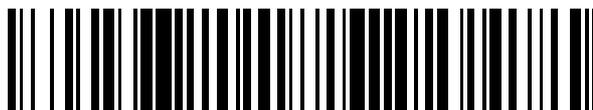


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 055**

51 Int. Cl.:

C07J 43/00 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2006 E 10150763 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2206719**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende 3-beta-hidroxi-17-(1-H-bencimidazol-1-il)androstano-5,16-dieno**

30 Prioridad:

02.03.2005 US 657390 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.02.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(100.0%)
620 West Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201, US**

72 Inventor/es:

**BRODIE, ANGELA y
NJAR, VINCENT**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 055 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

Composición farmacéutica que comprende 3-beta-hidroxi-17-(1-H-bencimidazol-1-il)androsta-5,16-dieno

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos serie No. 60/657390 presentada el 2 de marzo de 2005.

5 El gobierno de los Estados Unidos tiene una licencia pagada en esta invención y el derecho en circunstancias limitadas para requerir que el titular de la Patente licencie a otros en términos no razonables según lo indican los términos de la Concesión No. CA27440 otorgados por The National Institutes of Health (NIH).

10 El presente documento describe nuevas entidades químicas, particularmente benzoazoles, pirimidinoazoles (azabenzazoles) y diazinas C-17 esteroidales. Se describen también métodos para la síntesis de los benzoazoles, pirimidinoazoles y diazinas. En otro caso, los métodos para sintetizar benzoazoles o pirimidinoazoles comprenden una etapa de una reacción de sustitución vinílica nucleofílica "por adición-eliminación" de 3 β -acetoxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno o análogos del mismo y nucleófilos de benzoazol o pirimidinoazol. En otro caso, los métodos para sintetizar diazinas comprenden una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio de 17-iodoandrosta-5,16-dien-3 β -ol o análogos del mismo con tributilestanil diazinas.

15 Los compuestos descritos aquí son inhibidores potentes de la enzima humana CYP17 así como antagonistas potentes de receptores andrógenos de tipo tanto silvestres como mutantes (AR). Los inhibidores de CYP17 más potentes fueron: 3 β -hidroxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (5, código denominado VN/124-1), 3 β -hidroxi-17(5¹-pyrimidil)androsta-5,16-dieno (15) y 17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-4,16-dieno-3-ona (6), con valores de IC₅₀ de 300, 500 y 915 nM, respectivamente. Los compuestos 5, 6, 14 y 15 fueron efectivos en la prevención del enlazamiento de ³H-R1881 (metiltrienolona, un andrógeno sintético estable) a los AR mutante y LNCaP y al AR de tipo silvestre, pero con una eficiencia de enlazamiento de 2.2 a 5 veces mayor con respecto al último. Los compuestos inclusive también demostraron ser antagonistas de AR puro. Los estudios de crecimiento celular demostraron que 5 y 6 inhiben el crecimiento de células de cáncer de próstata LNCaP y LAPC4 estimuladas por DHT con valores de IC₅₀ en el rango micromolar bajo (esto es, < 10 μ M). Sus potencia inhibitoras fueron comparables a la del caso dex pero notablemente superiores a la de la flutamida. Se investigó la farmacocinética de los compuestos 5 y 6 en ratones. Después de la administración s.c. de 50 mg/kg de 5 y 6, los niveles pico en plasma de 16.82 y 5.15 ng/mL, respectivamente ocurrieron después de 30 a 60 minutos, ambos compuestos fueron eliminados rápidamente del plasma (vidas medias terminales de 44.17 y 39.93 minutos, respectivamente) y no fueron detectables a las 8 horas. De manera notable, el compuesto 5 fue convertido rápidamente en un metabolito identificado tentativamente como 17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-3-ona. Cuando se probó *in vivo*, 5 demostró ser muy efectivo en la inhibición del crecimiento de un xenoinjerto de tumor de próstata humano LAPC4 dependiente de andrógeno, mientras que 6 no fue efectivo. El compuesto 5 (50 mg/kg dos veces al día) dio como resultado una reducción del 93.8% (P = 0.00065) en el volumen de tumor final medio en comparación con los controles, y también fue significativamente más efectivo que la castración. Para nuestro conocimiento, este es el primer ejemplo de un agente antihormonal (un inhibidor de la síntesis de andrógeno (inhibidor CYP17)/antiandrógeno) que es significativamente más efectivo que la castración en la supresión del crecimiento tumoral de próstata dependiente de andrógeno. A la vista de estas propiedades anticáncer impresionantes, el compuesto 5 y otros pueden ser utilizados para el tratamiento de cáncer de próstata humano.

40 El cáncer de próstata (PCA) es la enfermedad maligna más común y la causa mayor relacionada con la edad de muertes por cáncer en el mundo. Aparte del cáncer de pulmón, el PCA es la forma de cáncer más común en hombres y la segunda causa que lleva a la muerte en los hombres Estadounidenses. En los Estados Unidos este año (2004), se diagnosticará un estimado de 230,000 nuevos casos de cáncer de próstata y aproximadamente 23,000 hombres morirán de esta enfermedad (Jemal et al., Cancer Statistics, 2004. CA Cancer J. Clin., 2004, 54, 8-29). Durante el periodo de 1992 a 1999, la incidencia anual promedio de PCA entre los hombres afroamericanos fue 59% mayor que entre los hombres caucásicos, y la rata de muerte anual promedio fue más de dos veces la de los hombres caucásicos (American Cancer Society – Cancer Facts and Figures 2003). Los andrógenos juegan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y progresión de los PCA (McConnell, J. D., "Physiological basis of endocrine therapy for prostatic cancer", Urol. Clin. North Am., 1991, 18: 1-13). Los dos andrógenos más importantes en este aspecto son la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT). Los testículos sintetizan aproximadamente el 90% de T y el resto (10%) es sintetizado por las glándulas adrenales. T es convertida posteriormente en el andrógeno DHT más potente por la enzima esteroide 5 α -reductasa que esta localizada primariamente en la próstata (Bruchovsky et al., "The conversión of testosterone to 5 α -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*", J. Biol. Chem., 1968, 243, 2012-2021). Huggins et al., introdujeron la privación de andrógenos como terapia para PCA avanzado y metastásico en 1941 (Huggins et al., "Studies on prostatic cancer: 2. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland", Arch. Surg., 1941, 43, 209-212). Después de esto, la terapia de ablación de andrógenos ha demostrado producir las respuestas más beneficiosas en múltiples condiciones en pacientes de PCA (Denmead et al., "A history of prostate cancer treatment". Nature Rev. Cancer, 2002, 2: 389-396). La orquidectomía (bien sea quirúrgica o médica con un agonista de GnRH) sigue siendo la opción de tratamiento estándar para la mayor parte de los pacientes con

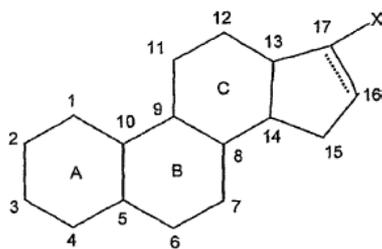
cáncer de próstata. La orquidectomía médica y quirúrgica reduce o elimina la producción de andrógenos por los testículos pero no afecta la síntesis de andrógenos en las glándulas adrenales. Varios estudios han informado que una terapia de combinación de orquidectomía con antiandrógenos, para inhibir la acción de los andrógenos adrenales, prolonga significativamente la supervivencia de pacientes con PCA (Crawford, et al., "A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma", N. Engl. J. Med., 1982, 321, 419-424; Crawford, et al., "Treatment of newly diagnosed stage D2 prostate cancer with leuprolide and flutamide or leuprolide alone, Phase III: intergroup study 0036", J. Urol., 1992, 147: 417A; y Denis, L., "Role of maximal androgen blockade in advanced prostate cancer", Prostate, 1994, 5 (Suppl.), 17s-22s). En un artículo reciente presentado por Mohler y colegas (Mohler et al., "The androgen axis in recurrent prostate cancer", Clin. Cancer Res., 2004, 10, 440-448) se demostró claramente que T y DHT se presentan en tejidos con PCA recurrentes en niveles suficientes para activar el receptor de andrógeno. Además, utilizando un perfil basado en microdisposición en modelos de xenoinjerto de PCA isogénicos, Sawyer y colegas (Chen et al., "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy". Nat. Med, 2004, 10, 33-39) encontraron que un modesto incremento en el ARNm receptor de andrógenos fue el único cambio asociado consistentemente con el desarrollo de la resistencia a la terapia de andrógenos. Compuestos potentes y específicos que inhiben la síntesis de andrógenos en los testículos, glándulas adrenales y otros tejidos pueden ser más efectivos para el tratamiento de PCA (Njar, V.C.O.; Brodie, A. M. H., "Inhibitors of 17 α -hydroxylase-C17, 20-lyase (CYP17): Potential agents for the treatment of prostate cancer", Current Pharm. Design, 1999, 5: 163-180).

En los testículos y en las glándulas adrenales, la última etapa en la biosíntesis de T involucra dos reacciones claves, las cuales actúan secuencialmente y son catalizadas ambas por una enzima individual, la citocromo P450 monooxigenasa 17 α -hydro-one/17,20-lyase (CYP17) (Hall, P. F., "Cytochrome P-450 C21sc: one enzyme with two actions: Hydro-one and lyase", J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1991, 40, 527-532). El ketoconazol, como agente antifúngico y en virtud de inhibir las enzimas P450, también es un inhibidor modesto de CYP17 y ha sido utilizado clínicamente para el tratamiento de PCA (Trachtenberg et al., "Ketoconazol: A novel and rapid treatment for advanced prostatic cancer", J. Urol. 1983, 130, 152-153). Se ha informado que la programación cuidadosa del tratamiento puede producir respuestas prolongada en pacientes con cáncer de próstata de otra manera refractarios a las hormonas (Muscato et al., "Optimal dosing of ketoconazol and hydrocortisone leads to long responses in hormone refractory prostate cancer", Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1994, 13: 22 (Abstract)). Adicionalmente, se encontró que el ketoconazol mantenía la actividad en pacientes de PCA avanzados con progresión a pesar del retiro de la flutamida (Small et al., "Ketoco-nazol retains activity in advanced prostate cancer patients with progression despite flutamide withdrawal", J. Urol., 1997, 157, 1204-1207). Aunque el ketoconazol ha sido retirado ahora del uso debido a su toxicidad al hígado y otros efectos laterales esto sugiere que inhibidores más potentes y selectivos de CYP17 podrían proveer agentes útiles para el tratamiento de esta enfermedad, incluso en etapas avanzadas y en algunos pacientes que parecen ser refractarios a las hormonas.

Una variedad de inhibidores esteroidales y no esteroidales potentes de CYP17 ha sido reportada y algunos han demostrado ser inhibidores potentes de la producción de testosterona en modelos en roedores (Njar y Brodie, más arriba). Recientemente, Jarman y colegas han descrito el impacto hormonal de su inhibidor de CYP17 más potente, la abiraterona en pacientes con cáncer de próstata (O'Donnell et al., "Hormonal impact of the 17 α -hydro-one/C17,20-lyase inhibitors abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer", Br. J. Cancer, 2004, 90: 2317- 2325). Algunos de nuestros inhibidores de CYP17 potentes han demostrado también inhibir la 5 α -reductasa y/o son antiandrógenos potentes con actividad antitumoral potente (Njar y Brodie, más arriba, y Long et al., "Antiandrogenic effects of novel androgen synthesis inhibitors on hormone- dependent prostate cancer." Cancer Res., 2000, 60, 6630-6640). Adicionalmente ilustrativas de los antecedentes de la invención son las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 994,335; 6, 200,965; y, 6, 444,683. Se han reportado intentos para modelar el farmacóforo tridimensional de los inhibidores de CYP17 humanos (Clement et al, J. Med. Chem 2003, 46, 2345-2351). Este documento divulga un rango de compuestos como inhibidores de la enzima CYP17 *in vitro*.

Hemos descubierto una serie de potentes inhibidores/antiandrógenos de CYP17, los 17- benzoazoles, 17-pirimidinoazoles y 17-diazinas (véase, por ejemplo, Esquemas 1 y 2, para ejemplos de preparación de compuestos que pueden ser aplicados de manera análoga a otras estructuras, como se describe más adelante). El estímulo para preparar estos esteroides de C-17 heteroarilo se basó en nuestro deseo de incorporar unidades estructurales bencimidazol, benzotriazol, pirimidinoazol y diazina, llamadas "subestructuras privilegiadas" (Nicolaou et al., "Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 1. General principles and solid-phase synthesis of benzopyrans", J. Am. Chem. Soc, 2000, 122, 9939-9953. "Estructuras Privilegiadas", es un término introducido originalmente por Evans et al. (J Med. Chem., 1988, 31, 2235-2246), para describir unidades estructurales capaces de interactuar con una variedad de objetivos moleculares no relacionados) en las nuevas moléculas. Estas estructuras, especialmente la estructura bencimidazol, continua recibiendo atención extensiva en la química médica debido a su portafolio diverso de actividades biológicas y también como entidades de una variedad de fármacos útiles (Nicolaou et al., más arriba).

Se describen compuestos esteroidales C-17 heteroarilo de la siguiente fórmula general I:



en donde:

- la estructura de anillos ABC es en las porciones de anillo A, B y C de un esteroide o análogos del mismo, los cuales están opcionalmente sustituidos;

5 - el enlace ---- en la posición 16, 17 es un enlace doble o, cuando el compuesto es 17-(1H-bencimidazol-1-il)androst-3-ona, un enlace sencillo; y

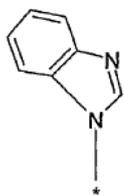
10 - X es un bencimidazol, benzotriazol, pirimidinoimidazol (purina), pirimidinotriazol o diazina opcionalmente sustituidos; los grupos bencimidazol, benzotriazol, y pirimidinoimidazol están enlazados al residuo esteroide a través de un átomo de nitrógeno en el anillo de 5 miembros; y, los grupos diazina están enlazados al residuo esteroide a través de un átomo de carbono sobre el anillo diazina.

También se describen sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

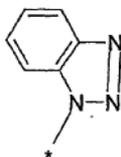
15 La sustitución opcional en la estructura de anillo ABC incluye uno o más de: alquilo o alquilo halogenado (preferiblemente C₁₋₆); alquenilo y alquenilo halogenado (preferiblemente C₁₋₆) incluyendo cuando el doble enlace está directamente unido a la estructura de anillo; halógeno; amino; aminoalquileo; hidroxiimino; e hidroxilo. Opcionalmente de manera adicional, sustituyentes de hidrógeno sobre los átomos de carbono adyacentes de la estructura de anillo ABC pueden ser removidos y reemplazados por enlaces adicionales entre los átomos de carbono adyacentes para dar como resultado un doble enlace entre estos carbonos en estructura de anillo. Sustituciones opcionales preferidas sobre la estructura de anillo ABC son grupos metilo en las posiciones 10 y/o 13 de la estructura de anillo.

20 La sustitución opcional para las estructuras de bencimidazol, benzotriazol, pirimidinoimidazol, pirimidinotriazol o diazina incluyen halógeno, amino, aminoalquileo, hidroxilo, -SH, -S-alquilo, alquilo y alquilo halogenado (preferiblemente C₁₋₆). Estos sustituyentes opcionales estarán sobre los átomos de carbono del anillo de las estructuras de bencimidazol, benzotriazol, pirimidinoimidazol, pirimidinotriazol o diazina.

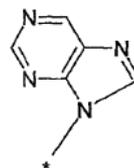
Las estructuras de bencimidazol, benzotriazol, pirimidinoimidazol, pirimidinotriazol o diazina son de las siguientes fórmulas, respectivamente:



Bencimidazol

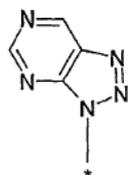


benzotriazol

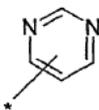


pirimidinoimidazol

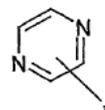
25



pirimidinotriazol



pirimidina



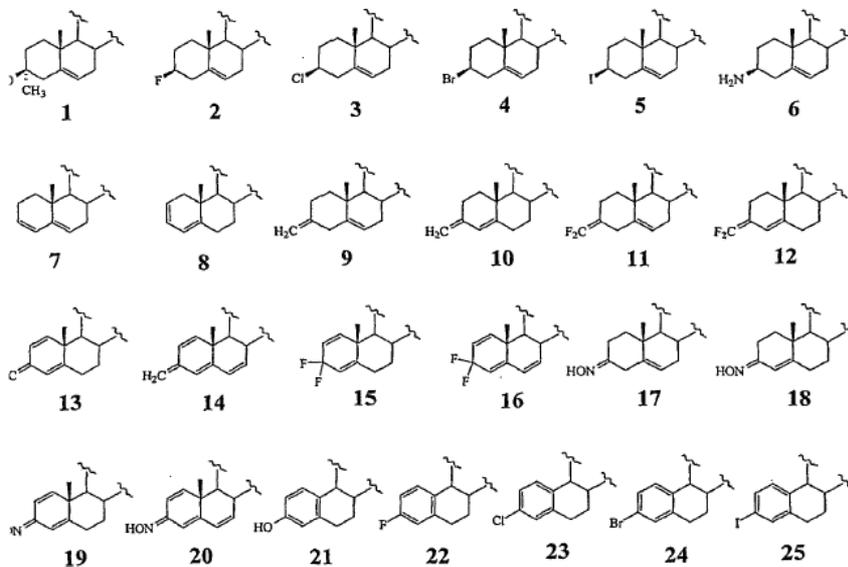
pirazina

en donde el * indica el punto de unión al residuo esteroide.

- 5 En un caso, la estructura de anillo ABC tiene un anillo C que no tiene sustitución excepto por sustitución preferiblemente alquilo, particularmente metilo en el carbono compartido con el anillo el cual es adyacente a la unión a la sustitución de C-17 heteroarilo, esto es, la posición 13.

En otra instancia, los anillos A, B y C de la estructura de anillo ABC tienen una estructura convencional con base en 3 β -hidroxi-androsta-5,16-dieno o 3-oxo-androsta-5,16-dieno. Pero en otro caso los anillos A y B tienen una de las siguientes estructuras 1 - 25:

10



A continuación se presenta la lista de los nombres químicos de los compuestos que tienen los anillos A y B como 1 - 25, y los anillos C y D convencionales, en donde X es benzimidazol. También se describen compuestos análogos en donde X es benzotriazol, pirimidinoimidazol, pirimidinotriazol, pirazina y pirimidina.

15

Compuesto 1: 3 β -Hidroxi-3 α -metil- 17-(1H-benzimidazol-1-il)-androsta-5,16- dieno

Compuesto 2: 3 β -Fluoro-17-(1H-benzimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 3: 3 β -Cloro-17-(1H-benzimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 4: 3 β -Bromo-17-(1H-benzimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

- 20 Compuesto 5: 3 β -Iodo-17-(1H-benzimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 6: 3 β -Amino-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 7: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-3,5,16-trieno

Compuesto 8: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-2,4, 16-trieno

Compuesto 9: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-3-metileneandrosta-5,16-trieno

5 Compuesto 10: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-3-metileneandrosta-4,16-trieno

Compuesto 11: 3,3-Difluoro-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 12: 3,3-Difluoro- 17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-4,16-dieno

Compuesto 13: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-3-metileneandrosta-2,4,16-trieno

Compuesto 14: 17-(1H-bencimidazol-1-il)-3-metileneandrosta-2,4,6,16-tetraeno

10 Compuesto 15: 3,3-Difluoro-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-2,4,16-trieno

Compuesto 16: 3,3-Difluoro-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-2,4,6,16-tetraeno

Compuesto 17: 3-Hidroxiimino-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-5,16-dieno

Compuesto 18: 3-Hidroxiimino-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-4,16-dieno

Compuesto 19: 3-Hidroxiimino-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-2,4,16-trieno

15 Compuesto 20: 3-Hidroxiimino-17-(1H-bencimidazol-1-il)-androsta-2,4,6,16-dieno

Compuesto 21: 3-Hidroxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)-estra- 1,3, 5(10), 16-tetraeno

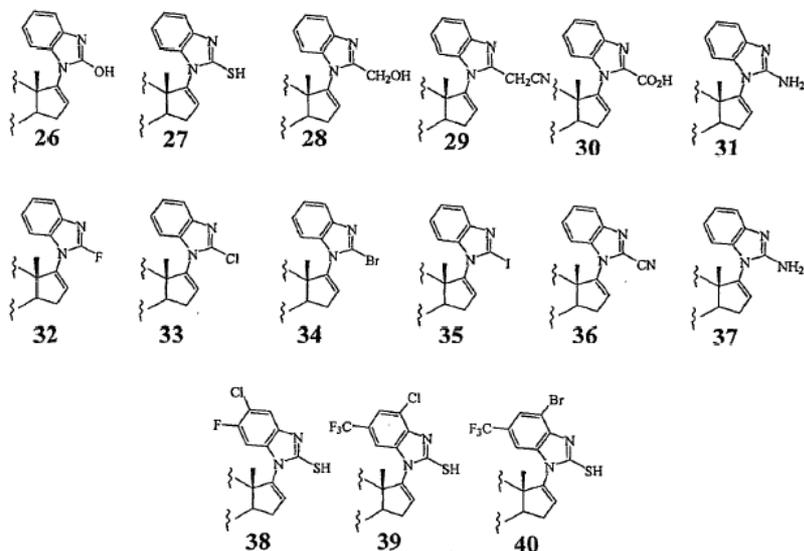
Compuesto 22: 3-Fluoro- 17-(1H-bencimidazol-1-il)-estra-1,3,5(10), 16-tetraeno

Compuesto 23: 3-Cloro-17-(1H-bencimidazol-1-il)-estra-1,3,5(10), 16-tetraeno

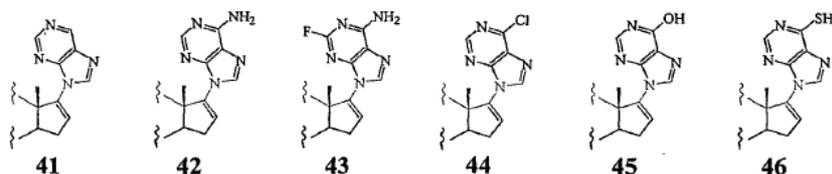
Compuesto 24: 3-Bromo-17-(1H-bencimidazol-1-il)-estra-1,3,5(10), 16-tetraeno

20 Compuesto 25: 3-Iodo 17-(1H-bencimidazol-1-il)-estra-1,3,5(10),16-tetraeno

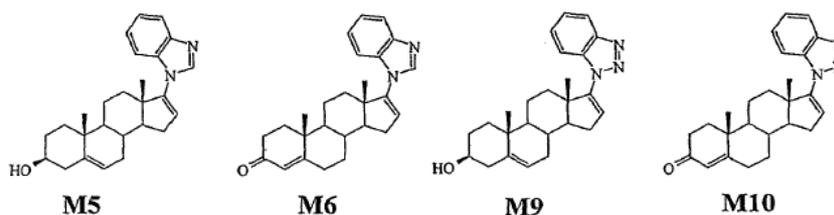
Ejemplos de sustituyentes opcionales para el anillo heteroarilo, X, son mostrados por las siguientes estructuras 26 – 40 en donde X es bencimidazol. Compuestos análogos en donde X es benzotriazol, pirimidinoimidazol, pirimidinotriazol, pirazina o pirimidina sustituidos también son descritos.



Otros ejemplos de sustituyentes opcionales para el anillo heteroarilo, X, son mostrados por las siguientes estructuras 41–46 en donde X es azabencimidazol sustituido en C-17 (esto es, pirimidinoimidazol o purina). También se describen compuestos análogos en donde X es bencimidazol, benzotriazol, pirimidinotriazol, pirazina o pirimidina sustituidos.



Se describen compuestos de las siguientes estructuras M5, M6, M9 y M10.



0020 Se estudiaron las actividades inhibitoras de estos compuestos en comparación con la CYP17 y la 5 α -reductasas, el enlazamiento y transactivación de los receptores de andrógenos, y sus efectos antiproliferativos contra dos líneas celulares de cáncer de próstata humano, LNCaP y LAPC-4. Las farmacocinéticas de los compuestos 5 y 6 fueron evaluadas en ratones y las actividades antitumorales *in vivo* contra carcinoma de próstata humano LAPC-4 también fueron evaluadas en ratones. Para nuestro conocimiento, todos los compuestos descritos aquí, con excepción del compuesto 15 representan entidades novedosas (Haidar et al., "Novel steroidal pyrimidyl inhibitors of P45017 (17 α -hydro-one/C17, 20-lyase)", Arch. Pharm. Med Chem., 2001, 334, 373 – 374; y Haidar et al., "Effects of novel 17 α -hydro-one/C17, 20-lyase (P45017, CYP17) inhibitors on androgen biosynthesis *in vitro* e *in vivo*", J. Steroid Biochem. Molec. Biol, 2003, 84, 555 – 562).

La preparación de los nuevos 17-benzazoles y 17-diazinas esta delineada en los Esquemas 1 y 2 respectivamente. Estos métodos pueden ser aplicados de manera análoga a otros análogos descritos aquí.

El intermediario clave en nuestra síntesis de los 17-benzazoles, 3 β -acetoxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (2) fue obtenido de (1) por nuestro procedimiento de rutina como se describió previamente (Njar et al., "Nucleophilic vinylic "addition-elimination" substitution reaction of 3 β -acetoxy-17-chloro-16-formylandrosta-5,16-diene: A novel and general route to 17-substituted- Δ 16-steroids. Part 1. Synthesis of novel 17-azolyl- Δ 16 steroids; inhibitors of 17 α -hydro-one/17,20-lyase (P45017 α)", Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 6, 2777 - 2782; and "Novel 17-azolyl steroids; potent inhibitors of cytochrome P450 17 α -hydro-one/17,20-lyase (P45017 α): Potential agents for the treatment of prostate cancer", J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912). El tratamiento de 2 con bencimidazol en la presencia de K₂CO₃ en DMF a aproximadamente 80°C dio el 3 β -acetoxi-17-1H-bencimidazol 3 deseado en un rendimiento casi cuantitativo. El compuesto 3 fue desformilado suavemente con paladio al 10% sobre carbón activado en benzonitrilo en reflujo para dar el compuesto 4 con un 93% de rendimiento, a partir del cual la hidrólisis dio el 3 β -hidroxi 17-bencimidazol 5 requerido. La oxidación modificada de Oppenauer de 5 produjo el correspondiente análogo Δ^4 -3-oxo, 6.

La reacción de 2 con benzotriazol en la presencia de K₂CO₃ en DMF a aproximadamente 80°C dio el 3 β -acetoxi-17-benzo-1H-1,2,3-triazol 7b deseado en excelente rendimiento, junto con el regioisómero 2H-1,2,3-triazol 7a en aproximadamente 5% de rendimiento. Estos dos regioisómeros fueron separados fácilmente por cromatografía de columna instantánea (FCC) sobre sílica gel y fueron identificados también fácilmente por sus respectivos espectros de RMN protónicos. Así, los cuatro protones aromáticos del 2H-1,2,3-triazol 7a simétrico aparecieron como dos pares de dobletes a δ 7.43, 7.45, 7.88 y 7.90 mientras que los cuatro protones aromáticos del 1H-1,2,3-triazol 7b asimétrico aparecieron como multiplete en δ 7.46 (2H) y dobletes en δ 7.57 (1H) y 8.15 (1H), respectivamente. Además, el protón 16-CHO en 7a fue desplazado significativamente campo abajo a δ 10.66 en comparación con el 7b a δ 9.59. La desformilación de 7b con la generación *in situ* del catalizador Rh(1,3-bis(difenilfosfino)propano)₂ ⁺Cl⁻ y [Rh(dppp)₂ ⁺Cl⁻] en xilenos en reflujo dio el compuesto 8, y después de la hidrólisis del grupo 3 β -acetoxi, obtuvimos el objetivo 3 β -hidroxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (9) en 90% de rendimiento. La oxidación de 9 produjo 10 en buen rendimiento.

La síntesis de las 17-diazinas, (17-diazina 14 y 17-pirimidina 15) comenzó desde la deshidroepiandrosterona fácilmente disponible (11, Esquema 2), la cual fue convertida a la correspondiente 17 hidrazona 12 por tratamiento con hidrato de hidrazina y sulfato de hidrazina como se describió previamente por Potter et al., A convenient, large-scale synthesis of abiraterone acetate [3 β -acetoxy-17(3-pyridil)androsta-5,16-diene], a potential new drug for the treatment of prostate cancer. Org. Prep. Proc. Int., 1997, 29, 123-128. El tratamiento de 12 con yodo en la presencia de 1,1,3,3-tetrametilguanidina dio el 17-yoduro de vinilo 13 en excelente rendimiento. Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio (Choshi et al., "Total synthesis of Grossularines-1 and -2." J Org. Chem., 1995, 60, 5899-5904) de 13 con (2-tributilestanil)pirazina o (5-tributilestanil)pirimidina procedieron para dar 3 β -hidroxi- 17-(2-pirazil)-androsta-5,16-dieno (14, 15%), y 3 β -hidroxi-17-(5-pirimidil)-androsta-5,16- dieno (15, 10%), respectivamente. Los bajos rendimientos de estas dos reacciones de acoplamiento cruzado pueden deberse a la inestabilidad de los reactivos de estandiazina bajo las condiciones de reacciones empleadas. Las estructuras de los compuestos objetivos, 14 y 15 fueron identificadas fácilmente por sus espectros de protones de RMN. Los tres protones no equivalentes de la unidad estructural 17-pirazina en 14 aparecieron como tres singletes en δ 8.35, 8.48 y 8.70, mientras que para los tres protones de la unidad estructural 17-pirimidina en 15, dos protones equivalentes aparecen como un singlete en δ 8.73 y un protón aparece en δ 9.07. Adicionalmente, los grupos 17-diazina de 14 y 15 exhiben diferentes influencias sobre los desplazamientos químicos de sus respectivos protones 16-olefínicos con respecto al protón 16 del precursor Δ^{16} -17-yoduro 13: el 16-H en 14 aparece como un singlete en δ 6.77, siendo significativamente descubierto en comparación con el 16-H en 13 (δ 6.14); el 16-H en 15 aparece a δ 6.11, similar a 13. Como se indicó anteriormente, el compuesto 15 fue reportado previamente Haidar et al., sin embargo, fue sintetizado por un procedimiento que es diferente del descrito aquí.

Una muestra representativa de los compuestos novedosos fue sometida a extensos estudios *in vitro* e *in vivo* como se describe en detalle en las siguientes secciones.

Un método para el tratamiento de cáncer de próstata o hiperplasia de próstata que comprende administrar a un sujeto que así lo requiere una cantidad efectiva de un compuesto. El término "tratamiento" usado tal como se describe aquí es divulgado también de manera convencional, por ejemplo, el manejo o cuidado de un sujeto para propósito de combatir aliviar, reducir, atenuar, mejorar, etc., uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad de próstata. Ejemplos de enfermedades de próstata que pueden ser tratadas incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática (BPH), y cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma prostático).

El nivel de dosis y frecuencia específicos de la dosificación puede variar, dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto activo específico, su estabilidad metabólica y longitud de acción, rata de excreción, modo y tiempo de administración, la edad, peso corporal, condición de salud, género, dieta, etc., del sujeto, y la severidad del cáncer de próstata o hiperplasia. Cualquier cantidad efectiva del compuesto puede ser administrada, por ejemplo, desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg por día, más específicamente aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 150 mg por día. Los compuestos pueden ser administrados en cualquier forma por cualquier ruta efectiva, incluyendo, por ejemplo, oral, parenteral, enteral, intraperitoneal, tópica, transdérmica (por ejemplo, usando cualquier parche

estándar), oftálmica, nasal, local, no oral, tal como aerosol, aspersion, inhalación, subcutánea, intravenosa, intramuscular, bucal, sublingual, rectal, vaginal, intraarterial e intratecal, etc. Un compuesto de la presente invención puede ser administrado solo, o en combinación con cualquier otro ingrediente, activo o inactivo, por ejemplo, con vehículos fisiológicamente aceptables para hacer composiciones farmacéuticas adecuadas.

- 5 La invención provee una composición farmacéutica la cual comprende 3 β -hidroxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-5, 16-dieno o una sal farmacéuticamente aceptada del mismo para uso en el tratamiento de un tumor dependiente de andrógenos por inhibición de los receptores de andrógenos tanto tipo silvestre como mutante. Sin elaboración adicional, se cree que una persona experimentada en la técnica, utilizando la descripción precedente, puede utilizar la presente invención en su grado más completo. Las siguientes realizaciones específicas preferidas son, por lo tanto, considerables como meramente
10 ilustrativas, y no limitantes del resto de la divulgación de manera alguna.

En lo anterior y en los ejemplos que siguen, todas las temperaturas se citan no corregidas en grados Celsius y, todas las partes y porcentajes son por peso, a menos que se indique otra cosa.

Ejemplos

Estudios biológicos

- 15 Estudios de inhibición de CYP17: Un ensayo de inhibición de CYP17 se lleva a cabo de acuerdo con nuestro procedimiento reportado previamente, en el cual se utiliza *E. coli* que expresa el citocromo P450c17 intacto como fuente de enzima (Grigoryev et al., "Cyto-chrome P450c17-expressing *Escherichia coli* as a first-step screening system for 17 α -hydro-one-C17,20-lyase inhibitors", Anal. Biochem.; 1999, 267, 319-330; y "Effects of new 17 α -hydro-one/C17,20-lyase inhibitors on LNCaP prostate cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*", Br. J. Cancer, 1999, 81, 622-630. Los valores de IC₅₀ de los
20 compuestos son determinados a partir de curvas dosis-respuesta y se presentan en la lista de la Tabla 1. Los valores IC₅₀ para ketoconazol, abiraterona (un inhibidor de CYP17 en ensayos clínicos (O'Donnell, más arriba), Cuadro 1) y 3 β -hidroxi-17-(1H-imidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (VN/85-1, compuesto 16, Cuadro 1, considerado como el inhibidor de CYP17 más potente (Njar et al., Current Pharm. Design, 1999, 5: 163-180; y J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912, más arriba) también se determinan en el mismo sistema de ensayo para comparación. Algunos de los nuevos 17-heterociclos exhiben inhibición
25 potente de CYP17 con valores de IG₅₀ de 300 - 915 nM. Los bencimidazoles, 5 y 6 son 4 a 6 veces más potentes que los benzotriazoles 9 y 10. Este resultado sugiere que la naturaleza electrónica del 17-heterociclo influye en la actividad inhibidora. Adicionalmente, los compuestos con la funcionalidad Δ^5 -3 β -ol, 5 y 9 son al menos 3 veces más potentes que los análogos correspondientes con la funcionalidad Δ^4 -3-ona, 6 y 10, respectivamente. Estos resultados están en contraste con nuestros resultados previos para los inhibidores de CYP17 simples de 17-azol. En esa serie de inhibidores, no hay una
30 diferencia marcada en las potencias inhibidoras entre los azoles Δ^5 -3 β -ol y los correspondientes análogos Δ^4 -3-ona (Njar et al., J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912, más arriba). Una explicación posible es que los benzoazoles más voluminosos se enlazan de manera diferente en el sitio activo de la enzima de tal forma que las interacciones de la unidad estructural en la posición 3 son importantes para el enlazamiento.

- El enlazamiento del sustrato o los ligandos inhibidores al componente heme de algunos citocromos P450 es investigado
35 utilizando espectroscopia de diferencia UV-vis (Jefcoat C. R., "Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P450 by optical difference spectroscopy", Methods Enzymol., 1978, 52, 258-279). Esta metodología es extendida siguiendo procedimientos estándar reportados previamente por nosotros (Njar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 6, 2777 - 2782; and J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912). Los compuestos 5 y 9 pueden inducir cada uno un espectro de diferencia tipo II, indicando la coordinación del nitrógeno esteroide (N-3 del anillo bencimidazol o benzotriazol) al hierro heme de CYP17, con formación de hierro de bajo giro. Las posiciones de pico para el máximo de Soret del complejo de
40 enzima con 5 y 9 (426 nM) está en concordancia con los datos disponibles para el enlazamiento de los ligandos de nitrógeno a los sistemas CYP y también en concordancia con los resultados con otros inhibidores de CYP 17 de 17-azolilo (Njar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 6, 2777 - 2782; and J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912). La interacción del nitrógeno del benzoazol con el hierro heme de CYP 17 sugiere una tolerancia por volumen en la posición 17, puesto que las afinidades de enlazamiento de 5 y 9 son idénticas a las de el 16 menos exigente estéricamente, con un grupo 17-imidazol.
45

- De las dos 17 diazinas probadas, la 17-pirimidina 15 con un valor IC₅₀ de 500 nM es aproximadamente 8 veces más potente que la 17-pirazina 14 (IC₅₀ = 3810 nM). Como sucede con los benzoazoles, este resultado sugiere que la naturaleza electrónica del 17-heterociclo influye en la actividad inhibidora. Finalmente, se evalúan valores de IC₅₀ en el mismo sistema de ensayo para el ketoconazol, y abiraterona (Tabla 1). El compuesto más potente en esta serie, el 17-bencimidazol 5,
50 exhibe aproximadamente 4 y aproximadamente 3 veces de mejora en la inhibición de CYP17 sobre estos compuestos, respectivamente, aunque es menos potente que el 16.

Inhibición de isozimas 5 α -reductasa humanas tipo 1 y 2 *in vitro*: Sobre la base de los hallazgos previos de que algunos inhibidores de CYP17 son capaces de inhibir enzimas humanas 5 α -reductasa, evaluando rápidamente esta nueva serie de

inhibidores de CYP17. Las actividades inhibitorias de los compuestos 5, 6, 9, 10 y la finasterida como referencia se determina utilizando la línea celular DU-145 (enzima humana tipo 1) y homogenizados humano de tejido de BPH (enzima humana tipo 2) según lo describen Hartmann et al., "Synthesis and evaluation of 2'-substituted 4-(4'-carboxy- or 4'-carboxymethylbenzylidene)-N-acylpiperidines: Highly potent and *in vivo* active steroid 5 α -reductase type 2 inhibitors", J. Med. Chem., 2002, 45, 3406-3417. Los valores de IC₅₀ o los valores de inhibición porcentuales a una concentración de 10 μ M para algunos compuestos se presentan en la Tabla 1. Solamente el compuesto 6 exhibe una inhibición potente de ambas enzimas tipo 1 y 2 (IC₅₀ = 770 y 480 nM, respectivamente), aunque es varias veces menos potente que la finasterida (IC₅₀ = 60 y 2 nM, respectivamente).

Ensayos de enlazamiento del receptor de andrógenos LNCaP y PC-3AR: Debido a que hemos demostrado previamente que algunos de nuestros inhibidores de CYP 17 son antiandrógenos potentes para AR tanto mutante como tipo silvestre (Long et al., Gregoriyev et al. y Njar et al., J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912, más arriba) fue de interés establecer la capacidad de esta serie de inhibidores de CYP 17 para enlazarse a estos receptores. La competición por AR se determina utilizando R1881 marcado (³H-R1881) en las células LNCaP sensibles a andrógeno, que expresan AR mutante, y las células PC-3 independientes de andrógenos transfectadas de manera estable con el AR tipo silvestre (designado como PC-3AR). Los compuestos 5, 6, 14 y 15, en el rango de concentración nanomolar, compiten efectivamente con la R1881 marcada por el enlazamiento de ambos tipos de AR en una forma dependiente de la dosis (Figura no mostrada). Los compuestos 5, 6, 14 y 15, con valores IC₅₀ de 384, 242, 336 y 374 nM, respectivamente (Tabla 1), versus el AR tipo silvestre son 29 a 45 veces más potentes que con el antiandrógeno usado clínicamente, flutamida (IC₅₀ = 10,985 nM). Como se muestra en la Tabla 1, las afinidades de enlazamiento para el AR mutante de 5 y 6 son comparables con la del casodex, un antiandrógeno utilizado actualmente, pero de modo superior a la de la flutamida. Sin embargo, la actividad biológica de la flutamida se deriva principalmente de un metabolito, la hidroxiflutamida, el cual es un antagonista de AR mucho más potente.

Efectos de los agentes sobre la transcripción de LNCaP mediada por AR mutante: A continuación, nos preguntamos si los compuestos 5 y 6 actuaban como agonistas o antagonistas de AR. Un estudio de la activación transcripcional regulada por andrógenos se lleva a cabo en células LNCaP transfectadas de manera transiente con un constructo AARZ-Luc informador de la probasin luciferasa (ensayo de actividad de luciferasa) (Kim et al., "Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells", Oncogene, 2004, 23:1838-1844; y Zhang et al., "A Small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids *in vitro* and *in vivo*", Endocrinology, 2000, 141: 4698-4710). Los compuestos 5, 6 o casodex cada uno a 0.1 y 10.0 μ M no tienen efecto sobre la actividad de la luciferasa, mientras que la expresión de la luciferasa se incrementa aproximadamente en 99.6 veces después del tratamiento con DHT 1.0 nM durante 18 horas (Figura 1). Adicionalmente, la expresión de la luciferasa inducida por exposición a DHT 1.0 nM disminuye en una forma dependiente de la concentración mediante 5, 6 y casodex de una manera similar (Figura 1). Juntos, estos resultados sugieren que los compuestos 5 y 6 como el casodex no poseen actividad agonística o agonística parcial contra AR y pueden ser considerados como antagonistas de andrógenos puros fuertes. Aunque no probamos estos compuestos con células PC-3AR/LU, las cuales expresan AR tipo silvestre, es probable que puedan también comportarse de una forma similar. Hemos mostrado brevemente que algunos de nuestros inhibidores de CYP17 fueron más comparables al casodex que a la flutamida (Long et al., más arriba), y este parece ser el caso con estos nuevos compuestos. En general, nuestros compuestos novedosos interactúan fuertemente con ambos tipos de AR, una indicación de que los compuestos pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con tumores que expresan AR bien sea tipo silvestre o mutado, o para pacientes con expresión de AR amplificado.

Efectos de benzoazoles sobre el crecimiento de células de cáncer de próstata LNCaP y LAPC-4 *in vitro*: Se examinan las capacidades de los compuestos 5 y 6 para inhibir la proliferación de células LNCaP mutantes estimulada por DHT 1 nM. Esta concentración de DHT estimuló la proliferación de células LNCaP en aproximadamente 2 veces en comparación con células tratadas con el vehículo (Figura 2A). Como se muestra en la Figura 2A, los compuestos 5 y 6 inhiben cada uno la proliferación de células LNCaP inducida por DHT en una forma dependiente de la dosis, con valores de IC₅₀ de 6.0 y 1.8 μ M, respectivamente. El casodex se utiliza como control positivo, y exhibe inhibición similar de la proliferación de células LNCaP inducida por DHT (Figura 2A, IC₅₀ = 8.6 μ M). El tratamiento de la línea celular de próstata LAPC4 sensible a andrógenos con DHT 10 nM, sorprendentemente, no induce de manera significativa la proliferación celular (Figura 2B). Otros investigadores también han reportado que la respuesta de las células LAPC4 a andrógenos no es tan pronunciada como se observaba en células LNCaP (Thompson et al., "Androgen antagonist activity by the antioxidant moiety of vitamin E, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol in human prostate carcinoma cells", Molec. Cancer Thera., 2003, 2, 797-803). Sin embargo, los compuestos 5, 6 y el casodex exhiben cada uno una inhibición dependiente de la dosis de esta línea celular (Figura 2B) como con las células LNCaP. El orden de potencia inhibitoria de la proliferación de células LAPC4 es 6 > 5 > casodex, con valores IC₅₀ de 1.0, 3.2 y 10 μ M, respectivamente. Juntos, estos resultados sugieren que 5 y 6 pueden estar actuando para bloquear la acción de DHT en la estimulación de la proliferación celular, en correlación con sus propiedades de enlazamiento y activación del receptor de andrógenos descritos anteriormente. Los compuestos 5 y 6 están entre los antiandrógenos más potentes descritos hasta la fecha.

Farmacocinéticas de 5 y 6 y metabolismo de 5: Las propiedades farmacocinéticas en ratones SCID macho para los dos compuestos candidatos, 5 y 6 se estudian siguiendo nuestro procedimiento recientemente descrito para otros inhibidores de CYP17 (Nnane et al., "Pharmacokinetic profile of 3 β -hydroxy-17-(1H-123-triazol-1-yl)androst-5,16-diene (VN/87-1), a potent androgen synthesis inhibitor in mice", J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 2001, 71, 145-152; y Handratta et al., "Potent CYP17 inhibitors: improved syntheses, pharmacokinetics and antitumor activity in the LNCaP human prostate cancer model Steroid Biechein. Molec. Biol., 2004, 92, 155-165. Los resultados se resumen en la Tabla 2 y en las Figuras 3 - 5.

Sobre HPLC en fase reversa, el 5 [tiempo de retención (rt) = 21.6 minutos] es bien resuelto del estándar interno (16, rt = 11.5 minutos), un metabolito (rt = 17.3 minutos) y otros compuestos endógenos en plasma de ratón (Figura 3). Las curvas de calibración derivadas para 5 son lineales y reproducibles (datos no mostrados), la variabilidad inter e intraensayos es menor de 10% y su límite de detección es 100 ng/ml. El ensayo de HPLC es validado y utilizado para monitorizar 5 en plasma de ratones.

Después de la administración subcutánea, la concentración en plasma de 5 declina exponencialmente con una vida media promedio de aproximadamente 44.17 minutos y rata de eliminación constante de 56.5 min⁻¹. El compuesto 5 es eliminado a una rata de 1986.14 ml/h/kg a partir de la circulación sistémica y no fue detectada a las 6 horas después de la administración. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales calculados con base en el perfil de concentración de plasma después de la administración subcutánea de 5 se muestran en la Tabla 2. Las curvas de concentración en plasma-tiempo después de administración s.c. de 5 (50 y 100 mg/kg) a ratones SCID macho se muestran también en la Figura 4. Después de la administración s.c. de 5, la concentración en plasma observada en ratones alcanza niveles de pico de 30.0 minutos después de la dosis. El compuesto 5 es bien absorbido desde el sitio subcutáneo y el área bajo la curva para los perfiles de concentración en plasma versus tiempo después de administración s.c. se incrementa proporcionalmente a la dosis a medida que de la dosis de administración se cambia de 50 a 100 mg/kg. Adicionalmente, la vida media de eliminación, y el tiempo de residencia medios son relativamente constantes a medida que la dosis de 5 se incrementa de 50 a 100 mg/kg (Tabla 1). Estos resultados indican que el perfil farmacocinético de 5 es independiente de la dosis.

La Figura 5 muestra que una cantidad significativa de un metabolito polar [tiempo de retención, 17.3 minutos, (véase Figura 3)] se forma a partir de 5 y esta presente en el plasma durante los estudios farmacocinéticos *in vivo*. La cantidad máxima del metabolito es 67.72 %, alcanzada aproximadamente 2 horas después de la dosis. Este metabolito muestra tiempo de retención idéntico al compuesto 6. Este metabolito es identificado tentativamente por LC-MS; su masa molecular (m/z 391 = M + H⁺) es consistente con la estructura del compuesto 5 3-oxo- $\Delta^{5,16}$ -tetrahydro (esto es, 17-(1H-bencimidazol-1-il)androst-3-ona). El metabolito puede haber sido formado a partir de 5 a través de la oxidación de 3 β -OH \rightarrow 3-oxo, seguida por reducción (reductasas) de ambos dobles enlaces de Δ^5 y Δ^{16} . Un metabolito similar fue identificado previamente (formado como resultado de la oxidación de 3 β -OH \rightarrow 3-oxo, seguida por la isomerización del doble enlace Δ^5) en ratones macho de un 17-imidazol esteroideal cercanamente relacionado (Handratta et al., más arriba).

Un metabolito principal de 5, esto es, 17-(1H-bencimidiazol-1-il)androst-3-ona, puede ser sintetizado a partir de trans-androsterona; véase Esquema 3. Se espera que también tenga actividad análoga.

La farmacocinética *in vivo* de 6 en ratones es diferente a la del compuesto 5 debido a la C_{max} relativamente baja y rata de eliminación significativamente superior (Figura 4 y Tabla 2). Además, no detectamos ningún metabolismo de compuestos 6 en el plasma, en contraste con nuestra observación con el compuesto 5.

Efectos de 5 y 6 sobre xenoinjertos de LAPC4 cultivados en ratones SCID: Sobre la base de actividades biológicas impresionantes múltiples *in vitro*, esto es, potente inhibición de CYP17, fuerte actividad antiproliferativa de células de cáncer de próstata y actividades antiandrógenicas, 5 y 6 se seleccionaron para estudios de eficacia antitumoral *in vivo* en modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata humano LAPC4 dependiente de andrógenos.

En el primer experimento, se determina el efecto de los compuestos 5 y 6 sobre el crecimiento de tumores cancerosos de próstata LAPC4 bien establecidos en ratones SCID, y se utiliza castración como tratamiento de referencia. Los ratones que portan tumores son asignados (n = 5/grupo) para recibir una de dos dosis de 5 o 6 (0.15 mmol/kg una vez al día o 0.15 mmol/kg dos veces al día). Los volúmenes de los tumores son medidos semanalmente y comparados con los controles que reciben vehículo o con ratones castrados.

La castración lleva a una reducción del 55% del volumen tumoral final, en comparación con el control (Figura 6). La administración de 0.15 mmol/kg una vez al día y 0.15 mmol/kg dos veces al día de 5 da como resultado la reducción de los volúmenes tumorales finales promedio de 41% y 86.5%, respectivamente, en comparación con tumores en animales de control tratados con vehículo (Figura 6). En contraste con la excelente inhibición del crecimiento tumoral para ratones tratados con 5, los ratones tratados con el compuesto 6 son bien sea no efectivos a la dosis baja o incluso muestran estimulación del crecimiento tumoral en comparación con el control (Figura 6). La incapacidad de 6 para inhibir el crecimiento de tumores LAPC4 *in vivo* es especialmente frustrante puesto que el compuesto es muy efectivo en la inhibición

del crecimiento de células PCA *in vitro*, y es un antiandrógeno puro altamente potente (véase Figura 1). La disparidad altamente significativa en la eficacia antitumoral *in vivo* de 5 y 6 no puede ser atribuible fácilmente a diferencias en las propiedades farmacocinéticas de los dos compuestos. Las razones subyacentes para las diferencias dramáticas en la eficacia antitumoral *in vivo* de estos dos compuestos cercanamente relacionados es desconocida en este momento. Sin embargo, puede ser atribuible a que 6 es convertido en los animales a metabolitos que pueden ser un agonista fuerte del receptor de andrógenos produciendo así una estimulación del crecimiento tumoral. Durante el estudio, todos los ratones fueron pesados una vez por semana. Los pesos corporales de todos los grupos tratados se incrementaron ligeramente fueron similares a los incrementos observados con el grupo de control. Todos los ratones aparecieron saludables y no se observaron efectos adversos sugiriendo que los compuestos no tuvieron toxicidad significativa.

El segundo experimento *in vivo* prueba la capacidad de 5 para inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata LAPC4 que crecen en ratones SCID, y 16 (Cuadro 1), un potente inhibidor/antiandrógeno de CYP17 identificado previamente (Gregoriyev et al. and Njar et al., J. Med. Chem., 1998, 41, 902 - 912, más arriba), y se usa castración como tratamiento de referencia. En este experimento, el tratamiento comienza en el día en que los ratones fueron inoculados por vía subcutánea con células de LAPC4 dependientes de hormona y son castrados o inyectados s.c. dos veces al día con 5 o 16. La Figura 7 muestra los efectos de los diversos tratamientos sobre la aparición y sobre el tamaño de los tumores durante las 21 semanas de la terapia.

Todos los otros grupos desarrollan tumores palpables y medibles en la semana 10 de terapia excepto para el grupo tratado con 16 (0.15 mmol/kg dos veces al día) que desarrollan tumores palpables y medibles en la semana 11. El volumen tumoral total en los ratones de control se incrementa en 8 veces a lo largo de 14 semanas de tratamiento cuando los ratones son sacrificados debido a los grandes tumores. Así, los volúmenes del tumor para los otros grupos son comparados con los del grupo de control en la semana 14 del tratamiento. El volumen del tumor en los ratones castrados se incrementa solamente 4.1 veces (alrededor de 50% de reducción en comparación con el control), y es similar al incremento de 3.7 veces (53.8% de reducción en comparación con el control) observado en ratones tratados con 16. En los ratones tratados con 5 (0.15 mmol/kg dos veces al día), el volumen de los tumores se incrementa en solamente 0.5 veces, lo cual representa un 93.8% de reducción versus los ratones de control ($P = 0.00065$). En la semana 16, el volumen tumoral medio en los animales tratados con el compuesto 5 se encuentra como inferior (casi despreciable y durmiente) que su volumen tumoral medio en la semana 10 cuando surgieron tumores medibles. Adicionalmente, 5 produce un efecto inhibidor significativo en tumores, en comparación con 16 o con castración, $P = 0.005$ y 0.05 , respectivamente. En general, los tumores en los ratones tratados con control, castración y compuesto 16 crecen rápidamente, mientras que el tumor de los ratones tratados con 5 crece muy lentamente y de una manera bifásica (Figura 7). El compuesto 5 es el agente más efectivo, y significativamente es mucho más efectivo que la castración en la inhibición del crecimiento tumoral. Es interesante anotar que aunque 16 es 6 veces más potente que 5 en la inhibición de CYP 17, este último exhibe una actividad antitumoral *in vivo* superior. Las razones responsables de este fenómeno son desconocidas en este momento, pero en parte puede deberse a mejores propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinamias de 5.

Para determinar si los tumores de próstata "durmientes" tratados con el compuesto 5 (véase Figura 7, semana 16) son capaces de crecer bajo una dosis inferior de 5, su dosis fue reducida a 0.15 mmol/kg tres veces a la semana (una reducción de 78.6% en dosificación) a partir de las semanas 16 - 9, y los volúmenes de tumor fueron medidos semanalmente. Durante este periodo de tratamiento con dosis reducida del compuesto, los tumores reiniciaron el crecimiento (Figura 7). Después de este intervalo de 3 semanas, se reinició el tratamiento con fármaco con la dosis usual, y el crecimiento del tumor se hizo más lento y alcanzó una meseta. Estos datos sugieren una naturaleza hipostática de este tratamiento y sugiere la necesidad de una administración continua para alcanzar el efecto antitumoral.

Al final del experimento, se determinaron los niveles de 5 en los tumores y órganos de los ratones tratados con 5. Se midieron los niveles de 5 por HPLC en los tumores, testículos e hígado 1 hora después de la administración de la dosis final (inserto de la Figura 7). De manera interesante, se detectó una cantidad pequeña (~ 15% con respecto a 5) de metabolito en los tejidos del hígado. Este metabolito tiene el mismo tiempo de retención que el metabolito observado en el plasma (*vide supra*). La concentración más alta de $39.0 \pm 8.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido de 5 se mide en los tumores s.c. Las concentraciones en el hígado y testículos son inferiores pero detectables. El nivel de 5 en tumores es significativamente más alto que los niveles medidos en el plasma, lo cual puede ser un resultado de acumulación del compuesto a través del periodo del experimento. Así, la inhibición del crecimiento tumoral por parte de 5 puede ser explicada en parte por concentraciones más altas en xenoinjertos de tumor, la cual puede ejercer un efecto directo citotóxico/citostático sobre las células de cáncer de próstata. Debe establecerse que hay evidencia que sugieren un posible efecto citotóxico directo del ketoconazol (un inhibidor modesto de CYP 17) sobre las células de cáncer de próstata.³³ Además, la acumulación de 5 en los testículos permitiría la inhibición de la síntesis de testosterona en los animales.

Aunque está bien establecido que las LAPC4 son dependientes de andrógenos, estas células pueden hacerse independientes de andrógenos, y como tales representan un modelo adecuado que imita el desarrollo de cáncer de próstata en pacientes (Chen et al., más arriba, y Kline et al., "Progression of metastatic human prostate cancer to androgen

independence in immunodeficient SCID mice," *Nat. Med.*, 1997, 3, 402-408). Como se muestra en la Figura 7, son capaces de replicar este fenómeno. Adicionalmente, nuestros resultados muestran que el tratamiento con 5 o la castración suprimen efectivamente el crecimiento tumoral durante un cierto periodo (fase dependiente de andrógenos), pero fue inefectiva después de ello (posiblemente como resultado de una fase independiente de andrógenos) puesto que los tumores crecieron rápidamente al igual que en ratones de control intactos. El crecimiento tumoral en los ratones tratados con 5 se suprime fuertemente a lo largo del periodo de tratamiento. Esto sugiere que 5 puede tener efectos sobre el cáncer de próstata independiente de andrógenos. Sin embargo, también es plausible que el tratamiento con este compuesto permita que los tumores LAPC4 permanezcan siendo dependientes de andrógenos durante un período más largo y por lo tanto respondan a una terapia antiandrogénica.

- 10 Estudios recientes que demuestran claramente la sobrerregulación y participación de AR en PCA avanzado y recurrente (Mohler et al., y Chen et al., más arriba) han renovado el interés en el receptor de andrógenos como un objetivo para el desarrollo de fármacos para tratar PCA (Tindall et al., "Symposium on androgen action in prostate cancer", *Cancer Res.*, 2004, 64, 7178-7180). Debido a estas propiedades potentes, 5 puede ser un candidato excelente.

Conclusiones:

- 15 Los datos refuerzan nuestro concepto anterior de modificación del sustituyente de C17 de esteroide Δ^{16} para producir inhibidores potentes de CYP17 así como antagonistas potentes de AR. Los 17-bencimidazoles 5 y 6 demuestran coordinar el hierro heme de CYP17, una propiedad que puede ser en parte responsable de su actividad inhibitoria de la enzima. Los compuestos 5 y 6 se exhiben casi equipotentes en actividades *in vitro* para la inhibición de CYP17, antagonismo de AR, e inhibición del crecimiento de células cancerosas de próstata. Sorprendentemente, los compuestos son muy diferentes en sus actividades antitumorales, puesto que 5 produce una supresión marcada de crecimiento de xenoinjerto tumoral LAPC4, y en contraste, 6 (0.15 mmol/kg dos veces al día) potencia el crecimiento del tumor. El presente estudio provee evidencia convincente de que 5 es un inhibidor potente del crecimiento de tumores de próstata humanos y es notablemente más efectivo que la castración. Este es el primer ejemplo de un inhibidor/antiandrogénico de CYP17 que demuestra actividad antitumoral *in vivo* contra un tumor de cáncer de próstata hasta un grado que es notablemente más efectivo que la castración. Estas actividades biológicas impresionantes, hacen de 5 un fuerte candidato para desarrollo posterior como un fármaco potencial para el tratamiento de cáncer de próstata en humanos. La excelente actividad antitumoral del compuesto 5, que contiene un grupo bencimidazol hace que los bencimidazoles sean un grupo preferido. Sin embargo, se espera que análogos de 5 tal como se discutió más arriba tengan una actividad relacionada.

Sección experimental

- 30 Química: Los procedimientos generales y las técnicas fueron idénticos a los reportados previamente (Njar et al., *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 902 - 912). Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrómetro Perkin Elmer 1600 FTIR utilizando soluciones en CHCl_3 . Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se determinaron en un espectrómetro de masas 3-Tesla Finnigan FTMS-2000 FT, modo ESI (Ohio State University, Departamento de Química). Como criterio de pureza para compuestos objetivo claves, proveímos datos espectrales de masas de alta resolución con datos cromatográficos de HPLC que indicaban la homogeneidad del compuesto. Los espectros de masas de baja resolución (LRMS) se determinaron en un Finnigan LCR-MS. Los puntos de fusión (mp) se determinan con un aparato de punto de fusión Fischer Johns y están sin corrección. La deshidroepiandrosterona y el acetato de deshidroepiandrosterona fueron adquiridos en Aldrich, Milwaukee, WI. 5-Tributilestanilpirimidina y 2-tributilestanilpirazina fueron adquiridos en Frontier Scientific, Inc., Logan, UT.
- 40 3β -acetoxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (2): Este compuesto preparado a partir de 3β -acetoxiandrosta-5-en-17-ona (1) como se describió previamente, produjo datos espectrales y analíticos como se describió (Njar et al., *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 902 - 912).

- 45 3β -acetoxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (3): Una mezcla de 3β -acetoxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (2, 2.5 g, 6.65 mmol), bencimidazol (2.35 g, 19.9 mmol), y K_2CO_3 (2.76 g, 23.9 mmol) en DMF seco (20 mL) se agita a aproximadamente 80 °C bajo Ar durante 1.5 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reactante se vierte sobre agua enfriada con hielo (250 mL) y el precipitado resultante es filtrado, lavado con agua y secado para dar un sólido blanco sucio crudo (ca. 2.9 g). La purificación por FCC [éter de petróleo/EtOAc/ Et_3N (6:4:0.3)] da 2.7 g (88.7%) de compuesto puro 3: mp 227-230 °C; IR (CHCl_3) 3691, 3024, 2951, 2359, 1725, 1670, 1604, 1491, 1452, 1375, 1253, 1032, 897, 852, 818, 700, 657, 618, 576, 565, 550, 529, 511, 476 cm^{-1} ; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 1.07 (s, 6H, 18- y 19- CH_3), 2.04 (s, 3H, 3β - OCH_3), 4.60 (m, 1H, 3α -H), 5.43 (br s, 1H, 6-H), 7.35 (br. s, 2H, aromático-Hs), 7.85 (s, 1H, aromático-H), 7.98 (s, 1H, aromático-H), 7.98 (s, 1H, 2^1 -H) y 9.59 (s, 1H, 16-CHO). HRMS calculado 481.2462 ($\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{N}_2\text{Na}^+$), encontrado 481.2454.

3 β -acetoxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (4): Una solución de 3 β -acetoxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (3, 2.04 g, 4.45 mmol) en benzonitrilo seco (10 mL) fue sometida a reflujo en la presencia de paladio al 10% sobre carbón activado (1.02 g, esto es, 50% en peso de 3) durante 5 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el catalizador fue retirado por filtración a través de un lecho de Celite. El filtrado fue evaporado, y el residuo fue purificado por FCC [éter de petróleo /EtOAc/Et₃N (7.5:3:0.5)] dio 1.41 g (73.8%) de compuesto puro 4: mp 159-160 °C; IR (CHCl₃) 3687, 2947, 2854, 2358, 2340, 1725, 1633, 1609, 1557, 1489, 1454, 1373, 1291, 1253, 1195, 1136, 1031, 985, 910, 839, 735, 665, 590, 544, 533, 513, 502, 488 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (s, 3H, 19-CH₃), 2.04 (s, 3H, 3 β -OCH₃), 4.62 (m, 1H, 3 α -H), 5.43 (br s, 1H, 6-H), 5.98 (s, 1H, 16-H), 7.30 (m, 2H, aromático-Hs), 7.49 (s, 1H, aromático-H), 7.81 (s, 1H, aromático-H), y 7.95 (s, 1H, 2¹-H). HRMS calculado 453.2512 (C₂₈H₃₄O₂N₂.Na⁺), encontrado 453.2511.

3 β -hidroxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-5,16-dieno (5): El acetato 4 (1.3 g 3.02 mmol) fue disuelto en metanol (20 mL) bajo una atmósfera inerte de Ar, y la solución resultante fue tratada con KOH metanólico al 10% (8 mL). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1.5 horas, y luego concentrado bajo presión reducida a aproximadamente 40 °C hasta un volumen de 10 mL. Esta solución fue vertida sobre hielo con agua (300 mL), y el precipitado blanco resultante fue filtrado, lavado con agua y secado. La cristalización desde EtOAc/McOH dio 5 (1.10 g, 94%), mp 189-190 °C; IR (CHCl₃) 2934, 2339, 1609, 1490, 1453, 1291, 1040, 837, 808, 705, 663, 608, 578, 550, 517 cm⁻¹; ¹RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (s, 3H, 18-CH₃), 1.07 (s, 3H, 19-CH₃), 3.55 (m, 1H, 3 α -H), 5.41 (br s, 1H, 6-H), 5.99 (s, 1H, 16-H), 7.30 (m, 2H, aromático-Hs), 7.54 (s, 1H, aromático-H), 7.80 (s, 1H, aromático-H), y 7.96 (s, 1H, 2¹-H). HRMS calculado 411.2407 (C₂₆H₃₂ON₂.Na⁺) encontrado 411.2396.

17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-4,16-dieno-3-ona (6): De una muestra de compuesto 5 (660 mg, 1.70 mmol), 1-metil-4-piperidone (2.5 mL), y tolueno (40 mL) se destilaron cerca de 10 mL. Se agregó entonces isopropóxido de aluminio (521 mg, 2.55 mmol), y la mezcla fue sometida a reflujo bajo Ar durante 4 horas. Después del enfriamiento, la mezcla fue diluida con EtOAc (50 mL), lavada sucesivamente con NaHCO₃ acuoso al 5% (x3) y salmuera (x2), y luego secada (Na₂SO₄). El solvente fue evaporado, y el producto crudo fue purificado por FCC [CH₂Cl₂/EtOH (25:1)] para el compuesto del título 6 (544 mg, 82%) : mp 201-204 °C; IR (CHCl₃) 2946, 2858, 1622, 1611, 1490, 1453, 1376, 1291, 1270, 1228, 1189, 893, 850, 837, 722, 662, 615, 568, 553, 537, 519 cm⁻¹; ¹RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.04 (s, 3H, 18-CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-CH₃), 5.78 (s, 1H, 4-H), 5.99 (s, 1H, 16-H), 7.31 (m, 2H, aromático-Hs), 7.48 (m, 1H, aromático-H), 7.81 (s, 1H, aromático-H), y 7.95 (s, 1H, 2¹-H). HRMS calculado 409.2250 (C₂₆H₃₀ON₂.Na⁺), encontrado 409.2250.

Reacción de 3 β -acetoxi-17-cloro-16-formilandrosta-5,16-dieno (2) con benzo-1H-1,2,3-triazol y K₂CO₃: 3 β -acetoxi-17-(benzo-2H-1,2,3-triazol-2-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7a) y 3 β -acetoxi-17-(benzo-1N-1,2,3-triazol-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7b): Una mezcla del compuesto 2 (2.5 g, 6.65 mmol), benzotriazol (2.35g, 19.9 mmol), y K₂CO₃ (2.76 g, 23.9 mmol) en DMF seco (20 mL) fue agitada hasta cerca de 80 °C bajo Ar durante 45 minutos. Después de enfriamiento hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue vertida sobre agua enfriada con hielo (250 mL) y el precipitado resultante fue filtrado, lavado con agua y secado para dar un sólido blanco sucio crudo. La purificación por FCC [éter de petróleo/EtOAc, (4:1)] primero dio 3 β -acetoxi-17-(benzo-2H-1,2,3-triazol-2-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7a, 0.3 g, 9.8 %) como producto menor; mp 248-250 °C; IR (CHCl₃) 3023, 2945, 2358, 1725, 1657, 1600, 1375, 1257, 1032, 728, 656, 584, 564, 540, 526, 506, 498 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.11 (s, 3H, 18-CH₃), 1.37 (s, 3H, 19-CH₃), 2.04 (s, 3H, 3 β -OCH₃), 4.62 (m, 1H, 3 α -H), 5.43 (br s, 1H, 6-H), 7.43 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, aromático-Hs), 7.45 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, aromático-H), 7.88 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, aromático-H), 7.90 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, aromático-H) y 10.66 (s, 1H, 16-CHO). HRMS calculado 482.2414 (C₂₈H₃₃O₃N₃.Na⁺), encontrado 482.2413. Elución posterior con el mismo sistema de solventes produjo el producto principal, 3 β -acetoxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-il)-16-formilandrosta-5,16-dieno (7b, 2.3 g, 75.4 %); mp: 186-188 °C; IR(CHCl₃) 3023, 2948, 1725, 1670, 1604, 1488, 1450, 1374, 1253, 1196, 1032, 846, 824, 720, 658, 619, 548, 527, 504, 497 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.07 (s, 6H, 18- and 19-CH₃), 2.04 (s, 3H, 3 β -OCH₃), 4.60 (m, 1H, 3 α -H), 5.43 (br s, 1H, 6-H), 7.46 (m, 2H, aromático-Hs), 7.57 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, aromático-H), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), aromático-H), y 9.59 (s, 1H, 16-CHO). HRMS calculado 482.2414 (C₂₈H₃₃O₃N₃.Na⁺), encontrado 482.2416.

3 β -acetoxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (8): Una mezcla de cloruro de bis(trifenilfosfin)rodio (I) carbonilo (303n mg, 0.438 mmol) y 1,3-bis-(difenilfosfino)propano (394 mg, 0.954 mmol) en xileno seco (40 mL) fue agitado a 80 °C bajo Ar durante 15 minutos cuando se formo un precipitado amarillo fino. El compuesto 7b (1.71 g, 3.72 mmol) fue agregado, y la mezcla fue sometida a reflujo bajo Ar durante 18 horas, y luego concentrada bajo presión reducida. El producto crudo fue purificado por FCC [éter de petróleo/BtOAc/Et₃N, (8.9:1:0.1)] para dar 1.2 g (74.7 %) de compuesto puro 8; mp 184-186 °C. IR (CHCl₃) 3063, 2918, 23 89, 2358, 1725, 1458, 1373, 1254, 1069, 1031, 843, 809, 786, 692, 646, 560, 535, 528, 512, 494 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.10 (s, 3H, 18-CH₃), 1.25 (s, 3H, 19-CH₃), 2.04 (s, 3H, 3 β -OCH₃), 4.64 (m, 1H, 3 α -H), 5.43 (br s, 1H, 6-H), 6.01 (s, 1H, 16-H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.51 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, aromático-H), y 8.10 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, aromático-H). HRMS calculado 454.2465 (C₂₇H₃₃O₂N₃.Na⁺), encontrado 454.2469.

- 5 β -hidroxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (9): El método siguió el descrito para el compuesto 5 pero utilizando β -acetoxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (8; 700 mg, 1.62 mmol). La recristalización desde EtOAc/MeOH dio el compuesto del título 9 (600 mg, 95%); mp 241-244 °C; IR (CHCl₃) 3603, 2937, 2859, 1609, 1488, 1451, 1373, 1287, 1243, 1069, 1040, 1007, 953, 845, 805, 715, 665, 618, 570, 553, 517 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.09 (s, 3H, 18-CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-CH₃), 3.55 (m, 1H, 3 α -H), 5.41 (br s, 1H, 6-H), 6.06 (s, 1H, 16-H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.52 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, aromático-H), y 8.10 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, aromático-H). HRMS calculado 412.2359 (C₂₅H₃₁ON₃.Na⁺), encontrado 412.2365.
- 10 17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-4,16-dieno-3-ona (10): El método siguió el descrito para el compuesto 6 pero utilizando β -hidroxi-17-(benzo-1H-1,2,3-triazol-1-il)androsta-5,16-dieno (9; 500 mg, 1.28 mmol). La purificación del producto crudo por FCC [CH₂Cl₂/EtOH, (50:1)] produjo el compuesto 10 del título (420 mg, 84.4%); mp: 280-283 °C; IR (CHCl₃) 2944, 1658, 1450, 1070, 8444, 825, 721, 624, 589, 564, 554, 541, 521 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (s, 3H, 18-CH₃), 1.27 (s, 3H, 19-CH₃), 5.77 (s, 1H, 4-H), 6.01 (s, 1H, 16-H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.52 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), 7.67 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, aromático-H), y 8.10 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, aromático-H). HRMS calculado 410.2203(C₂₅H₂₉ON₃.Na⁺), encontrado 410.2185.
- 15 Deshidroepiandrosterona-17 hidrozona (12): Se disolvió deshidroepiandrosterona (11, 3.5 g, 12.2mmol) en etanol (60 mL); y la solución resultante fue tratada con hidrato de hidrazina (2.37 mL, 0.049 mol) seguido por una solución de sulfato de hidrazina (7.9 mg, 0.061 mmol) en 0.25 mL de agua. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 12 horas y luego vertida sobre agua con hielo. El precipitado resultante fue filtrado, lavado con agua y secado para dar cristales blancos del compuesto 12 del título; mp: 242-244 °C (lit. 204-206 °C); ²² ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.76 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05 (s, 3H, 19-CH₃), 3.74 (br s, 1H, 3-H) y 5.35 (s, 1H, 6-H).
- 20 17-Yodoandrosta-5,16-dieno- β -ol (13): Una solución en agitación de yodo (12.16 g, .0203 mol) en THF seco (144 mL) y Et₂O seco (72 mL) fue enfriada en un baño de hielo a 0 °C y la solución fue tratada con 1,1,3,3, tetrametil-guanidina (6.72 mL, 6.24g, .054 mol). Una solución del compuesto 12 (3.0 g, 9.9 mmol) en THF (81 mL) fue agregada gota a gota a la solución de yodo durante 2 horas manteniendo la temperatura de reacción a 0 °C. La mezcla de reacción fue concentrada entonces bajo vacío, enfriada en un baño de hielo y luego secada bajo vacío a temperatura ambiente para producir un sólido amarillo (13, 3.65 g, 92.4%). mp: 169-171 °C. (lit. 175-176 °C); ²² IR (CHCl₃) 2935, 1371, 1039, 862, 843, 799, 715, 665, 582, y 566 cm⁻¹; ¹H RMN(300 MHz, CDCl₃): δ 0.76 (s, 3H, 18-CH₃), 1.05 (s, 3H, 19-CH₃), 3.50 (br s, 1H, 3 α -H), 5.35 (s, 1H, 6-H) y 6.14 (s, 1H, 16-H).
- 25 β -hidroxi-17-(2-pirazil)-androsta-5,16-dieno (14): Una mezcla de 17-iodoandrosta-5,16dieno- β -ol (13; 0.5 g, 1.257 mmol) en solución con dimetilformamida seca (DMF, 10 mL) junto con tetrakis(trifenilfosfato) paladio (Pd(PPh₃)₄) (71.6 mg, 0.062 mmol) y (2-tributylestanil) pirazina (774.6 mg, 2.099 mmol) fue calentada a 120 °C durante 20 horas. Después de enfriamiento, la mezcla fue diluida con agua fría (50 mL), y extraída con EtOAc (30 mL x 3). Los extractos en EtOAc combinados fueron lavados con salmuera y agua, secados sobre Na₂SO₄ y luego concentrados para dar un sólido marrón. Este producto crudo fue purificado por cromatografía de columna instantánea [FCC, éter de petróleo/EtOAc/Et₃N (3:2:0.15)] para dar 14 (66 mg, 15%); mp: 199-201 °C. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.94 (s, 3H, 18-CH₃), 1.08 (s, 3H, 19-CH₃), 3.52 (br s, 1H, 3 α -H), 5.40 (s, 1H, 6-H), 6.77 (s, 1H, 16-H), 8.35(s, 1H, pirazina-H), 8.48(s, 1H, pirazina-H), 8.70 (s, 1H, pirazina-H). HRMS calculado 350.2358 (C₂₃H₃₀ON₂), encontrado 350.2354.
- 30 β -hidroxi-17-(5-pyrimidil)-androsta-5,16-dieno (15): La reacción de 13 (0.645 g, 1.623 mmol) como se describió anteriormente para 14, pero utilizando (5-tributylestanil) pirimidina (1.0 g, 2.710 mmol) disuelto en 10 mL de DMF seco junto con CPd(PPh₃)₄ (92.88 mg, 0.0804 mmol) y (5-tributylestanil) pirimidina (1.0 g, 2.710 mmol) y después purificación por [FCC, éter de petróleo/EtOAc/Et₃N (3:2:0.15)] dio β -hidroxi-17-(5-pyrimidil)-androsta-5,16-dieno 15 (44 mg, 10%); mp: 231-233 °C (lit. 240-242 °C); ¹⁹ ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (s, 3H, 18-CH₃), 1.08 (s, 3H, 19-CH₃), 3.83 (br s, 1H, 3 α -H), 5.39 (s, 1H, 6-H), 7.26 (s, 1H, 16-H), 8.73 (s, 2H, 4'-H and 6'-H) and 9.07 (s, 1H, 2'-H). HRMS calculado 350.2358 (C₂₃H₃₀ON₂), encontrado 350.2348,
- 40 β -hidroxi-17-(5-pyrimidil)-androsta-5,16-dieno (15): La reacción de 13 (0.645 g, 1.623 mmol) como se describió anteriormente para 14, pero utilizando (5-tributylestanil) pirimidina (1.0 g, 2.710 mmol) disuelto en 10 mL de DMF seco junto con CPd(PPh₃)₄ (92.88 mg, 0.0804 mmol) y (5-tributylestanil) pirimidina (1.0 g, 2.710 mmol) y después purificación por [FCC, éter de petróleo/EtOAc/Et₃N (3:2:0.15)] dio β -hidroxi-17-(5-pyrimidil)-androsta-5,16-dieno 15 (44 mg, 10%); mp: 231-233 °C (lit. 240-242 °C); ¹⁹ ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (s, 3H, 18-CH₃), 1.08 (s, 3H, 19-CH₃), 3.83 (br s, 1H, 3 α -H), 5.39 (s, 1H, 6-H), 7.26 (s, 1H, 16-H), 8.73 (s, 2H, 4'-H and 6'-H) and 9.07 (s, 1H, 2'-H). HRMS calculado 350.2358 (C₂₃H₃₀ON₂), encontrado 350.2348,
- 45 Ensayo *in vitro* de CYP17: Las actividades inhibitoras de CYP17 *in vitro* de los compuestos son evaluados utilizando nuestro ensayo de liberación rápido de ácido acético (AARA), utilizando *E. coli* que expresa P450c17 intacto como fuente de enzima (Grigoryev, más arriba). Involucra el uso de [21-³H]-17 α -hidroxipregnenolone como sustrato y la actividad de CYP 17 se mide por la cantidad de ácido acético tritiado formado durante la escisión de la cadena lateral C-21 del sustrato. Esto establece que el método es comparable en términos de exactitud y confiabilidad con el procedimiento de análisis por HPLC utilizado por investigadores en el campo (Grigoryev, más arriba). Los valores de IC₅₀ se obtienen directamente de gráficas que relacionan el porcentaje de inhibición versus la concentración del inhibidor en rangos apropiados. Cada compuesto es probado en un mínimo de cinco concentraciones diferentes, los ensayos se llevan a cabo en triplicado, y los valores IC₅₀ reportados son la media de experimentos por triplicado. Las desviaciones estándar fueron \pm 5% de los valores medios.
- 50

Ensayo con 5 α -reductasas Tipo 1 y 2 humanas: Las actividades inhibitoras de los compuestos y la finasteride como referencia se determinaron utilizando la línea celular DU145 (para enzima humana Tipo 1) y homogenizado de próstata humana (tejido BPH para enzima tipo 2) de acuerdo con el procedimiento descrito por Hartmann y colegas (Picard et al., "Synthesis and evaluation of 2'-substituted 4-(4'-carboyl- or 4'-carboxymetilbenzylidene)-N-acylpiperidines: Highly potent and *in vivo* active steroid 5 α -reductase type 2 inhibitors", J. Med. Chem., 2002, 45, 3406-3417). Se determinan los valores de inhibición porcentuales a una concentración de 10 μ M o, en caso de compuestos más potentes, los valores IC₅₀.

Ensayos de enlazamiento del receptor de andrógenos (AR) competitivo y luciferasa: Enlazamiento de AR/Ensayo de competición: Pozos en placas multipozos de 24 pozos fueron recubiertos con poli-1-lisina (0.05 mg/ml) durante 5 minutos, secados, enjuagados con agua esterilizada, destilada, y secados durante 2 horas. Para determinar la cinética del enlazamiento de R1881 a la AR LNCaP y la AR tipo silvestre, se sembraron células LNCaP y PC3AR (2 - 3 x 10⁵) en placas multipozos de 24 pozos en medio libre de esteroides y se dejaron unir. Al día siguiente el medio se reemplaza con RPMI libre de esteroides, libre de suero suplementado con BSA al 0.1% y que contenía [³H]R1881 (0.01-10 nM) en la presencia o ausencia de un exceso de 200 veces de DHT frío, para determinar el enlazamiento no específico, y triancinolona acetona 1 μ M para saturar los receptores de progesterona y glucocorticoides. Después de un período de incubación de 2 horas a 37°C, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS enfriado con hielo y solubilizadas en DPBS que contenía SDS al 0.5% y glicerol al 20%. Los extractos fueron removidos y la radioactividad asociada a las células fue contada en un contador de centelleo. Los datos son analizados incluyendo la determinación de Kd y Bmax, por regresión no lineal utilizando el software Graphpad Prism. Cuando la concentración requerida para casi saturar AR en ambas líneas celulares se establece, se determina la capacidad de los compuestos de prueba (0.1 nM – 10 μ M) para desplazar [³H]R1881 (5.0 nM) de los receptores como se describió anteriormente. La IC₅₀ de cada compuesto es determinada por regresión no lineal con el software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Ensayo de transactivación de luciferasa: El ensayo de activación transcripcional se lleva a cabo como se describió previamente por Kim et al., más arriba, con modificaciones menores. El constructo ARR2-Luc informado de probasin luciferasa es generado por inserción del promotor de probasin mínimo ARR2, provisto amablemente por el Dr R. Matusik de Vanderbilt University Medical Center (Endocrinology, 2000, 141: 4698-4710) en la región de enlazamiento policlonal del vector potenciador de PGL3 (Promega). El pRL-null (Promega) se utiliza como control interno. En resumen, células LNCaP cultivadas en placas de 24 pozos, recubiertos con poli-L-lisina fueron transfectadas con ARR2-Luc en el medio RPMI 1640 libre de rojo de fenol que contenía FBS en tiras de carbón al 5% (Hyclone). 24 horas después de la transfección, las células son incubadas con medio RPMI 1640 libre de suero libre de rojo de fenol fresco con o sin DHT e inhibidores durante 18 horas. Las actividades de luciferasa se miden en triplicado utilizando el sistema de ensayo de luciferasa dual de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Los resultados se presentan como la inducción plegada, esto es la actividad de luciferasa relativa de las células tratadas dividida por la del control.

Ensayo de cultivo y viabilidad celular: Las células LNCaP son cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% y solución de penicilina/estreptomicina al 1%. Para determinar el efecto de los compuestos novedosos sobre la proliferación celular, las células son transferidas en medio libres de esteroides 3 días antes del inicio de los experimentos. El medio libre de esteroides consiste de RPMI libre de rojo de fenol suplementado con suero tratado con carbón recubierto con dextrano al 5 % y solución de penicilina/estreptomicina al 1 %. Los estudios de crecimiento se llevan entonces a cabo sembrando células (3 x 10⁴) en placas multipozos de 24 pozos (Corning, Inc. Corning, NY). Después de un período de enlazamiento de 24 horas, el medio es aspirado y reemplazado a medias con medio libre de esteroides que contiene vehículo o la concentración indicada de DHT (1 nM) y los compuestos (0.1 μ M – 10 μ M). Los pozos de control son tratados con vehículo (etanol). Este medio es cambiado cada tres días y el número de células viables es comparado por el ensayo WST-1[4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato] en el séptimo día. Después de la incubación de las células durante el período de tiempo antes mencionado, se agrega solución de WST-1 al 10% a cada pozo y se incuba a 37°C durante tres horas. Después de la incubación, las placas son agitadas ligeramente e inmediatamente leídas a 450 nm con un espectrofotómetro de barrido de pozos múltiples. Todos los resultados representan el promedio de un mínimo de tres pozos. El control adicional consiste de medio solo sin células.

Estudios farmacocinéticos: Todos los estudios animales se llevan a cabo de acuerdo con las guías y aprobación de la Animal Care Committee de la University of Mariland School of Medicine, Baltimore. Ratones SCID machos con pesos entre 20 - 22 gramos (8 - 10 semanas de edad) obtenidos de NCI, Frederick, MD, Estados Unidos, son mantenidos en un ambiente controlado de aproximadamente 25°C, 50% de humedad relativa y ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se dejaron con acceso libre a comida y agua. Los compuestos 5 y 6 son formulados en β -ciclodextrina al 40% en agua y se da a los ratones una dosis subcutánea individual. Los animales son sacrificados en diversos momentos hasta 6 horas después de la administración del fármaco y se obtiene sangre por punción cardíaca bajo anestesia ligera con halotano (Ayerst, New York, NY, Estados Unidos).

Análisis por HPLC: Las separaciones y cuantificación cromatográficas de los esteroides y los estándares internos apropiados son logrados mediante un método de HPLC en fase reversa sobre una columna C18 Waters® Novapa® (3.9 x 150 mm) protegida mediante un cartucho de protección Waters® empacado con película de C18 como se describió

previamente. En resumen, el sistema de HPLC usado en este estudio consistió de un sistema de suministro de solvente Waters®, un controlador Waters® (Milford, MA), acoplado a un automuestreador Waters® 717^{plus} y a un detector de arreglo de fotodiodos Waters® 996 operado a 242.7 nm. La composición de fase móvil es agua/McOH/CH₃CN (35:35:30, v/v/v + 200 µL de Et₃N y 0.77 g de NH₄OAc por 1000 mL de fase móvil) a una tasa de flujo de 1.0 mL/minuto. El análisis por HPLC se lleva a cabo a temperatura ambiente y la adquisición y manejo de datos se consigue con un controlador de cromatografía Waters® milenio. Preparación de la muestra: Los tubos de ensayo que contienen plasma de ratón (200 µL), 5 o 6 y VN/85-1 (estándar interno, 10 µL de 100 µg/mL), son extraídos con dietil éter (2 x 2 mL) utilizando un mezclador vórtex durante 3 minutos y centrifugado a 3000 g durante 5 minutos. Las capas orgánicas fueron evaporadas hasta sequedad bajo una corriente suave de aire. El residuo es reconstituido en una alícuota de la fase móvil (100 µL) y filtrado utilizando filtros de teflón de 0.2 µm antes del análisis por HPLC. Validación de la curva de calibración y ensayo de HPLC: Las curvas de calibración para 5 en plasma y tejido y para 6 en plasma son construidas seleccionando cantidades variables de los compuestos en tubos de extracción (por duplicado) que contienen plasma (200 µL) y preparaciones de tejido (200 µL) de animales no tratados para dar concentraciones finales de 0.1 - 100.0 µg/mL. También se preparan tubos de extracción con blanco apropiados y se agrega una alícuota del estándar interno en cada tubo de extracción para dar una concentración final de 5 µg/ml. Las muestras de calibración son tomadas a lo largo del procedimiento de preparación de muestra como se describió anteriormente. Una alícuota del extracto reconstituido (50 µl) es inyectada en el sistema de HPLC y la relación de las áreas de pico para cada analito con respecto a la del estándar interno se representan gráficamente contra concentraciones de 5 o 6. La precisión y exactitud de los ensayos son determinadas a partir de un rango de concentraciones conocidas de los inhibidores en plasma de blanco y tomadas a lo largo del procedimiento de HPLC. El estudio es repetido en tres ocasiones separadas.

Análisis de datos: Los cálculos farmacocinéticos se llevan a cabo como se describió previamente. Los cálculos farmacocinéticos no compartimentales se llevan a cabo utilizando WinNONlin (Scientific Consulting Inc.). Se utiliza el análisis de una vía de la varianza (ANOVA) para Windows versión 1.0 con el fin de comparar diferentes grupos de tratamiento a un nivel de 95% de confiabilidad. Se utiliza la prueba Bonferroni post-hoc para la determinación del significado. Un valor de P de menos de 0.05 es considerado como estadísticamente significativo. Estudios antitumorales *in vivo* (xenoinjertos de cáncer de próstata LAPC-4): Todos los estudios animales se llevan a cabo de acuerdo con las guías y aprobación del Animal Care Committee of the University of Mariland School of Medicine, Baltimore. Ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID) macho de 4 - 6 semanas de edad comprados del National Cancer Institute-Fredrick Cancer Research and Development Center (Fredrick, MD) son alojados en un ambiente libre de patógenos bajo condiciones controladas de luz y humedad y se les permitió acceso libre a alimentación y agua. Los tumores fueron desarrollados a partir de células LAPC4 inoculadas subcutáneamente (s.c.) en los ratones esencialmente como se describió previamente (21). Las células LAPC4 son cultivadas en IMEM con FBS al 15% más PS al 1% y DHT 10nm hasta confluencia del 80%. Las células son raspadas en DPBS, recolectadas por centrifugación y resuspendidas en Matrigel (10 mg/ml) a 3×10^7 células/ml. Los ratones son inyectados s.c. con 100 µl de la suspensión de células en un sitio de cada flanco. Los tumores son medidos semanalmente con calibradores, y los volúmenes tumorales son calculados con la fórmula: $4/3\pi \times r_1^2 \times r_2$ ($r_1 < r_2$).

En el primer experimento, se permite que los tumores LAPC4 crezcan durante 8 - 10 semanas después de la inoculación. Grupos de 5 ratones con volúmenes totales de tumor comparables son castrados o tratados con 5 y 6 (0.15 mmol/kg una vez al día y 0.15 mmol/kg dos veces al día, 9 a.m. y 5 p.m.). Los ratones son castrados bajo anestesia con metoxifluorano. Los compuestos 5 y 6 fueron preparados a 17.2 mg/ml en una solución al 0.3% de hidroxipropil celulosa en solución salina, y los ratones recibieron inyecciones s.c. diariamente. Los ratones de control y los castrados son tratados con vehículo solamente. Los tumores son medidos semanalmente durante las 4 semanas de tratamiento y se calculan los volúmenes de los tumores. Al final del periodo de tratamiento, los animales son sacrificados bajo anestesia con halotano; los tumores son escindidos, pesados y almacenados a -80°C. Los animales también son pesados semanalmente y monitorizados en cuanto a su estado general de salud y signos de posible toxicidad debida al tratamiento.

En el segundo experimento, los ratones son inoculados con células LAPC4 y son divididos en cuatro grupos de 5 ratones cada uno. Los grupos de control y castrados reciben vehículo, mientras que los otros dos grupos reciben bien sea VN/85-1 (0.15 mmol/kg dos veces al día, 9 a.m. y 5 p.m.) o 5 (0.15 mmol/kg dos veces al día, 9 a.m. y 5 p.m.). Estos tratamientos son iniciados un día después de la inoculación de células LAPC4; continuaron durante 14 semanas para el grupo de control, 19 semanas (para los grupos VN/85-1 y de castración) y durante 21 semanas para el grupo tratado con 5 y los tumores se miden y procesan como se describió anteriormente.

Medición de los niveles de 5 (VN/124-1) en tumor, hígado y testículos: Los animales en el grupo tratado con VN/124-1 son sacrificados 1 hora después de la última administración de VN/124-1, y se recolectan el tumor, hígado y testículos y se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido. Se homogenizan muestras de tejido en regulador de fosfato (pH = 7.4, 0.5 ml/mg de tejido). El tejido homogenizado (200 µl) es tratado con estándar interno, VN/85-1 (10 µL de la solución de reserva de 100 µg/mL), y luego se extraen con Et₂O (2 x 2 mL) por vórtex durante 3 minutos seguido por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos. Los extractos en Et₂O son separados y evaporados hasta sequedad bajo una corriente suave de aire. El

residuo es reconstituido en 100 μ L de la fase móvil para HPLC, filtrados a través de filtros de teflón de 0.2 μ m y luego analizados por HPLC como se describió más arriba.

Los ejemplos precedentes pueden ser repetidos con éxito similar sustituyendo los reactivos y/o condiciones de operación genérica o específicamente descritos de esta invención por los usados en los ejemplos precedentes.

5 Tabla 1: Actividades de CYP17 y 5 α -reductasa y enlazamiento del receptor de andrógenos de compuestos novedosos de 17-heteroarilo

Compuesto ^a	CYP17 IC ₅₀ (nM) ^b	5 α -reductasa % de inhibición a 10 μ M [IC ₅₀ (nM) ^b		Enlazamiento AR IC ₅₀ (nM) ^c	
		Tipo 1 ^d	Tipo 2 ^e	LNCaP	PC3-AR
5	300.0	4	53	845	384
6	915.0	[770]	[480]	1200	242
9	1250.0	ni ^f	17	-	-
10	5817.4	21	56	-	-
14	3810.0	-	-	-	366
15	500.0	-	-	-	374
Para comparación					
VN/85-1	50.0	-	-	-	-
Abiraterona	800.0	-	-	-	-
Ketoconazol	1100.0	-	-	-	-
Finasterida	-	[60.0]	[2.0]	-	-
Casodex	-	-	-	940	-
Flutamida	-	-	-	11600	10985

^a Hemos reportado previamente la síntesis de VN/85-1 (Njar et al., más arriba). La abiraterona fue sintetizada como lo describe Potter et al (A convenient, large-scale synthesis of abiraterone acetate [3 β -acetoxy-17(3-pyridil) androsta-5,16-diene], a potential new drug for the treatment of prostate cancer. Org. Prep. Proc. Int., 1997, 29, 123-128).

^b IC₅₀ es la concentración de inhibidor requerida para inhibir la actividad enzimática en un 50%, cada una por duplicado para CYP17, triplicado para 5 α -reductasa y enlazamiento de AR.

^c IC₅₀ es la concentración de compuesto requerida para un desplazamiento del 50% de [³H]R1881 del receptor de andrógeno.

^d Línea celular de tumor prostático (DU-145) que expresa enzima tipo I; sustrato: [1 β -H]androstenediona 5 nM.

^e Enzima de tejido BPH (enzima tipo 2), 125 μ g de proteína, sustrato: [1 β ,2 β -³H]testosterona 210 nM..

^f ni = no inhibición hasta 10 μ M. - = no determinado.

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos para 5 (50 y 100 mg/kg) y 6 (50 mg/kg) después de administración s.c.

Parámetro ^a	5		6
	50 mg/kg	100 mg/kg	50 mg/kg
-t _{1/2} (min)	44.7 ± 1.15	36.6 ± 1.6	37.93 ± 1.15
K _{el} (min ⁻¹)	56.5 ± 0.94	68.49 ± 1.26	0.0183 ± 0.004
AUC (mm.µg/mL)	1440.00 ± 60.23	1813.94 ± 10.94	647.10 ± 20.23
T _{max} (min)	30.00 ± 0.0	30.00 ± 0.0	60.00 ± 0.00
C _{max} (µg/mL)	16.82 ± 0.37	32.23 ± 0.34	5.15 ± 0.09
MRT (min)	65.40 ± 0.60	60.46 ± 1.54	79.95 ± 0.01
V _d (mL/kg)	2098.99 ± 4.11	3276.39 ± 26.71	4207.24 ± 6.25

^a Los valores son expresados como media ± S.E., n = 5.

Breve descripción de esquemas y figuras

Cuadro 1: Estructuras de abiraterona y VN/85-1 (16)

5 Esquema 1: Síntesis de compuestos de 17-benzotiazol (5, 6, 9 y 10).

Esquema 2: Síntesis de compuestos de 17-diazina (14 y 15)

Esquema 3: Síntesis de metabolitos de la transandrosterona, incluyendo VNLG/81.

10 Figura 1: Los efectos de 5, 6 y casodex sobre la actividad transcripcional de la luciferasa mediada a través de LNCaP-AR en células de cáncer de próstata LNCaP-ARR2-lu. Las células en medio libre de esteroides fueron tratadas con vehículo, o concentraciones crecientes bien sea de 5 o de casodex con y sin DHT 1 nM durante 18 horas. Las células fueron probadas entonces en cuanto a la actividad de luciferasa como se describe en "Materiales y Métodos". Las barras representan las unidades de luz media [recuentos por segundo (cps)/proteína unitaria, esto es, actividad de luciferasa relativa] en pozos por triplicado a partir de tres experimentos separados.

15 Figura 2: Los efectos de 5, 6 y casodex sobre el crecimiento de células de cáncer de próstata (a) LNCaP y (b) LAPC4. Las células fueron cultivadas en medio libre de esteroides antes de la siembra. Los pozos por triplicado fueron cotratados con concentraciones crecientes de 5, 6 o casodex y DHT como se describe en "Materiales y Métodos". El porcentaje (en comparación con el control) de la inhibición del crecimiento después de 7 días de tratamiento se determinó utilizando el ensayo WST-1. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos llevados a cabo en triplicado.

20 Figura 3: Cromatograma de HPLC típico de 5, 16 (estándar interno) y metabolito extraídos de plasma de ratón. Los tiempos de retención para 16, metabolito y 5 fueron 11.5, 17.3 y 21.6 minutos, respectivamente.

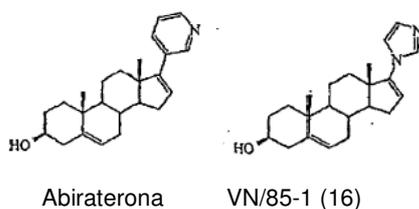
Figura 4: Perfiles farmacocinéticos de 5 y 6 después de la administración de una dosis en bolus subcutánea individual a ratones SCID machos. Cada punto de dato representa las concentraciones en plasma medias obtenidas a partir de tres ratones. Las desviaciones estándar (no mostradas) fueron ± 5 – 8% de los valores medios.

25 Figura 5: Perfiles farmacocinéticos de 5 y metabolito después de una dosis de bolus subcutánea individual (100 mg/kg.bw) de 5 a ratones machos.

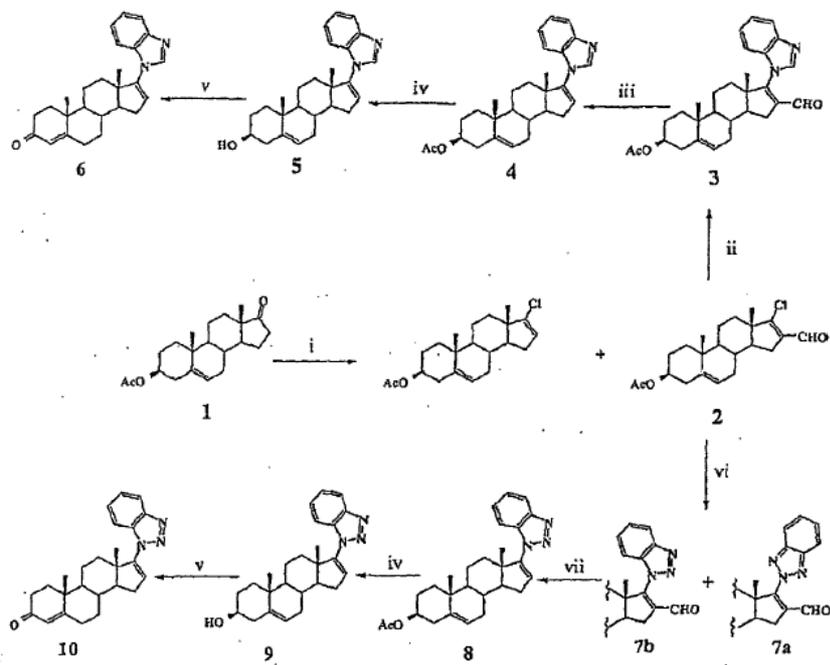
Figura 6: Actividad tumoral *in vivo* de 5, 6 y orquidectomía sobre el crecimiento de tumores de próstata LAPC4 en ratones SCID macho. Los grupos de 5 ratones con tumores LAPC-4 fueron tratados con 5 (0.15 mmol/kg/día o 0.30 mmol/kg/día). Los volúmenes de los tumores fueron medidos semanalmente, y el porcentaje de cambio en el volumen del tumor fue

determinado después de 28 días de tratamiento. Las desviaciones estándar de los volúmenes tumorales (no mostradas) fueron $\pm 10 - 12\%$ de los valores medios.

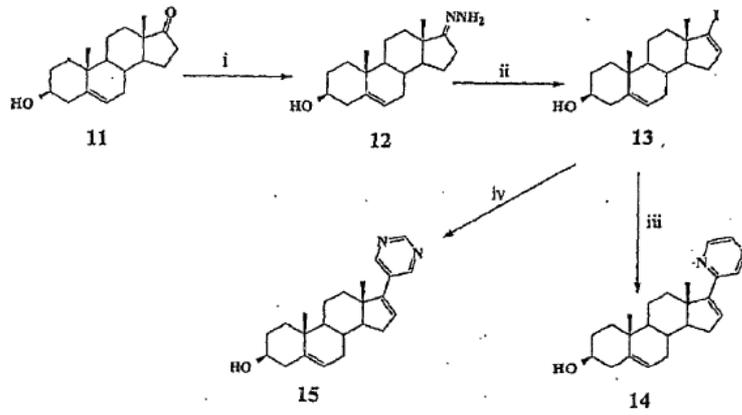
Figura 7: Los efectos de 5, 16 y orquidectomía sobre la formación y crecimiento de tumores de próstata LAPC4 en ratones SCID macho. Se inyectaron 3×10^7 células LAPC-4 s.c. en el flanco dorsal de ratones SCID macho. Un grupo de ratones fue castrado. Los otros grupos de ratones recibieron bien sea vehículo o 5 (0.15 mmol/kg dos veces al día) o 16 (0.15 mmol/kg dos veces al día). El tratamiento diario con 5 o 6 fue iniciado 1 día después de la inoculación de células. Los volúmenes tumorales fueron medidos semanalmente, y el porcentaje de cambio en el volumen tumoral fue determinado después de 16 semanas de tratamiento. El * indica diferencia significativa de 5 versus el control, castración y 16 a la semana 14 (P = 0.00065, 0.05 y 0.0097, respectivamente). ** indica diferencia significativa en 5 versus castración y 16 en la semana 16 (P = 0.047 y 0.0047, respectivamente). ↓↓↓: Período de dosis administrada reducida de 5.



Cuadro 1. Estructuras de abiraterona y VN/85-1

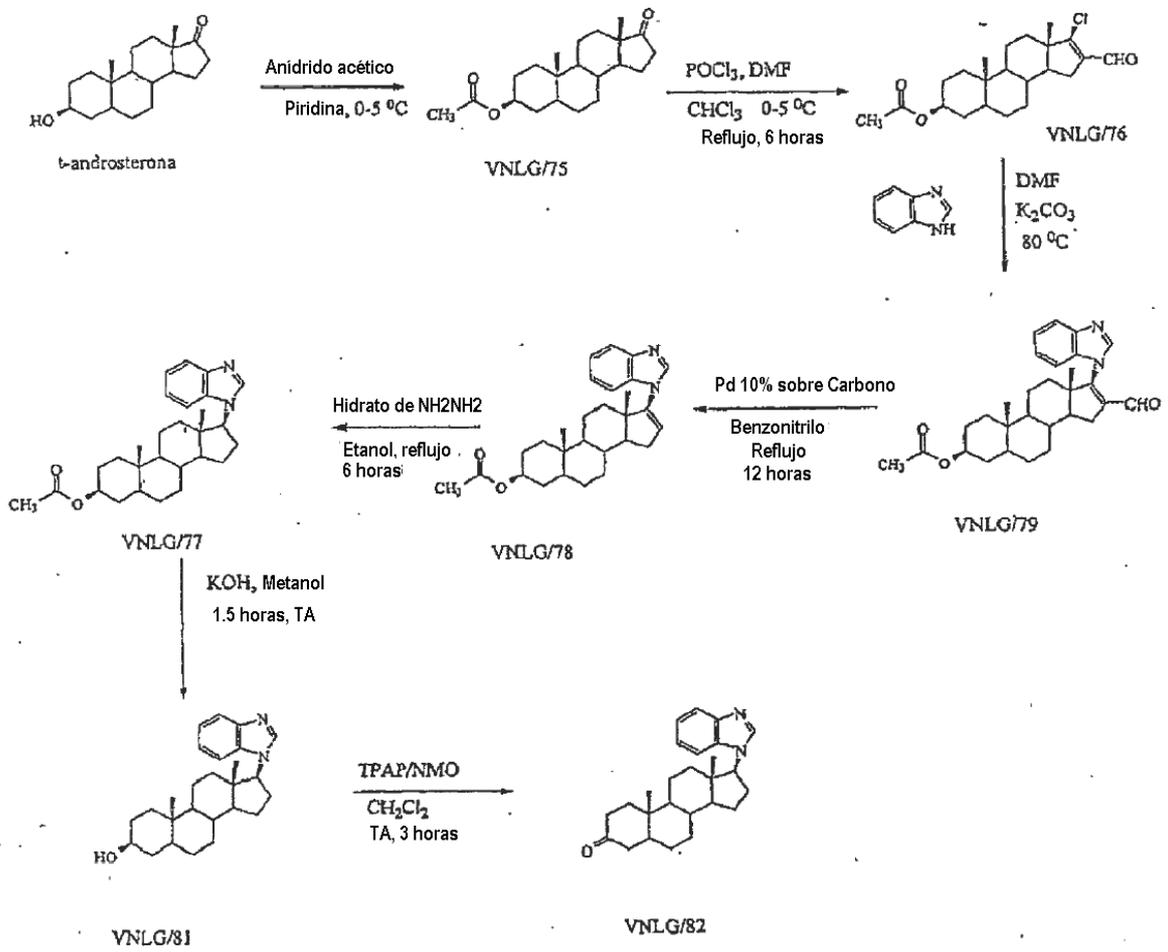


Esquema 1: (i) POCl₃-DMF, CHCl₃, Ar, reflujo; (ii) bencimidazol, K₂CO₃, DMF, Ar, 80°C; (iii) 10% Pd sobre carbón activado; PhCN, reflujo; (iv) 10% KOH metanólico al 10%, Ar, rt; (v) Al(i-PrO)₃, 1-metil-4-piperidona, tolueno, reflujo; (vi) benzo-1H-1,2,3- triazol, K₂CO₃, DMF, Ar, 80°C; (vii) (PPh₃)₂RhCOCl-Ph₂)₃PPh₂, xileno, Ar, reflujo.



Esquema 2: i) $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$, $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{SO}_4$, EtOH; ii) I_2/THF , TG; iii) (2,tributylestanil pirazina)/Pd(PPh_3)₄; iv) (5-tributylestanil)pirimidina/Pd(PPh_3)₄

5 Esquema 3: Síntesis de metabolito de trans-androsterona, incluyendo VNLG/81



v

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende 3β -hidroxi-17-(1H-bencimidazol-1-il)androsta-5, 16 dieno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento de un tumor dependiente de andrógenos por inhibición de los receptores de andrógenos tipo silvestre y mutantes.
- 5 2. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 1 para uso como se reivindica en la reivindicación 1 por administración oral.
3. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 1 para uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la composición también contiene otro agente fisiológicamente activo.

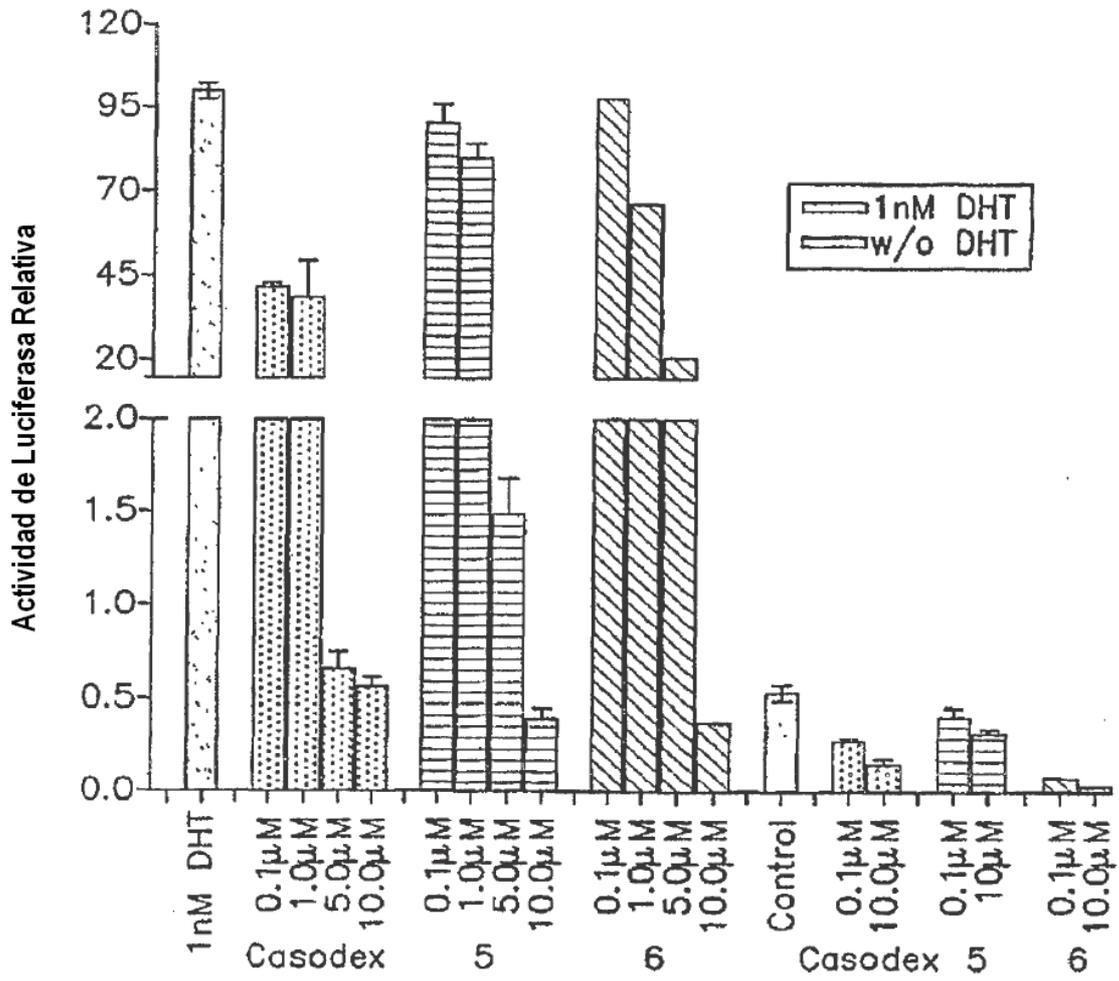


FIG. 1

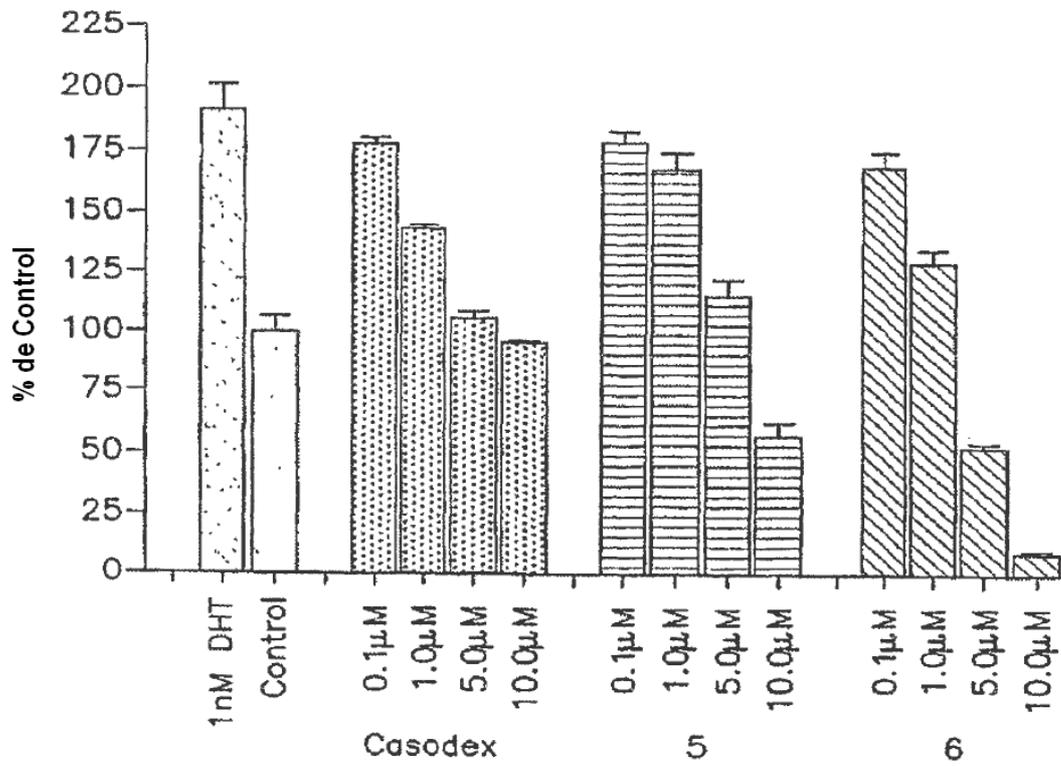


FIG. 2a

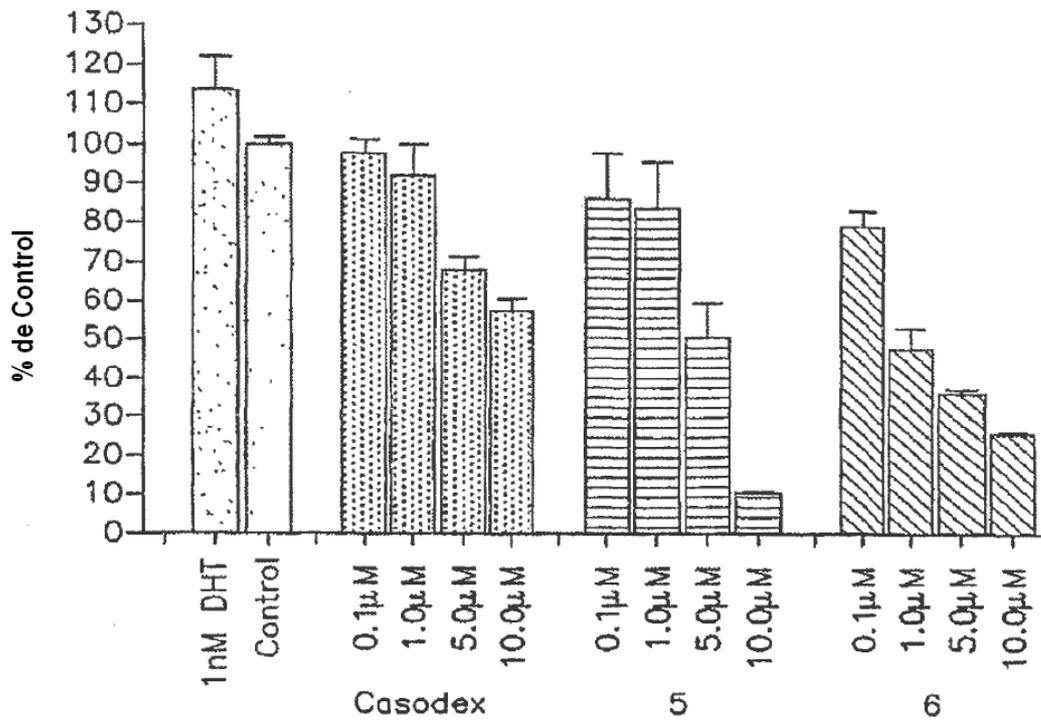


FIG. 2b

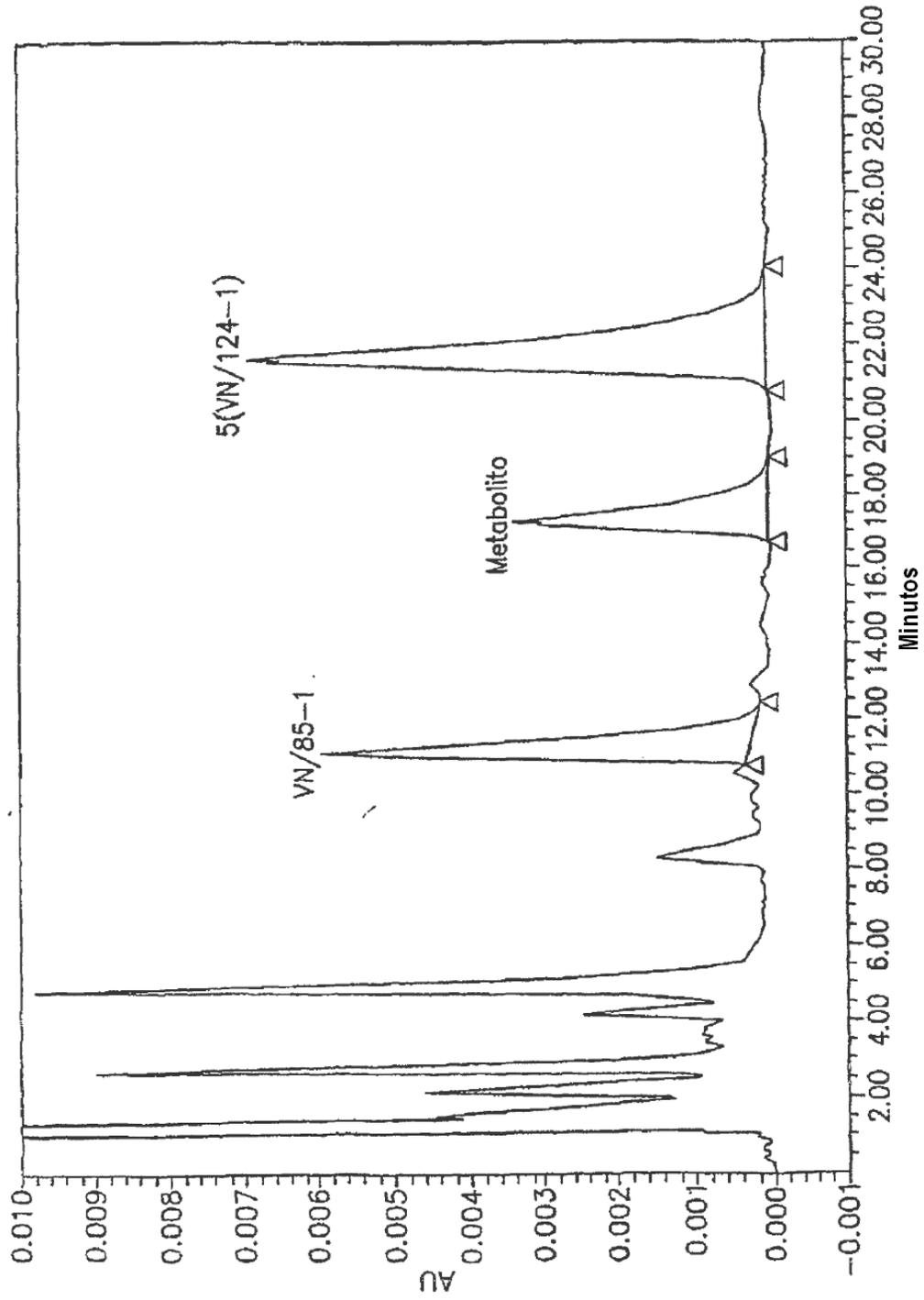


FIG. 3

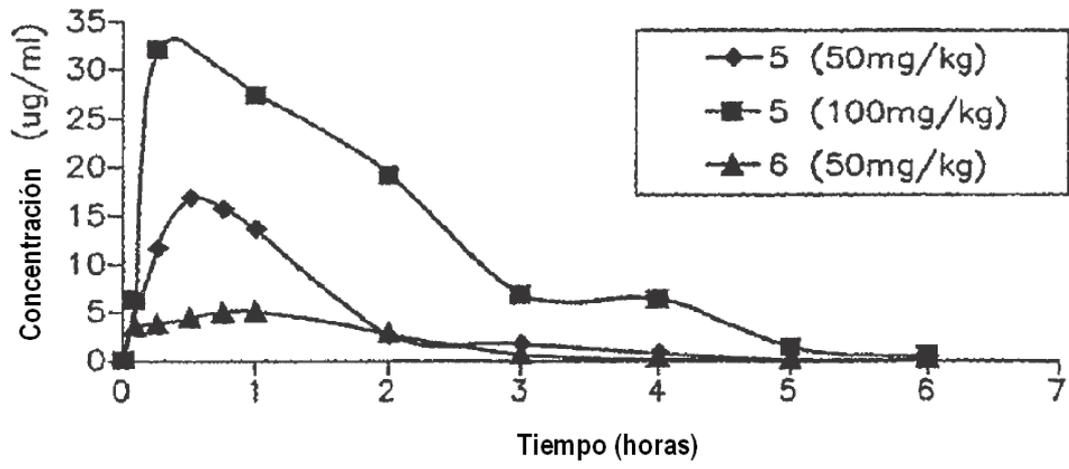


FIG. 4

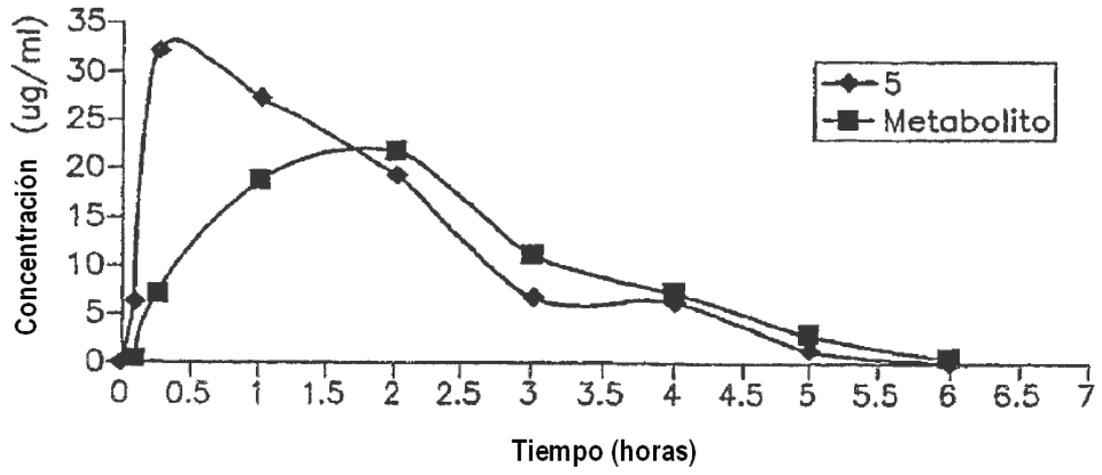


FIG. 5

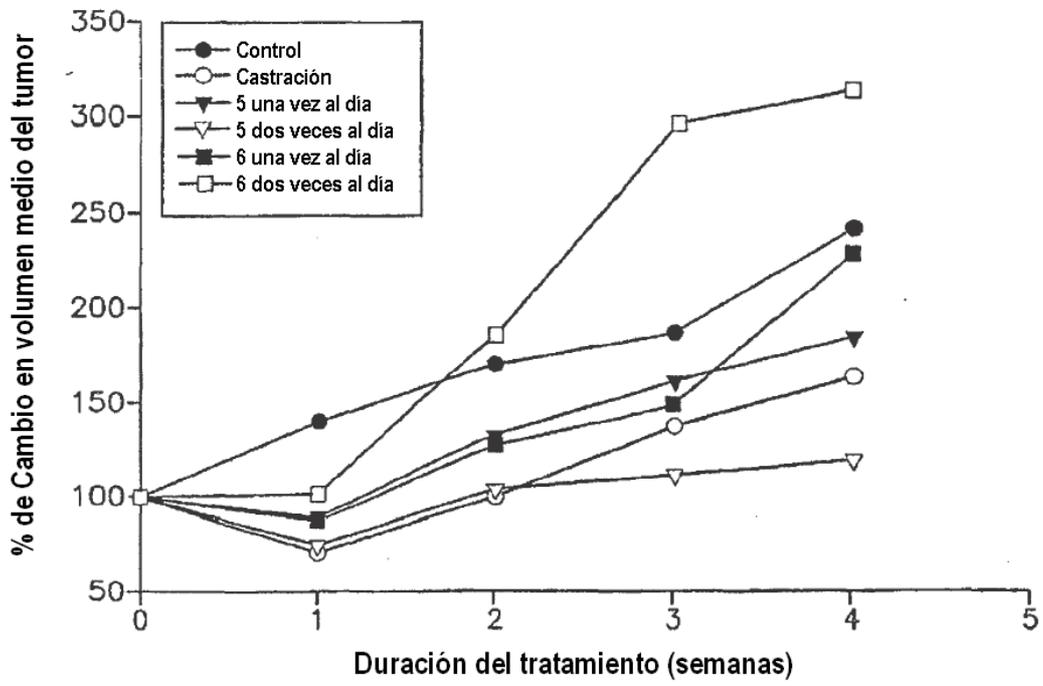


FIG. 6

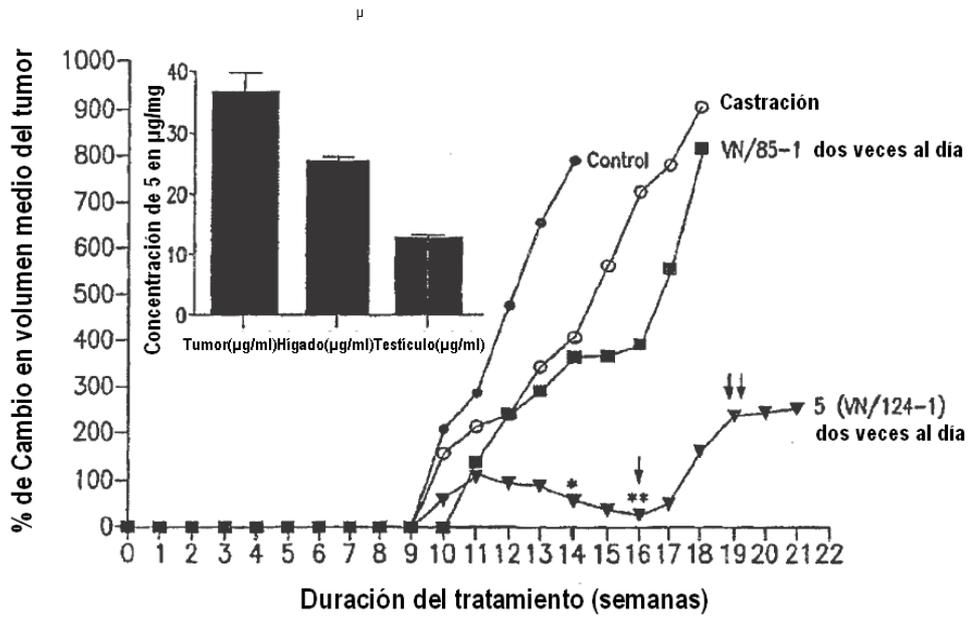


FIG. 7