

3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfamato BLE99063

A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfato BLE99060 (0,20 g, 0,38 mmoles) en diclorometano anhidro (10 ml) se le añadió a temperatura ambiente 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina (DBMP) (0,23 g, 1,13 mmoles) y gota a gota, con una jeringa, una solución de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno (2,77 ml, 1,88 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió diclorometano (40 ml) y H₂O (40 ml). Tras separar la capa acuosa, se lavó la capa orgánica con solución hipersalina (2 x 50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite incoloro que se fraccionó mediante cromatografía flash (Ø de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=4:1 a 3:2, proporcionando 0,194 g (rendimiento: 84,5%) de un sólido blanco (espuma): 3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfamato BLE99063.

20

25



30

C₃₂H₃₈N₂O₆S₂

PM: 610,78

35

Pf.: 58°C a 62°C

40

RMN ¹H 400 MHz (CDCl₃): 0,78 (s, 3H, C-18-CH₃), 1,18-2,32 (m, 13H), 2,85-2,92 (m, 2H, C-6-H), 4,32 (s, 4H, NCH₂Ph), 4,49 (t, J=8,4 Hz, 17α-H), 4,88 (s, 2H int. D₂O, -NH₂), 7,04 (d, 1H, J=2,3 Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1H, J=2,3 y J=8,4 Hz, C-2-H) y 7,28-7,38 (m, 11H, ArH y C1-H).

45

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 611,1 [7, (M+H)⁺], 334,1 (100), 91,1 (91,1).

M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 609,1 [100, (M-H)].

50

HRMS (FAB negativo) m/z calculado para C₃₂H₃₇N₂O₆S₂ (M-H)⁻ 609,20931, observado: 609,20914

R_f 0,60 (EtOAc:hexano=2:3), SM R_f 0,75

55

Microanálisis - Observado: %C 62,80 %H 6,32 %N 4,53

50

Teórico: 62,93 6,27 4,59

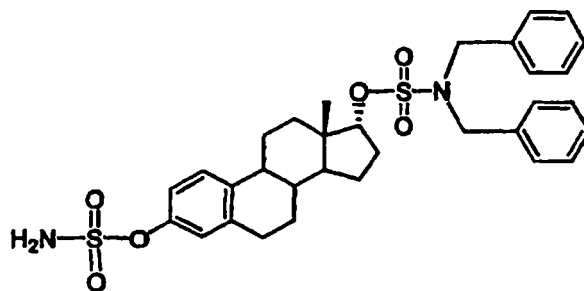
3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17α-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfamato BLE99068

55

A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfamato BLE99066 (0,122 g, 0,23 mmoles) en diclorometano anhidro (7 ml) se le añadió a temperatura ambiente 2,6-di-*tert*-butil-4-metilpiridina (DBMP) (0,14 g, 0,69 mmoles) y gota a gota, con una jeringa, una solución de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno (1,69 ml, 1,15 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Se añadió diclorometano (30 ml) y H₂O (30 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con solución hipersalina (2 x 50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite incoloro que se fraccionó mediante cromatografía flash (Ø de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=4:1 a 3:2, proporcionando 0,073 g (rendimiento: 52%) de un sólido blanco: 3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dibencil)sulfamato BLE99068.

65

ES 2 323 630 T3



$C_{32}H_{38}N_2O_6S_2$

PM: 610,78

P.f.: 60°C a 64°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,74 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,18-2,36 (m, 13H), 2,85-2,92 (m, 2H, C-6-H), 4,27 (d, 2H, $J_{BA}=15,2$, $2 \times NC-H_AH_BPh$), 4,40 (d, 2H, $J_{AB}=15,2$ Hz, $2 \times NCH_AH_BPh$), 4,59 (t, $J=5,4$ Hz, 17β -H), 4,90 (s br, 2H int. D_2O , $-NH_2$), 7,05 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 7,09 (dd, 1H, $J=2,7$ y $J=8,6$ Hz, C-2-H), 7,14 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H) y 7,28-7,38 (m, 10H, ArH).

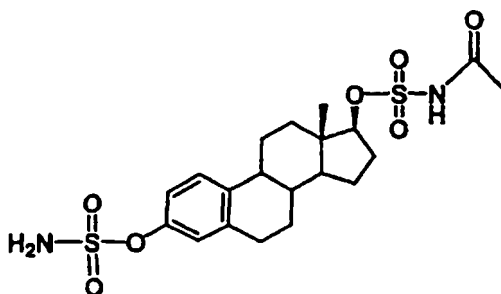
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 609,1 [40, (M-H) $^-$], 332,1 (15), 276,1 (100), 181,1 (4), 106,1 (4), 78,0 (12).

HRMS (FAB negativo) m/z calculado para $C_{32}H_{37}N_2O_6S_2$, (M-H) $^-$ 609,20931, observado: 609,20840.

Microanálisis - Observado:	%C	62,70	%H	6,29	%N	4,44
Teórico:		62,93		6,27		4,59

3-O-sulfamoyl-estra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99065

A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99058 (67 mg, 0,17 mmoles) en dimetilformamida anhidra (5 ml) se le añadió a temperatura ambiente 2,6-di-terc-butyl-4-metilpiridina (DBMP) (0,105 g, 0,51 mmoles) y gota a gota, con una jeringa, una solución de cloruro de sulfamoylo 0,7 M en tolueno (1,25 ml, 0,85 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Se añadió EtOAc (50 ml) y H_2O (40 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con solución hipersalina (3 x 40 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite que se fraccionó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=1,5 cm, h=23 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=2:1, proporcionando 27 mg (rendimiento: 34%) de un sólido naranja pálido: 3-O-sulfamoyl-estra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N-acetil)sulfamato BLE99065.



$C_{20}H_{28}N_2O_7S_2$

PM: 472,58

P.f.: 76°C a 80°C (dec.)

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,89 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,20-2,38 (m, 13H), 2,24 (s, 3H, CH_3CO-), 2,80-2,86 (m, 2H, C-6-H), 4,69 (t, 1H, $J=8,7$ Hz, C-17β-H), 4,95 (s br, 2H int. D_2O , $-NH_2$), 7,04 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1H, $J=2,7$ y $J=8,6$ Hz, C-2-H), 7,28 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H) y 8,12 (s br, 1H int. D_2O , $-NHAc$).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 472,2 (20, M $^+$), 420,3 (22), 393,3 (14), 334,2 (86), 255,3 (46), 239,2 (30), 219,2 (38), 203,2 (26), 183,2 (30), 173,2 (58), 157,2 (40), 133,1 (48), 111,2 (61), 97,1 (100), 84,1 (30), 73,1 (92).

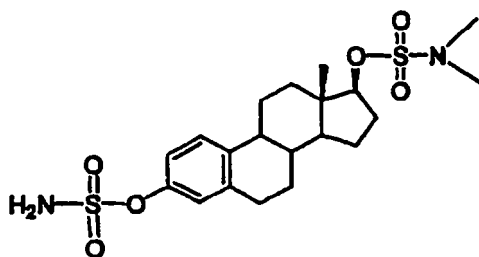
M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 471,1 [100, (M-H) $^-$], 403,1 (20), 392,2 (15), 332,1 (46), 250,1 (64), 97 (74).

ES 2 323 630 T3

HRMS (FAB negativo) m/z calculado para $C_{20}H_{28}N_2O_7S_2$ (M-H)⁻ 471,12597, observado: 471,12579.

3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dimetil)sulfamato BLE99069

5 A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dimetil)sulfato BLE99067 (180 mg, 0,47 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) se le añadió a temperatura ambiente 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridina (DBMP) (0,292 g, 1,42 mmoles) gota a gota, con una jeringa, una solución de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno (3,49 ml, 2,37 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Se añadió EtOAc (50 ml) y H_2O (40 ml).
 10 Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con solución hipersalina (3 x 40 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite que se fraccionó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=3:1, proporcionando 0,195 g (rendimiento: 90%) de un sólido blanco: 3-*O*-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dimetil)sulfamato BLE99069.



25 $C_{20}H_{30}N_2O_6S_2$

PM: 458,59

30 P.f.: 140°C a 142°C

RMN ¹H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,86 (s, 3H, C-18- CH_3), 1,20-2,38 (m, 13H), 2,24 (s, 3H, CH_3CO-), 2,80-2,92 (m, 2H, C-6-H), 2,88 (s, 6H, - NMe_2), 4,69 (t, 1H, J=7,8 Hz, C-17 β-H), 4,89 (s br, 2H int. D_2O , - NH_2), 7,04 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1H, J=2,7 y J=8,6 Hz, C-2-H) y 7,31 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H).

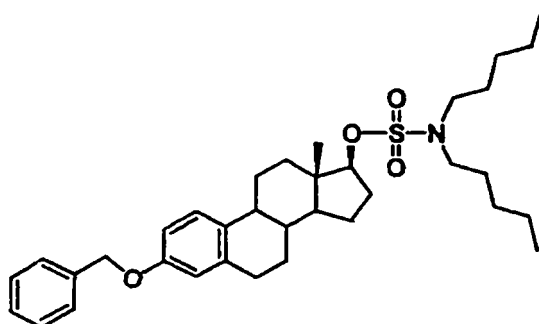
35 M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 458,2 (18, M⁺), 334,2 (100), 255,3 (13), 238,1 (17), 212,1 (9), 173,2 (12), 133,1 (12), 97,1 (12).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{20}H_{30}N_2O_6S_2$ M⁺ 458,15453, observado: 458,15371.

40	Microanálisis - Observado:	%C	52,40	%H	6,63	%N	6,06
	Teórico:		52,38		6,59		6,11

45 3-Benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dimetil)sulfamato BLE99072

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-sulfamato BLE99070 (0,40 g, 0,91 mmoles) y bromuro de pentilo (0,45 ml, 3,62 mmoles) en 12 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 , hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 72,5 mg, 1,81 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 16
 50 horas. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (30 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano y después hexano:EtOAc=9:1, proporcionando 0,49 g (rendimiento: 92,5%) de un sólido blanco: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-*O*-(*N,N*-dipentil)sulfamato BLE99072.



ES 2 323 630 T3

$C_{35}H_{51}NO_4S$

PM: 581,85

5 P.f.: 55°C a 56°C

RMN 1H 270 MHz ($CDCl_3$): 0,83 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,91 (t, 6H, $J=7,8$ Hz, $2 \times CH_2CH_2-$), 1,10-2,40 (m, 25H), 2,75-2,90 (m, 2H, C-6-H), 3,10-3,25 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,42 (t, 1H, $J=8,5$ Hz, C-17 β -H), 5,03 (s, 2H, $-OCH_2Ph$), 6,71 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 6,78 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,6 Hz, C-2-H), 7,19 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, C-1-H) y 7,26-7,48 (m, 5H, ArH).

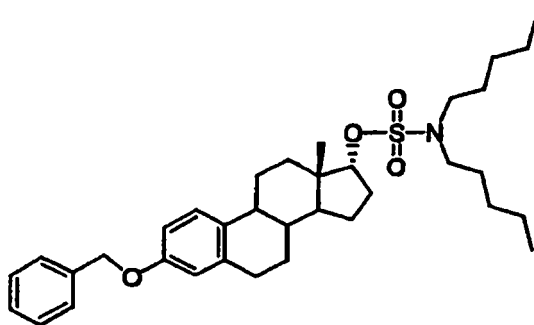
M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 581,2 (28, M^+), 345,3 (65), 249,2 (8), 91,1 (100).

15 HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{35}H_{51}NO_4S$ M^+ 581,35388, observado: 581,35217

R_f 0,69 (EtOAc:hexano=3:17), SM R_f 0,00

3-Benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00079

20 A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-sulfamato BLE00077 (0,40 g, 0,91 mmoles) y bromuro de pentilo (0,45 ml, 3,62 mmoles) en 12 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N_2 , hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 72,5 mg, 1,81 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (30 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=22 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=40:3 a 8:1, proporcionando 0,32 g (rendimiento: 61%) de un aceite incoloro: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00079.



$C_{35}H_{51}NO_4S$

45 PM: 581,85

50 RMN 1H 400 MHz ($DMSO-d_6$): 0,74 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,87 (t, 6H, $J=7,0$ Hz, $2 \times CH_2CH_2-$), 1,18-2,40 (m, 25H), 2,70-2,84 (m, 2H, C-6-H), 3,11-3,19 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,43 (d, 1H, $J=5,5$ Hz, C-17 α -H), 5,04 (s, 2H, $-OCH_2Ph$), 6,70 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 6,75 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,6 Hz, C-2-H), 7,18 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H) y 7,28-7,50 (m, 5H, ArH).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 581,3 (18, M^+), 345,3 (100), 249,2 (8), 91,1 (96).

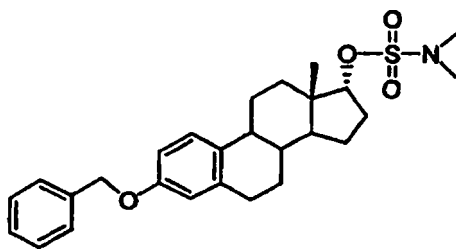
55 HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{35}H_{51}NO_4S$ M^+ 581,35388, observado: 581,35399

R_f 0,62 (EtOAc:hexano=2:20), SM R_f 0,00

3-Benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE00078

60 A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-sulfamato BLE00077 (0,40 g, 0,91 mmoles) y yoduro de metilo (0,225 ml, 3,62 mmoles) en 10 ml de DMF anhidro se le añadió, a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 , hidruro sódico (al 60% en aceite mineral, 80 mg, 1,99 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con EtOAc (50 ml), seguido de la adición de agua (30 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó adicionalmente con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano y después hexano:EtOAc=5:1, proporcionando 0,25 g (rendimiento: 59%) de un sólido blanco: 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dimetil)sulfamato BLE00078.

ES 2 323 630 T3



$C_{27}H_{35}NO_4S$

PM: 469,64

P.f.: 82°C a 86°C (dec.)

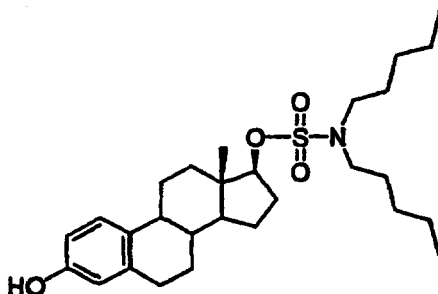
RMN 1H 400 MHz (DMSO- d_6): 0,74 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,87, (t, 6H, $J=7,0$ Hz, $2 \times CH_3CH_2-$), 1,18-2,40 (m, 25H), 2,70-2,84 (m, 2H, C-6-H), 3,11-3,19 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,43 (d, 1H, $J=5,5$ Hz, C-17 α -H), 5,04 (s, 2H, $-OCH_2Ph$), 6,70 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 6,75 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,6 Hz, C-2-H), 7,18 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H) y 7,28-7,50 (m, 5H, ArH).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 469,2 (18, M^+), 344,2 (73), 91,1 (100).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{27}H_{35}NO_4S$ M^+ 469,22868, observado: 469,22822.

3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE99073

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE99072 (0,46 g, 0,79 mmoles) en 20 ml de MeOH y 7 ml de THF, se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,15 g). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas 15 minutos bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se evaporó a presión reducida, proporcionando 0,31 g (rendimiento: 80%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17β-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE99073 en forma de sólido blanco.



$C_{28}H_{45}NO_4S$

PM: 491,73

P.f.: 93°C a 96°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,83 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,91 (t, 6H, $J=7,0$ Hz, $2 \times CH_3CH_2-$), 1,18-2,34 (m, 25H), 2,76-2,86 (m, 2H, C-6-H), 3,12-3,24 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,42 (t, 1H, $J=8,5$ Hz, C-17 β -H), 4,58 (s br, 1H int. D_2O , -OH), 6,56 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 6,62 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,2 Hz, C-2-H) y 7,14 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, C-1-H).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 491,3 (16, M^+), 255,2 (100), 159,2 (24), 133,1 (13).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{28}H_{45}NO_4S$ M^+ 491,30693, observado: 491,30741.

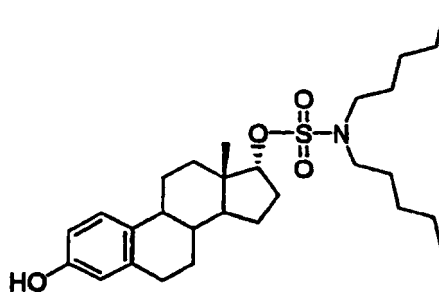
R_f 0,28 (AcOEt:hexano=3:17), SM R_f 0,69

3-Hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00082

A una solución de 3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00079 (0,31 g, 0,53 mmoles) en 15 ml de MeOH y 8 ml de THF se le añadió paladio al 10% sobre carbono (0,10 g). La mezcla de reacción se agitó durante 8 horas bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Tras filtrar el catalizador, el solvente se

ES 2 323 630 T3

evaporó a presión reducida, proporcionando 0,31 g (rendimiento: 80%) de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00082 en forma de un sólido blanco.



$C_{28}H_{45}NO_4S$

PM: 491,73

P.f.: 104°C a 107°C

RMN 1H 270 MHz (CD_3OD): 0,83 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,91 (t, 6H, $J=6,8$ Hz, $2 \times CH_3CH_2-$), 1,20-2,42 (m, 25H), 2,65-2,85 (m, 2H, C-6-H), 3,18-3,30 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,51 (d, 1H, $J=5,8$ Hz, C-17 α -H), 6,52 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 6,60 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,4 Hz, C-2-H), 7,12 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, C-1-H), 7,96 (s br, 1H int. D_2O , -OH).

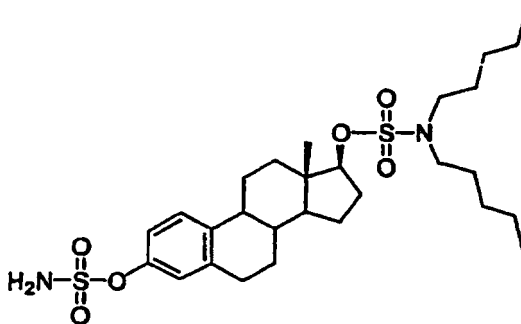
M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 491,3 (3, M^+), 475,2 (9), 391,3 (2), 255,2 (100), 159,2 (2)

M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 490,2 [3, (M-H)], 335,1 (10), 236,2 (100), 80,0 (12).

HRMS (FAB negativo) m/z calculado para $C_{28}H_{44}NO_4S$ (M-H) $^-$ 490,29911, observado: 490,29850

R_f 0,40 (AcOEt:hexano=1:4)

3-O-Sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00074



A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE99073 (0,26 g, 0,54 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (15 ml) se le añadió, a temperatura ambiente, 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridina (DBMP) (0,33 g, 1,61 mmoles) y gota a gota, con una jeringa, se añadió una solución de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno (3,95 ml, 2,69 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió EtOAc (50 ml) y H_2O (50 ml). Tras separar la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite que se fraccionó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna= 3 cm, h=21 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=5:1, proporcionando 0,27 g (rendimiento: 89%) de un sólido blanco: 3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 β -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00074. $C_{28}H_{46}N_2O_6S_2$

PM: 570,80

P.f.: 105°C a 107°C

RMN 1H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,83 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,91 (t, 6H, $J=7,0$ Hz, $2 \times CH_3CH_2-$), 1,18-2,38 (m, 25H), 2,82-2,93 (m, 2H, C-6-H), 3,12-3,26 (m, 4H, $2 \times N(CH_2)$), 4,43 (t, 1H, $J=7,8$ Hz, 17 β -H), 4,89 (s br, 2H incl. D_2O , - NH_2), 7,04 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1H, $J=2,7$ y 8,6 Hz, C-2-H) y 7,31 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H).

M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 569, 2 (2, [M-H] $^+$), 491,3 (2), 335,1 (100), 255,3 (9), 238,1 (18), 212,1 (7), 159,2 (8), 133,1 (6).

ES 2 323 630 T3

M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 569,2 [100, (M-H)], 236,2 (32), 96,0 (6), 78,0 (28).

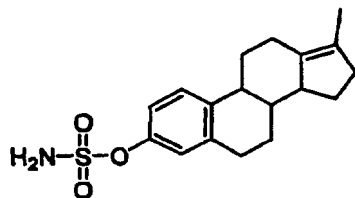
HRMS (FAB negativo) m/z calculado para $C_{28}H_{45}N_2O_6S_2$ (M-H)⁻ 569,27191, observado: 569,27386.

5	Microanálisis - Observado:	%C	59,10	%H	4,84	%N	8,29
	Teórico:		58,92		4,91		8,12

10 *3-O-Sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083*

15 A una solución de 3-hidroxiestra-1,3,5(10)trien-17 α -O(N,N-dipentil)sulfamato BLE00082 (0,17 g, 0,34 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) se le añadió, a temperatura ambiente, 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridina (DBMP) (0,21 g, 0,10 mmoles) y gota a gota, con una jeringa, una solución de cloruro de sulfamoilo 0,7 M en tolueno (2,51 ml, 1,71 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Se añadió EtOAc (50 ml) y H_2O (50 ml). Tras separar la capa acuosa, se lavó la capa orgánica con solución hipersalina (3 x 50 ml), se secó ($MgSO_4$), se filtró y se evaporó, proporcionando un aceite que se fraccionó mediante cromatografía flash (\varnothing de columna=3 cm, h=20 cm) utilizando como eluyente, hexano:EtOAc=1:4, después 1:3, proporcionando 0,03 g (rendimiento: 26%) de un sólido blanco, 17-metil-gona-1,3,5(10),13(17)-tetraen-3-O-sulfamato BLE00083A y 0,05 g (rendimiento: 26%) de un aceite incoloro: 3-O-sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083B.

25 *17-Metil-gona-1,3,5(10),13(17)-tetraen-3-O-sulfamato BLE00083A*



35 $C_{18}H_{23}NO_3S$

PM: 333,45

Pf.: 172°C a 176°C

40 RMN ¹H 400 MHz ($CDCl_3$): 0,96-1,43 (m, 4H), 1,64 (2, 3H, C-17- CH_2), 1,92-2,51 (m, 8H), 2,68 (m, 1H, C-12 β -H), 2,83 (m, 2H, C-6 α,β -H), 4,88 (s br, 2H int. D_2O , $-NH_2$), 7,02 (d, 1H, J=2,7 Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1h, J=2,7 y 8,6 Hz, C-2-H) y 7,35 (d, 1H, J=8,6 Hz, C-1-H).

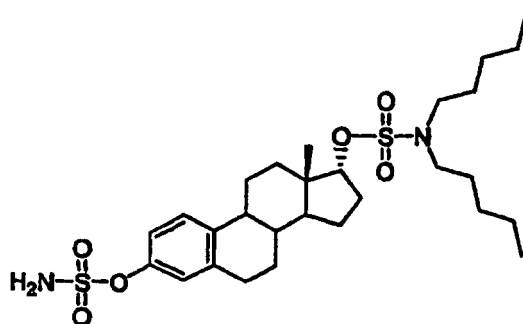
45 M/S m/z (FAB positivo, rel. int.): 333,2 (100, M⁺), 254,2 (12), 236,1 (15), 157,1 (11), 133,1 (10).

HRMS (FAB positivo) m/z calculado para $C_{18}H_{23}NO_3S$ M⁺ 333,139866, observado: 333,13900

50	Microanálisis - Observado:	%C	64,50	%H	6,99	%N	4,13
	Teórico:		64,84		6,95		4,20

R_f 0,42 (AcOEt:hexano=1:3), SM R_f 0,47

55 *3-O-Sulfamoil-estra-1,3,5(10)-trien-17 α -O-(N,N-dipentil)sulfamato BLE00083B*



ES 2 323 630 T3



PM: 570,80

5 RMN ^1H 400 MHz (CDCl_3): 0,77 (s, 3H, C-18- CH_3), 0,91 (t, 6H, $J=7,0$ Hz, $2\times\text{CH}_3\text{CH}_2-$), 1,20-2,42 (m, 25H), 2,78-2,94 (m, 2H, C-6-H), 3,12-3,26 (m, 4H, $2\times\text{N}(\text{CH}_2)$), 4,54 (d, 1H, $J=5,9$ Hz, C-17 α -H), 5,08 (s br, 2H int. D_2O , $-\text{NH}_2$), 7,04 (d, 1H, $J=2,7$ Hz, C-4-H), 7,08 (dd, 1H, $J=2,7$ y $8,6$ Hz, C-2-H) y 7,31 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, C-1-H).

10 M/S m/z (FAB negativo, rel. int.): 569,3 [100, (M-H) $^-$], 334,2 (5), 236,2 (66), 78,0 (24).

HRMS (FAB negativo) m/z calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ (M-H) $^-$ 570,27191, observado: 569,27272

R_f 0,40 (AcOEt:hexano=1:3), SM R_f 0,47

15 *Datos biológicos*

Los datos biológicos se obtuvieron de acuerdo con los protocolos STS anteriores y los ensayos siguientes.

20 *Ensayo de formación de microvasos*

El presente ensayo se llevó a cabo utilizando el "AngioKit".

25 El Angiokit es una placa de 24 pocillos con HUVEC cocultivados dentro de un lecho de fibroblastos humanos adultos en medio optimizado (TCS Cellworks, UK).

30 El Angiokit se incubó a 37°C bajo atmósfera humidificada de 5% de CO_2 durante todo el experimento. El día 1, el medio se aspiró y se sustituyó por el medio experimental (preequilibrado a 37°C con atmósfera humidificada de 5% de CO_2 durante 30 minutos) y se prepararon las diluciones de fármaco en el medio optimizado caliente. Los días 4, 7 y 9, el medio se cambió y se añadieron fármacos frescos tal como el día 1. Se utilizó suramin (20 μM) como control negativo y VEGF (2 ng/ml) como control positivo.

35 El día 11, las células se fijaron y se tiñeron. El medio se aspiró y se lavó cada pocillo con 1 ml de tampón de lavado solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato. Se añadió 1 ml de etanol al 70% (-20°C) a cada pocillo para fijar las células. Los pocillos se lavaron a continuación con un tampón de bloqueo de 1 ml (1x tampón de lavado suplementado con 1% de BSA (Sigma, UK)). Las células se tiñeron con factor de von Willebrand. Se añadieron 0,5 ml de anticuerpo primario diluido (1:200 en tampón de bloqueo) (de oveja anti-von Willebrand humano, TCS Cellworks, UK) a cada pocillo y la placa se incubó a 37°C durante 1 hora. A continuación los pocillos se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de bloqueo antes de añadir a cada pocillo 0,5 ml de conjugado de anticuerpo secundario diluido (1:400 en tampón de bloqueo) (de burro anti-conjugado de IgG de oveja-peroxidasa de rábano picante, TCS Cellworks, UK). La placa se incubó durante una hora adicional a 37°C. Después, los pocillos se lavaron tres veces con H_2O destilada. A continuación, se añadieron 0,5 ml de 3,3'-diamino-benzidina tetrahidrocloruro (DAB) sustrato metálico 1:10 en tampón de sustrato (TCS Cellworks, GB) a cada pocillo, incubando a 37°C hasta que los túbulos desarrollaron un color marrón oscuro (aproximadamente 30 minutos). A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con 1 ml de H_2O destilada y se dejaron secar al aire.

50 A continuación, se puntuó manualmente a partir de la inspección visual el grado de formación de los túbulos. Se trazó una cuadrícula en la parte posterior de la placa utilizando un rotulador de punta fina (ver la figura 2.1). Se adaptó un ocular de retícula Chalkley (Pyser SGI Ltd., UK) al microscopio y se utilizó una magnificación reducida para escanear 24 áreas potenciales de recuento (donde interseccionan las líneas de la retícula) y se realizaron recuentos de los cinco que aparentemente presentaban la máxima formación de túbulos. El ocular presentaba 25 puntos, cada punto que se solapa con un túbulo cuenta como uno. Se repitió esta operación para cada pocillo.

55

60

65

R	X	Y	Código Cpd	STX	Crecimiento de células T47D, % de inhibición		Microsomas placentarios, % de inhibición		Ensayo en placa, % de inhibición		
					10 μ M	10 nM	1 μ M	10 nM	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
OH	H	C- β -OSO ₂ NH ₂ , α -H	BLE99031A	48			5,1 ¹	0,5 ¹	21	24	46
OH	H	C- β -OSO ₂ NHAc, α -H	BLE99058	42			7,8 ¹	0,9 ¹	4	1	20
OH	H	C- β -OSO ₂ N(Me) ₂ , α -H	BLE99067	43			8,7 ¹	-0,1 ¹	-5	-1	50
OH	H	C- β -OSO ₂ N(pentil) ₂ , α -H	BLE99073	22			-11,8 ²	1,2 ²			
OH	H	C- α -OSO ₂ N(pentil) ₂ , β -H	BLE00082	23			-22,0	-28,0	6	24	7
OH	H	C- β -OSO ₂ N(Bn) ₂ , α -H	BLE99060	40			1,36 ²	-3,2 ²			
OH	H	C- α -OSO ₂ N(Bn) ₂ , β -H	BLE99066	41			4,5 ¹	1,4 ¹	11	5	27
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OH, α -H	BLE00084	28					4	14	23
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OSO ₂ NH ₂ , α -H	BLE99031B	49			IC50 20 Nm		7	12	32
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OSO ₂ NHAc, α -H	BLE99065	46			91,0 ¹	9,8 ¹	7	5	23
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OSO ₂ N(Me) ₂ , α -H	BLE99069	47			96,3 ¹	30,3 ¹	3	10	73
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OSO ₂ N(pentil) ₂ , α -H	BLE99074				23,7 ¹	-9,3 ²			
OSO ₂ NH ₂	H	C- α -OSO ₂ N(pentil) ₂ , β -H	BLE00083B	25			52,5	-9,3	8	1	24
OSO ₂ NH ₂	H	C- β -OSO ₂ N(Bn) ₂ , α -H	BLE99063	44			38,2 ¹	-1,9 ¹	0	15	69
OSO ₂ NH ₂	H	C- α -OSO ₂ N(pentil) ₂ , β -H	BLE99068	45			58,2 ¹	4,9 ¹	-18	-1	19
OH	OMe	C- β -OH, α -Bn	BLE01014	98					-14	-14	ND
OSO ₂ NH ₂	OMe	C- β -OH ₂ , α -Bn	BLE01018	100			IC50 430 nM		-19	-12	ND
OH	OMe	C- β -OH, α -(4'-tBu)Bn	BLE01008	99					-12	-15	ND
OSO ₂ NH ₂	OMe	C- β -OH, α -(4'-(tBu)Bn)	BLE01016	101			IC50 4300 nM		-14	-10	-3
OSO ₂ NH ₂	OMe	C- β -OSO ₂ NH ₂ , α -H	†				IC50 32 nM		7	12	32
OSO ₂ NH ₂	OEt	C- β -OSO ₂ NH ₂ , α -H					IC50 1 μ M		7	12	32
			BLE00086	26		93,2			8	3	14
			2-MeOE1						6	7	73
			2-MeOEMATE						15	42	88
			2-MeOE2						-2	19	66
			2-EtE1						-1	-2	66
			2-EtEMATE						36	51	60
			Taxol						46	96	91

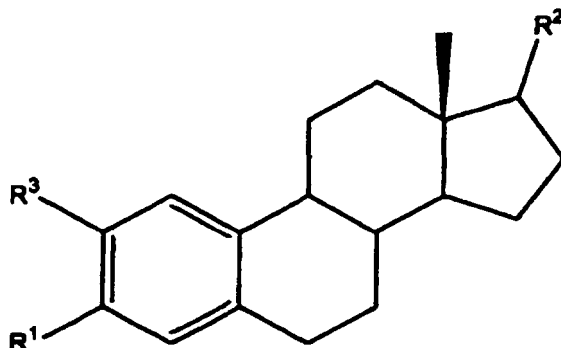
¹667COUMATE 1 μ M 99,3, 10 nM 89,9; EMATE 1 μ M 98,0, 10 nM 56,1

²EMATE 1 μ M 96,9, 10 nM 30,4 % positivo significa "estimulación"

† compuesto según la invención reivindicada

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I:



5

10

15

20

en la que R¹ es OSO₂NH₂, R² es β-OSO₂NH₂ y R³ es OMe o Et.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es OMe.

25

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es Et.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, destinado a la utilización en medicina.

30

5. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, opcionalmente mezclado con un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

6. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la terapia de una afección o enfermedad asociada a STS y/o al ciclo celular y/o a la apoptosis y/o al crecimiento celular.

35

7. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de un medicamento destinado a la utilización en la terapia de una afección o enfermedad asociada a niveles adversos de STS y/o al ciclo celular y/o a la apoptosis y/o al crecimiento celular.

40

45

50

55

60

65