(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 190 776**

(21) Número de solicitud: 200300931

(51) Int. Cl.[7]: **C07J 41/00**
A61P 35/00

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **19.07.2001**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2003**

Fecha de la concesión: **18.08.2005**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2005**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **01.10.2005**

(62) Número de la solicitud inicial: **200101747**

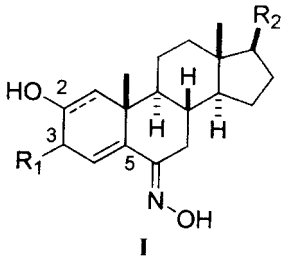
(73) Titular/es: **Universidade da Coruña**
O.T.R.I, Escuela de Caminos
Campus de Elviña
15071 A Coruña, ES

(72) Inventor/es: **Rodríguez González, Jaime y**
Jiménez González, Carlos

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Nuevos 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides. Procedimiento de obtención y su aplicación como agentes citotóxicos.**

(57) Resumen:
Nuevos 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides. Procedimiento de obtención y su aplicación como agentes citotóxicos. 2-Hidroxi-6E-hidroximinoesteroides con fórmula I -en donde R_1 puede ser H, OH, ceto, o alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado; R_2 puede ser H, OH, alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado y - - - - - representa un doble enlace opcional-, preparación y uso como agentes citotóxicos: De particular interés son 3: enlace sencillo entre 1-2, R_1=ceto, α-OH en 2, R_2 es la cadena lateral de colesterol; 4: enlace sencillo entre 1-2, R_1=ceto, β-OH en 2, R_2 es la cadena lateral de colesterol; (5) enlace sencillo entre 1-2, R_1=α-OH, α-OH en 2, R_2 es la cadena lateral de colesterol; (6) enlace sencillo entre 1-2, R_1=β-OH, β-OH en 2 y R_2 es la cadena lateral de colesterol; (7) doble enlace entre 1-2, R_1=ceto y R_2 es la cadena lateral de colesterol.
A partir de colesterol mediante tosilación, epoxidación, eliminación, dihidroxilación, diacetilación y hidroximinación se obtienen 5 y 6 los cuales son oxidados a 3, 4 y 7.



I

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

ES 2 190 776 B1

DESCRIPCION

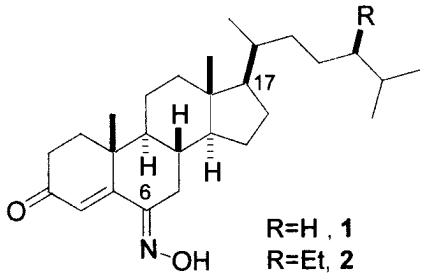
Nuevos 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides. Procedimiento de obtención y su aplicación como agentes citotóxicos.

Objeto de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de los esteroides bioactivos con posible interés terapéutico por su carácter citotóxico frente a la líneas tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano), y en particular en la preparación de nuevos 6*E*-hidroximinoesteroides a partir de esteroides comerciales.

Estado de la técnica anterior a la invención

Han sido muchos los esteroides de origen natural aislados de organismos marinos. No obstante, y a pesar de sus novedosas e interesantes estructuras, no se ha aislado ninguno en cuyo esqueleto esferoidal estuviese presente un grupo oxima. Esto ha sido así hasta el aislamiento de los compuestos 1 y 2 aislados de dos especies diferentes de la esponja *Cynachirella*[1] De los dos compuestos, 6*E*-hidroximino-24-etilcolest-4-en-3-ona (1) mostró una marcada actividad citotóxica frente a las líneas tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano).



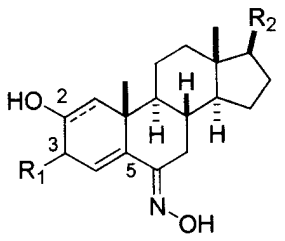
Es de destacar que a pesar que no tienen precedentes como productos naturales, los esteroides que contienen un grupo hidroximino han sido obtenidos únicamente de manera sintética (2-hidroximinoesteroides, 3-hidroximinoesteroides, 4-hidroximinoesteroides y 6-hidroximinoesteroides), siendo algunos de ellos utilizados en estudios fotoquímicos para la síntesis de lactamas[2,3]. Entre el grupo de los 6*E*-hidroximinoesteroides sintéticos tenemos que destacar el compuesto 6*E*-hidroximino-4-androsten-3-ona, que presenta una gran afinidad por la aromatasa presente en la placenta humana, comportándose como inhibidor de esta enzima[4], y como inhibidor específico en la biosíntesis de estrógeno[5]. Pero hasta la fecha ninguno de ellos ha sido descrito como agente citotóxico.

Descripción

De particular interés en el campo de esta invención y de los esteroides es la Preparación de 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides, y de una manera especial análogos que puedan incrementar la actividad citotóxica frente a las líneas tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano) tal como se describirá en las reivindicaciones.

La presente invención, tal como se indica en su enunciado, se refiere a nuevos 6*E*-hidroximinoesteroides funcionalizados, el procedimiento para su preparación a partir de esteroides comerciales y sus aplicaciones como agentes citotóxicos frente a las líneas celulares antes citadas.

Los compuestos se caracterizan por una fórmula general I



I

en donde R_1 puede ser hidrógeno, hidroxilo, ceto, o alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado.

R_2 puede ser hidrógeno, hidroxilo, alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado.

----- representa un doble enlace opcional.

Esta invención describe la síntesis de varios compuestos con las siguientes estructuras:

Enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es un grupo ceto, el OH de la posición 2 está situado en la cara α, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 3.

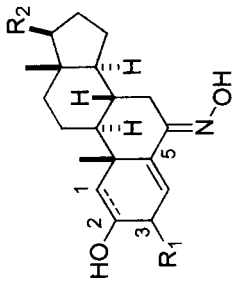
Enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es un grupo ceto, el OH de la posición 2 está situado en la cara β, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 4.

Enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es α-OH, el OH de la posición 2 está situado en la cara α y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 5.

Enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es β-OH, el OH de la posición 2 está situado en la cara β, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 6.

Enlace entre los carbonos 1 y 2 es doble, R_1 es un grupo ceto y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 7.

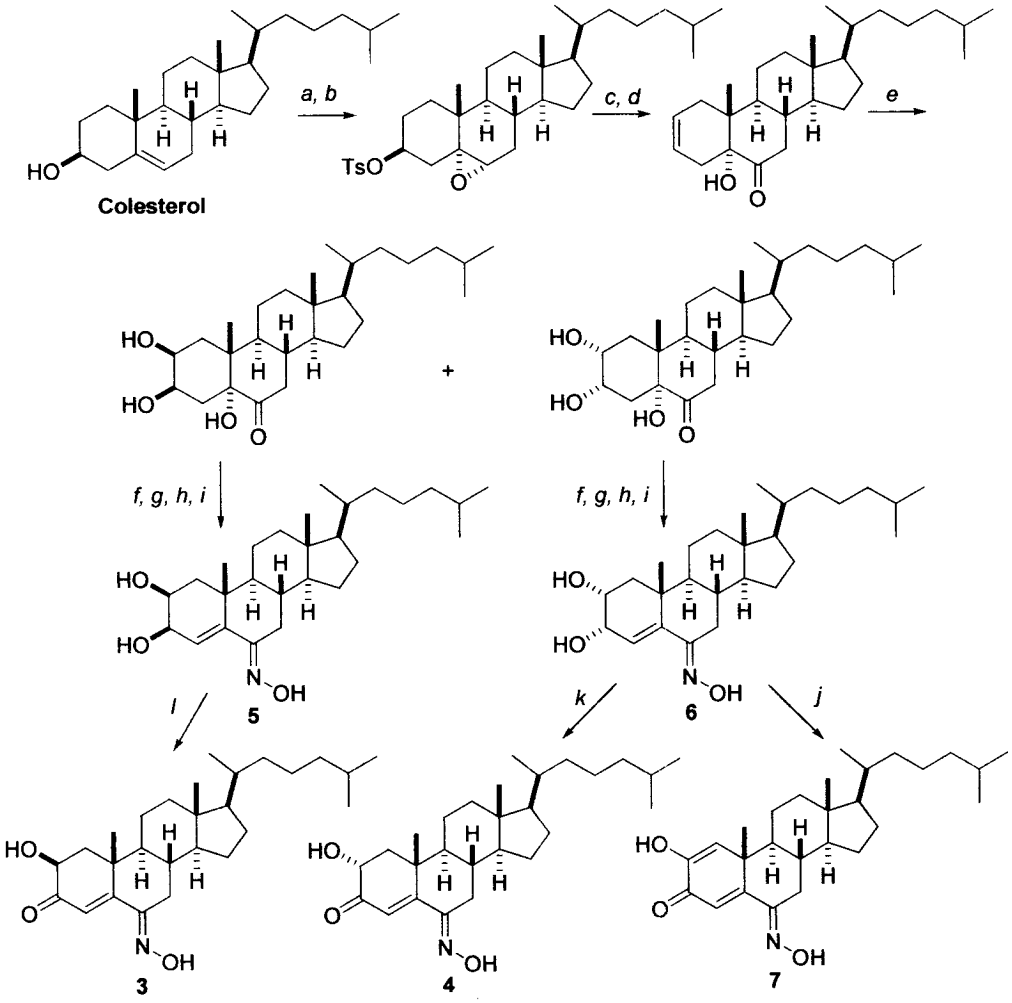
(Ver Tabla en página siguiente)



I

COMPUESTO	R_1	Enlace 1-2	Hidroxilo en 2	R_2	Nombre
3	=O	sencillo	α		2α-hidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona
4	=O	sencillo	β		2β-hidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona
5	β-OH	sencillo	α		2α,3α-dihidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona
6	β-OH	sencillo	β		2β,3β-dihidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona
7	=O	doble	-		2-hidroxi-6*E*-hidroximinocolest-1,4-dien-3-ona

Los compuestos 3-7 se sintetizan mediante una ruta general tal como se muestra en el esquema 1.



Reactivos y condiciones: (a) TsCl, Py (98%). (b) MCPBA, CH_2Cl_2 (97%). (c) CrO_3, H_2O (90%). (d) LiBr, DMF, reflujo (93%). (e) OsO_4, NMO, THF, *t*-BuOH, H_2O, (65%). Separación cromatográfica. (f) Ac_2O, Py. (g) $SOCl_2$, Py. (h) KOH, MeOH. (i) $NH_2OH.HCl$, EtOH, H_2O (49% en cuatro pasos para **5**, 46% en cuatro pasos para **6**) (j) MnO_2, $CHCl_3$ (50%). (k) CrO_3, H_2O (46%), (l) MnO_2,$CHCl_3$ (52 %).

Esquema 1

El método objeto de síntesis tanto de 3, 4, 5, 6 y 7 comienza partiendo de colesterol el cual se convierte casi cuantitativamente en su derivado 3-tosilado que se epoxidó con ácido *m*-cloroperbenzoico para dar el epóxido con un elevado rendimiento Tras la apertura del grupo epóxido y con la eliminación selectiva del grupo tosilato con Bromuro de litio en doclorometano se obtuvo la 5α-hidroxi-2-colesten-6-ona intermedio que se dihidroxiló con tetraóxido de osmio y *N*-metilmorfolina para dar lugar a un par de diasteroisómeros que tras su separación cromatográfica se convirtieron en productos claves para la para su posterior transformación en los 2-hidroxi-6E-hidroximinoesteroides. Uno de los diasteroisómeros, el 2α, 3α, 5α-trihidroxi-colestan-6-ona se protegió sus hidroxilos en 2 y 3 mediante acetilación con anhídrido acético en piridina, se eliminó el grupo hidroxilo en la posición 5, y se desprotegieron los acetatos. Al 2α,3α-dihidroxiderivado se sometió a hidroximinación con clorhidrato de hidroxilamina en etanol acuoso para obtener el Compuesto 6. La oxidación de este con dióxido de manganeso dio lugar al compuesto 7 con un rendimiento moderado. Sorprendentemente la oxidación con trióxido de cromo del compuesto 6 condujo al 2α-hidroxi-6E-hidroximino-4-colesten-3-ona (Compuesto 4).

Mediante la misma secuencia de reacciones (pasos f-i) aplicadas sobre la 2β, 3β, 5β-trihidroxi-colestan-6-ona, es decir protección como diacetatos, eliminación, desprotección e hidroximinación, se obtuvo el Compuesto 5. Para la oxidación del hidroxilo a cetona en la posición 3 y obtener el Compuesto 3 se utilizó dióxido de manganeso en cloroformo.

Todos los compuestos preparados fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad frente las líneas tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano) y tal como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Valores de citotoxicidad expresados en IC_{50} en $\mu g/mL$

Compuesto	P-388	A-549	HT-29	MEL-28
3	0.25	0.125	0.25	0.125
4	0.25	0.125	0.25	0.125
5	1.25	1.25	1.25	1.25
6	1.25	1.25	1.25	1.25
7	0.5	0.125	0.25	0.125

Método de realización de la invención

A modo ilustrativo y no limitativo del procedimiento de obtención expuesto en la presente memoria, se detallan a continuación unos ejemplos de preparación de algunos de los compuestos:

Ejemplo 1

Síntesis de 2$\underline{\alpha}$,3$\underline{\alpha}$-dihidroxi-6$\underline{E}$-hidroximinocolest-4-eno (Compuesto 6), 2-hidroxi-6$\underline{E}$-hidroximinocolesta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 7) y 2$\underline{\alpha}$-hidroxi-6$\underline{E}$-hidroximinocolest-4-eno (Compuesto 4)

Esquema 1 Pasos a-b

Se disuelven 1.5 g (3.88 mmol) de colesterol y 1.9 g (9.97 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo en 20 mL de piridina seca y se deja con agitación a temperatura ambiente durante 22 horas. Se vierte la reacción sobre 200 mL de una disolución $NaHCO_3$ (5 %), formándose un precipitado blanco que es filtrado a vacío, lavado con agua, secado y purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc [(9:1), (8:2)], recogiéndose 2.0 g de 3β-*p*-toluensulfonil-5-colesteno, 95 %. Se disuelven 1.53 g (8.87 mmol) de ácido m-cloroperbenzoico en 25 mL de diclorometano y se mantienen en baño de hielo con agitación. Sobre la mezcla anterior se añaden, gota a gota, 2.0 g (3.7 mmol) de 3β-*p*-toluensulfonil-5-colesteno disueltos en 20 mL de diclorometano. Después de 30 minutos se lleva la reacción a temperatura ambiente y queda así durante 22 horas. Se vierte la reacción sobre 700 mL de disolución Na_2SO_3 (5 %) en baño de hielo-agua, se realizan dos extracciones con 100 mL de diclorometano, las cuales son lavadas con 100 mL de agua y secadas sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc [(9:1), (8:2)], recogiéndose 1.84 g de una mezcla de diasteroisómeros 3β-tosil-5α,6α-epoxi-colestano y 3βtosil-5β,6β-epoxi-colestano en relación 5:1 respectivamente, sólido blanco, 89 %.

Esquema 1 Pasos c-d-e

Se disuelven 1.83 g (3,28 mmol) de la mezcla de epóxidos obtenidos en el paso b en 40 mL de etilmetilcetona y se mantienen en baño de hielo con agitación. Sobre la disolución anterior se adicionan, gota a gota, 1.2 g (12 mmol) de trióxido de cromo disueltos en 3.7 mL de agua y tras 10 minutos se lleva la reacción a temperatura ambiente. En estas condiciones se repite una adición igual a la anterior. Después de 2 horas se adicionan 25 mL de isopropanol para detener la reacción. Se pasa a través de zelita, se lava con disolución saturada de NaCl y se seca sobre $MgSO_4$ anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado a través de una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3), obteniéndose 1.54 g de 3β-tosil-5α-hidroxi-colesten-6-ona, sólido blanco, 83 %.

Se disuelven 1.54 g (2.68 mmol) de 3β-*p*-toluensulfonil-5α-hidroxi-colestan6-ona y 0.63g (7.25 mmol) de bromuro de litio en 40 mL de dimetilformalmida seca, dejando la mezcla bajo atmósfera de argon y en ausencia de luz, con agitación y a reflujo durante 2 horas. Se vierte la reacción en 250 mL de agua, formándose un precipitado que es extraído dos veces con 40 mL de acetato de etilo, lavado con HCl (5 %), $NaHCO_3$ (5 %), agua y secado sobre $MgSO_4$ anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente se obtiene un sólido, que se pasa a través de una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (8:1), obteniéndose 1.0 g de 5α-hidroxi-2-colesten-6-ona, sólido blanco, 83 %.

Se disuelven 10.00g (85.3 mmol) de *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO) y 5.18g (15.2 mmol) de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio en la siguiente mezcla de disolventes: 43 mL de *terc*-butanol, 9 mL de agua y 37 mL de tetrahidrofurano (libre de peróxidos). Mientras se mantiene la mezcla anterior a 0°C, en ausencia de luz, bajo atmósfera de argon y con agitación, se añaden 0.25 g (0.98 mmol) de tetraóxido de osmio y luego, gota a gota, 1.00 g (2.49 mmol) de 5α-hidroxi-2-colesten-6-ona disueltos en 20 mL de tetrahidrofurano (libre de peróxidos). Se deja a agitación durante 86 horas. Se vierte la reacción en 300 mL de una disolución Na_2SO_3(5 %) y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora, se realizan dos extracciones con 300 mL de diclorometano y se concentran a sequedad, los extractos son redisueltos en 400 mL de acetato de etilo, lavados con las siguientes disoluciones: H_2SO_4 (5M), $NaHCO_3$ (saturada), NaCl (saturada) y secados sobre $MgSO_4$. Tras filtrar y eliminar el disolvente se obtienen 0.80g de un sólido, que se pasa a través de una columna cromatográfica "flash" de silicagel con CH_2Cl_2: acetona [(95:5), (90:10), (80:20), (70:30), (50:50)] , obteniéndose 0.71 g (65 %), de los cuales 0.40 g de 2β, 3β, 5α-trihidroxi-colesten-6-ona y 0.31g de 2α,3α, 5α-trihidroxicolestan-6-ona, ambos sólidos blancos.

Esquema 1 Pasos f-g-h-i, para 2α, 3α, 5α-trihidroxi-colesten-6-ona

Se disuelven 0.40g (0.92 mmol) de 2α,3α,5α-trihidroxi-colesten-6-ona en 30 mL de una mezcla al 50 % de anhídrido acético-piridina y se deja reaccionando a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas. Se elimina a presión reducida el disolvente de la reacción y el sólido resultante es redisuelto con 30 mL de acetato de etilo, lavado con 30 mL de disolución saturada de $NaHCO_3$, 30 mL de HCl (5 %) y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3), obteniéndose 0.38g de 2α,3α-diacetoxi-5α-hidroxi-colesten-6-ona, sólido blanco, 80 %.

Se disuelven 0.37g (0.71 mmol) de 2α, 3α-diacetoxi-5α -hidroxi-colesten-6-ona obtenida en la reacción anterior en 15 mL de piridina seca y se ponen en baño de hielo con agitación. Sobre la disolución anterior se adicionan, gota a gota, 0.26 mL (3.56 mmol) de cloruro de tionilo y después se lleva la reacción a temperatura ambiente y se deja reaccionando durante 2 horas. Se vierte la reacción sobre 60 mL de agua, formándose un precipitado que es extraído dos veces con 20 mL de acetato de etilo, lavado tres veces con disolución HCl (5 %), una vez con disolución saturada de NaCl y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (8:2), obteniéndose 0.32g de 2α, 3α-diacetoxi-4-colesten-6-ona, sólido blanco, 90 %.

Se disuelven 0.31g (0.62 mmol) de 2α,3α-diacetoxi-colesten-6-ona en 20 mL de una disolución al 10 % de KOH:MeOH, se deja reaccionando con agitación y bajo atmósfera de argon a temperatura ambiente durante 1 hora. Se vierte la reacción sobre un baño de agua-hielo (aprox. 50g), formándose un precipitado que es extraído dos veces con 20 mL de acetato de etilo, lavado dos veces con disolución saturada de NaCl y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" con Hexano: EtOAc [(7:3), (1:1), (3:7)], recogiéndose 0.21g de 2α, 3α-dihidroxi-4-colesten-6-ona, sólido blanco, 80 %.

Se disuelven 0.20g (0.48 mmol) de 2α,3α-dihidroxi-4-colesten-6-ona en 20 mL de etanol, sobre los que se añaden 0.39g (5.6 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina disueltos en 4 mL de una mezcla al 50 % de etanol-agua. Por último, se adiciona una disolución de 0.49g (3.6 mmol) de acetato sódico trihidratado en 6 mL de una mezcla al 50 % de etanol-agua y queda todo agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Se elimina el etanol de la reacción a presión reducida y el resto es extraído dos veces con 30 mL de 50 % EtOAc: H_2O, la fase orgánica secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" con Hexano: EtOAc [(8:2), (7:3), (1:1), (3:7)] , obteniéndose 0.17 g de 2α,3α-dihidroxi-6*E*hidroximinocolest-4-eno (Compuesto 6), sólido blanco, 82 %. ^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 5.93 (H-4, 1H, d, *J*= 5.4 Hz); 4.17 (H-3, 1H, t, *J* = 4.4 Hz); 3.89 (H-2, 1H, dt, *J*= 3.9 Hz y 12.7 Hz); 3.34 (H-7β, 1H, dd, *J*= 4.4 y 10.2 Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.92 (H-21, 3H, d, *J*= 6.8 Hz); 0.88 (H-26, H-27, 6H, d, *J*= 6.3 Hz); 0.68 (H-18, 3H, s). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C:159.0 (C-6, s); 146.3 (C-5, s); 122.5 (C-4, d); 66.8 (C-3,

d); 65.9 (C-2, d). EIMS (70 eV, *m/z*%): 431 (M, 10); 414 (M -OH, 47); 413 (M -H_2O, 11); 400 (M-NOH, 13); 396 (M - H_2O- OH, 30); 382 (M -H_2O - NOH, 11).

Esquema 1 Paso j

Se disuelven 0.10g (0.23 mmol) de 2α,3α-dihidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesteno y 0.39g (4.55 mmol) de dióxido de manganeso activado en 25 mL de cloroformo seco. Se dejan reaccionando bajo atmósfera de argon y a temperatura ambiente durante 17 horas. Se filtra la reacción a través de zelita, se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un sólido amarillo, que se purifica mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc [(8:2), (7:3), (1:1), (3:7)] , recogiéndose 50mg de 2-hidroxi-6*E*-hidroximino-1, 4-colest-dien-3-ona (Compuesto 7), sólido amarillo, 50 %.^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.72 (H-1, 1H, s); 6.42 (H-4, 1H, s); 3.47 (H-7β, 1H, dd, J= 4.4 Hz and 11.2 Hz); 0.95 (H-19, 3H, s); 0.92 (H-21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H-26, H-27, 6H, d, J= 6.8 Hz); 0.73 (H-18, 3H, s). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_c: 181.8 (C-3, s); 163.7 (C-6, s); 156.3 (C-5, s); 146.4 (C-2, s); 124.1 (C-1, d); 121.5 (C-4, d); 56.1; 56.0; 49.8; 44.5; 42.8; 39.4; 39.2; 36.0; 35.7; 33.2; 30.4; 28.1; 28.0; 24.1; 23.8; 23.3; 22.8 (C-26, q); 22.5 (C-27, q); 19.9 (C-21, q); 18.6 (C-19, q); 12.0 (C-18, q). EIMS (70 eV, m/z %): 427 (M, 65); 410 (M - H_2O, 48).

Esquema 1 Paso k

Sobre 80 mg (0.80 mmol) de trióxido de cromo, en baño de hielo, se añaden 2 mL de piridina, permaneciendo la mezcla con agitación durante 20 minutos. Sobre la anterior disolución se adicionan, gota a gota, 20 mg (0.046 mmol) de 2α3α-dihidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesteno (Compuesto 6) disueltos en 2 mL de piridina. Se lleva la reacción a temperatura ambiente y queda reaccionando durante 1 hora. Se vierten 5 mL de acetato de etilo sobre la reacción, que es filtrada, lavada con disolución de HCl (10 %), $NaHCO_3$ (10 %), disolución saturada de NaCl y secada sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc [(8:2), (7:3), (1:1), (3:7)], recogiéndose 9.2 mg de 2β-hidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona (Compuesto 4), sólido amarillo, 46 %. ^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.24 (H-4, 1H, s); 4.35 (H-2,1H, dd, *J*= 5.4 Hz y 7.8 Hz); 3.40 (H-7β, 1H, dd, *J* = 3.9Hz y 11.2Hz); 2.41 (H-1α, 1 H, dd, *J* = 5.4 Hz y 7.3 Hz); 1.13 (H-19, 3H, s); 0.92 (H-21, 3H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.87 (H-26, H-27, 6H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.71 (H-18, 3H, s).^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 199.9 (C-3, s); 162.8 (C-6, s); 156.8 (C-5, s); 119.9 (C-4, d); 69.6 (C-2, d); 56.4; 55.9; 51.8; 42.5; 40.9; 39.4; 39.1; 36.0; 35.7; 32.6; 29.7; 29.6; 28.1; 28.0;.23.9; 23.8; 22.8 (C-26, q); 22.5 (C-27, q); 20.7 (C-21, q); 18.6 (C-19, q); 17.3; 11.9 (C-18, q). EIMS (70 eV, *m/z*%): 411 (M - H_2O, 10); 384 (M - NOH - Me, 63).

Ejemplo 2

Síntesis de 2$\underline{\beta}$, 3β-dihidroxi-6$\underline{E}$-hidroximinocolest-4-eno (Compuesto 5) y 2$\underline{\beta}$-hidroxi-6$\underline{E}$-hidroximino-4-colesten-3-ona (Compuesto 3)

Esquema 1 Pasos f-g-h-i, para 2β, 3β, 5α-trihidroxi-colestan-6-ona

Se disuelven 0.30 g (0.62 mmol) de 2β,3β,5α-trihidroxi-colestan-6-ona en 20 mL de una mezcla al 50 % de anhídrido acético-piridina y se deja reaccionando a 100°C durante 3 horas. Se elimina a presión reducida el disolvente de la reacción y el sólido resultante es redisuelto con 20 mL de acetato de etilo, lavado con 30 mL de disolución saturada de $NaHCO_3$, 20 mL de HCl (5 %) y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3), obteniéndose 0.25g de 2β,3β-diacetoxi-5α-hidroxi-colestan6-ona, sólido blanco, 70 %.

Se disuelven 0.24g (0.46 mmol) de 2β,3β-diacetoxi-5α-hidroxi-colestan-6-ona obtenida en la reacción anterior en 16 mL de piridina seca y se ponen en baño de hielo con agitación. Sobre la disolución anterior se adicionan, gota a gota, 0.17 mL (2.34 mmol) de cloruro de tionilo y después se lleva la reacción a temperatura ambiente y se deja reaccionando durante 1 hora Se vierte la reacción sobre 60 mL de agua, formándose un precipitado que es extraído dos veces con 20 mL de acetato de etilo, lavado tres veces con disolución HCl (5 %), una vez con disolución saturada de NaCl y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (8:2), obteniéndose 0.20g de 2α, 3α-diacetoxi-4-colesten-6-ona, sólido blanco, 86 %.

Se disuelven 0.19g (0.62 mmol) de 2β,3β-diacetoxi-colesten-6-ona en 20 mL de una disolución al 10 %

de KOH:MeOH, se deja reaccionando con agitación y bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 1 hora. Se vierte la reacción sobre un baño de agua-hielo (aprox. 45g), formándose un precipitado que es extraído dos veces con 20 mL de acetato de etilo, lavado dos veces con disolución saturada de NaCl y secado sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" con Hexano: EtOAc [(7:3), (1:1), (3:7)], recogiéndose 0.13g de 2β,3β-dihidroxi-4-colesten-6-ona, sólido blanco, 82 %.

Se disuelven 0.13g (0.31 mmol) de 2β,3β-dihidroxi-4-colesten-6-ona en 20 mL de etanol, sobre los que se añaden 0.25g (3.63 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina disueltos en 4 mL de una mezcla al 50 % de etanol-agua. Por último, se adiciona una disolución de 0.32g (2.33 mmol) de acetato sódico trihidratado en 6 mL de una mezcla al 50 % de etanol-agua y queda todo agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Se elimina el etanol de la reacción a presión reducida y el resto es extraído dos veces con 30 mL de 50 % EtOAc: H_2O, la fase orgánica secada sobre $N_{a2}SO_4$ anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" con Hexano: EtOAc [(8:2), (7:3), (1:1), (3:7)], obteniéndose 0.13g de 2α, 3α-dihidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (Compuesto 5), sólido blanco, 82 %.^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 5.63 (H-4, 1H, s a); 4.21 (H-3, 1H); 4.15 (H-2, 1H, m); 3.30 (H-7β, 1H); 0.92 (H-19, 3H, s); 0.91 (H-21, 3H, d, J= 6.8 Hz); 0.87 (H-26, H27, 6H, d, J= 6.8 Hz); 0.68 (H-18, 3H, s). ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_c: 159.2 (C6, s); 143.2 (C-5, s); 124.0 (C-4, d); 67.7 (C-3, d); 66.4 (C-2, d). EIMS (70 eV, m/z%): 431 (M, 6); 414 (M - OH, 22); 413 (M - H_2O, 5); 400 (M - NOH, 5); 382 (M H_2O NOH, 6).

Esquema 1 Paso l

Se disuelven 70 mg (0.16 mmol) de 2β,3β-dihidroxi-6*E*-hidroxiimino-4-colesteno y 0.28 g (3.24 mmol) de dióxido de manganeso activado en 15 mL de cloroformo seco. Se dejan reaccionando bajo atmósfera de argon y a temperatura ambiente durante 17 horas. Se filtra la reacción a través de zelita, se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un sólido amarillo, que se purifica mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: AcOEt [(8:2), (7:3), (1:1), (3:7)] , recogiendóse 36 mg de 2β-hidroxi-6*E*-hidroxiimino-4-colesten-3-ona (Compuesto 3), sólido amarillo, 52 %. ^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.06 (H-4, 1H, s); 4.25 (H-2, 1H, dd, J = 5.9 Hz y 6.3 Hz); 3.42 (H-7β, 1H, dd, J = 4.4 Hz y 10.7 Hz); 2.47 (H-1α, 1H, dd, J = 5.9 Hz, 8.3 Hz); 0.95 (H-19, 3H, s); 0.92 (H-21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H-26, H-27, 6H, d, J = 6.3 Hz); 0.72 (H-18, 3H, s).^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 199.6 (C-3, s); 163.8 (C-6, s); 157.4 (C-5, s); 120.4 (C-4, d); 68.7 (C-2, d); 56.4; 55.9; 49.0; 42.9; 41.2; 39.4; 39.3; 39.1; 36.0; 35.7; 33.9; 30.6; 28.1; 28.0; 24.0; 23.8; 22.8 (C-26, q); 22.7 (C-27, q); 22.5 (C21, q); 18.6 (C-19, q); 12.1 (C-18, q). EIMS (70 eV, m/z%): 411 (M - H_2O, 20); 384 (M - NOH - Me, 28).

Análisis Elemental

		Encontrado			Calculado		
Compuesto	FM	C	H	N	C	H	N
3	$C_{27}H_{43}NO_3$	75.50	10.68	3.39	75.48	10.09	3.26
4	$C_{27}H_{43}NO_3$	75.55	10.48	3.42	75.48	10.09	3.26
5	$C_{27}H_{45}NO_3$	76.00	10.43	3.10	75.13	10.51	3.24
6	$C_{27}H_{45}NO_3$	75.45	10.20	3.40	75.13	10.51	3.24
7	$C_{27}H_{41}NO_3$	75.59	9.70	3.30	75.84	9.66	3.28

REFERENCIAS

1 Rodríguez, J.; Núñez, L.; Peixinho, S. ; Jiménez, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1833-1836.

2. Suginome, H. ; Ohshima, K. ; Ohue, Y. ; Ohki, T. ; Senboku, H. *J. Chem. Soc.* Perkin Trans. 1. **1994**, 3239-3250.

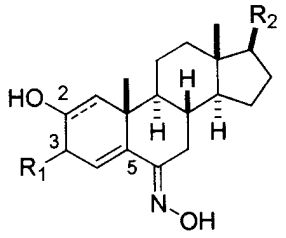
3 Rizzardo, E. ; Smith, G. C. *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 97-112.

4 Holland, H. L. ; Kumaresan, S.; Tan, L.; Njar, V.C.O. *J. Chem. Soc.* Perkin Trans. 1. **1992**, 585-587.

5. Gervais, M.; Tan, L. *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 383-388.

REIVINDICACIONES

1. Nuevos 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides **caracterizados** por una fórmula general (I):



I

En donde R_1 puede ser hidrógeno, hidroxilo, ceto, alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado.

R_2 puede ser hidrógeno, hidroxilo, alquilo (C_1-C_{11}) lineal o ramificado.

y ----- representa un doble enlace opcional.

2. Un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es un grupo ceto, el OH de la posición 2 está situado en la cara α, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 3.

3. Un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es un grupo ceto, el OH de la posición 2 está situado en la cara β, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 4.

4. Un 2-Hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es α-OH, el OH de la posición 2 está situado en la cara α, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 5.

5. Un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_1 es β-OH, el OH de la posición 2 está situado en la cara β, y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 6.

6. Un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es doble, R_1 es un grupo ceto y R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 7.

7. Procedimiento de obtención de un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β, R_1 es α-OH, el hidroxilo en la posición 2 es α (Compuesto 6) ó R_1 es β-OH, el hidroxilo en la posición 2 es β (Compuesto 4), según las reivindicaciones 1, 3 y 6 respectivamente. Este se realiza mediante la siguiente ruta: tosilación de colesterol, epoxidación en la posición 5-6; oxidación del epóxido a 5α-hidroxicetona, eliminación del grupo hidroxilo para obtenerse la γ-*p*-toluensulfoniloxi cetona α, β-insaturada seguido de eliminación del grupo tosilo para dar un doble enlace en 2-3. La dihidroxilación de este alqueno con tetraóxido de osmio da lugar a dos diasteroisómeros que tras ser separados se convierten en sus 2,3-dihidroxi-6*E*-hidroximino derivados.

8. Procedimiento de obtención de un 2-hidroxi-6*E*hidroximinoesteroide, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es sencillo, R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β, R_1, es un grupo ceto, el hidroxilo en la posición 2 es β (Compuesto 4) ó α (Compuesto 3). Este se realiza por oxidación con trióxido de cromo acuoso dióxido de manganeso respectivamente del grupo hidroxilo a grupo cetona en la posición 3 de los Compuesto 6 y 4 a los que se refiere la reivindicación 8.

9. Procedimiento de obtención de un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según las reivindicaciones 1 y 7, en donde el enlace entre los carbonos 1 y 2 es doble, R_1 es un grupo ceto, R_2 es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 7. Este se realiza por

oxidación completa del Compuesto 6, obtenido según la reivindicación 8, con dióxido de manganeso del grupo hidroxilo a cetona en la posición 3, y de las posiciones 2 y 3 para formar el doble enlace.

10. El uso de un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide, según las reivindicaciones 1 a 10, para preparar un medicamento con actividad citotóxica.

11. El uso de un 2-hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroide las reivindicaciones 1 a 10, en una cantidad eficaz adecuada para preparar un medicamento anticanceroso.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 190 776

(21) Nº de solicitud: 200300931

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **19.07.2001**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.[7]:** C07J 41/00, A61P 35/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AKHREM, A.A.; LAKHVICH, F.A.; KHRIPACH, V.A.; KOVGANKO, N.V. Beckmann rearrangement of 2alpha,3alpha-diacetoxycholest-4-en-6-one oxime. Zhurnal Organicheskoi Khimii, (1985), 21 (4), páginas 802-4, ISSN: 0514-7492, (resumen) HCAPLUS [en línea] [recuperado el 03.04.2003]. Recuperado de STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.), Nº de acceso 1985:505206.	1-11
A	RODRIGUEZ, JAIME y col. Isolation and synthesis of the first natural 6-hydroximino-4-en-3-one-steroids from the sponges Cinachyrella spp. Tetrahedron Letters, 1997, Vol. 38, Nº 10, páginas 1833-1836, ISSN 0040-4039.	1-11
A	GERVAIS, MIREILLE; TAN, LIAT. 6-Hydroximinoandrostenedione, a new specific inhibitor of estrogen biosynthesis and its effect on T47D human breast cancer cells. Anticancer Research, 1993, Vol. 13, Nº 2, páginas 383-8, ISSN 0250-7005.	1-11
A	NJAR, VINCENT C.O. y col. Synthesis of 6alpha,7alpha- and 6beta,7beta-aziridinoandrost-4-ene-3,17-diones and related compounds: potential aromatase inhibitors. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry, (1995), (8), 985-91, ISSN: 0300-922X.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.04.2003	E. Albarrán Gómez	1/2

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 190 776

(21) Nº de solicitud: 200300931

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **19.07.2001**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.[7]:** C07J 41/00, A61P 35/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SIGINOME, HIROSHI y col. Photoinduced molecular transformations. Part 149. Stereospecific photoadditions and photorearrangements of the oximes of some steroidal alpha,beta-unsaturated cyclic ketones and their deuterio derivatives. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry, (1994), (21), 3239-50, ISSN: 0300-922X. Compuesto con RN 110612-22-1, página 3241, compuesto 32.	1-11
A	HOLLAND, HERBERT L. y col. Synthesis of 6-hydroximino-3-oxo steroids, a new class of aromatase inhibitor. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry (1972-1999), (1992), (5), 585-7, ISSN: 0300-922X. Compuestos con RN 140421-64-3 y RN 140421-63-2, página 585, compuestos 6 y 7; páginas 585-586, esquemas 1,2.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
21.04.2003	E. Albarrán Gómez	2/2