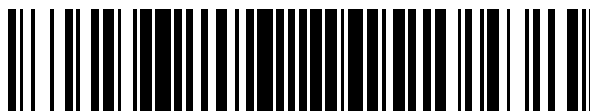


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 530**

51 Int. Cl.:

**C07J 1/00** (2006.01)  
**A61K 31/568** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07J 31/00** (2006.01)  
**C07J 71/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/CN2014/074318**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154179**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14774834 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2980096**

54 Título: **2,3,5-trihidroxi-androst-6-ona y métodos de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

**28.03.2013 CN 201310104162**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2018**

73 Titular/es:

**GUANGZHOU CELLPROTEK PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)**  
**G401-415, 3 Lanyue Road, International Business Incubator, Guangzhou Science City**  
**Guangzhou, Guangdong 510663, CN**

72 Inventor/es:

**ZHANG, JINGXIA;**  
**LIN, SUIZHEN y**  
**XIE, MINYU**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 691 530 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

2,3,5-trihidroxi-androst-6-ona y métodos de preparación y uso de la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una esterona polihídrica, en particular, a 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -trihidroxi-androst-6-ona, y a sus métodos de preparación y usos médicos.

10 **Antecedentes de la invención**

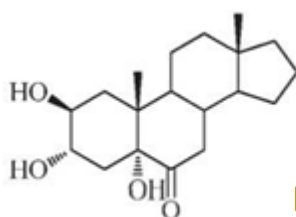
Las esteronas polihídricas son un grupo de compuestos importantes que se producen ampliamente de manera natural. Muchas esteronas polihídricas aisladas de organismos marinos y plantas terrestres tienen funciones fisiológicas importantes, tales como efectos antineoplásicos y potenciadores de la inmunidad. Por ejemplo, las ecdisteronas y los brasinoesteroides son compuestos potenciadores del crecimiento para las plantas.

Sin embargo, las esteronas polihídricas de origen natural están contenidas en las plantas a un nivel sumamente bajo, por lo que sus procedimientos de purificación son complicados y requieren mucho tiempo. Además, debido a complejidades estructurales, por ejemplo, a cadenas laterales relativamente más largas y complicadas, la mayoría de los compuestos de este grupo no son sintetizables, lo que restringe sus aplicaciones. Será de gran importancia en referencia a los rangos de aplicaciones que los compuestos de origen natural estén optimizados estructuralmente de manera que mantengan esencialmente sus propiedades farmacéuticas inherentes, teniendo a la vez estructuras simplificadas para facilitar la síntesis.

El documento WO 2012/003802 desvela un 5 $\alpha$ -androstán-3 $\beta$ ,5,6 $\beta$ -triol que tiene efectos protectores significativos sobre las lesiones neuronales. Suarez *et al.* (*Biochim. Biophys. Act. Mol. Cell. Biol. Lipid* Vol. 1734(2) pág. 203-213 (15-05-2005)) desvelan un compuesto de 5 $\alpha$ -androstán-3 $\alpha$ -ol como regulador de la proliferación celular y de la progresión del ciclo celular. El documento WO 2006/002907 desvela un compuesto 10ai(androstán-3 $\alpha$ -ol) para la prevención o el tratamiento y/o la mejora de trastornos relacionados con procesos patológicos en balsas lipídicas. El documento FR 2.967.914 desvela un compuesto de 5 $\alpha$ -androstán-3 $\beta$ -ol para su uso como un inhibidor de las interacciones proteína-proteína. Ramirez *et al.* ("Steroids" Vol 65(6) pág. 329-337 (01-06-2000)) desvelan un compuesto (22*R*, 23*R*, 24*S*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,22,23-pentahidroxi-5 $\alpha$ -estigmastán-6-ona como un inhibidor para suprimir la replicación del virus VHS-1. Ninguno de los compuestos anteriores tiene el patrón de oxidación de 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -trihidroxi y 6-cetona en los anillos A y B de la estructura esteroidea.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una nueva esterona polihídrica, es decir, 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -trihidroxi-androst-6-ona (denominada de aquí en adelante YC-10, compuesto (I), compuesto I, como se usa de manera indistinta en el presente documento), que tiene la estructura de fórmula (I):



**Fórmula (I).**

El compuesto de fórmula (I) fue sintetizado por los presentes inventores. El compuesto tiene una estructura relativamente simple en comparación con muchas esterones polihídricas naturales. Por ejemplo, no contiene cadenas laterales largas o complejas, lo que permite una fácil síntesis. Además, un peso molecular reducido y una estructura estereoquímica relativamente simple son beneficiosos para la administración de fármacos. Asimismo, la eliminación de las cadenas laterales reduce la posibilidad de que el compuesto interaccione con otras sustancias. Además, la ausencia de cadena lateral en la posición 17 del compuesto (I) puede mejorar la biodisponibilidad *in vivo* del compuesto y eliminar sus efectos de tipo hormonal. Además, una configuración espacial única puede mejorar la estereoselectividad del compuesto, logrando una mejor actividad biológica.

El compuesto de fórmula (I) ha demostrado poseer efectos farmacológicos específicos. En un aspecto, se demuestra que el compuesto tiene actividad antitumoral. En otro aspecto, se demuestra que el compuesto tiene un efecto neuroprotector, en especial, para las células ganglionares de la retina.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene una estructura de fórmula (I) y vehículos

farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento contra la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del compuesto, de la enfermedad y su gravedad, y de la edad, del peso, etc., del sujeto que se va a tratar. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene una estructura de fórmula (I) y un segundo agente protector de neuronas. El segundo agente protector de neuronas es diferente de, pero puede usarse en combinación con, los compuestos proporcionados por la presente invención con el fin de proteger las neuronas. En realizaciones preferidas, el segundo agente protector de neuronas es un agente que protege las células ganglionares de la retina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene una estructura de fórmula (I) y un segundo fármaco antitumoral. El segundo fármaco antitumoral es diferente de, pero puede usarse en combinación con, los compuestos proporcionados por la presente invención para aplicaciones antitumorales.

Como se usa en el presente documento, "tumor" significa crecimiento maligno o benigno de células en la piel o en órganos del cuerpo, por ejemplo, pero sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago o intestinos. Los tumores malignos tienden a invadir los tejidos adyacentes y difusos (metástasis) a órganos lejanos tales como los huesos, el hígado, el pulmón o el cerebro. El término "tumor", como se usa en el presente documento, incluye el tipo de célula tumoral metastásica, por ejemplo, pero sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, leiomioma y tumor de mastocitos, y tipo de carcinoma tisular, por ejemplo, pero sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de estómago, glioblastoma, carcinoma hepático primario, cáncer de ovario, cáncer de próstata y leiomioma uterino.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un uso de un compuesto que tiene una estructura de fórmula (I) en la preparación de medicamentos protectores de las neuronas o medicamentos antitumorales. Se ha demostrado que los compuestos proporcionados por la presente invención inhiben el crecimiento de las células tumorales de una manera dependiente de la dosis, junto con un efecto protector de las neuronas significativo.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula I para su uso en un método para tratar o aliviar una enfermedad o afección, tal como enfermedades o afecciones relacionadas con la lesión del nervio retiniano o con el daño neuronal del sistema nervioso central causadas por múltiples factores, incluyendo enfermedades oftálmicas, tales como isquemia retiniana, traumatismo y lesión del nervio óptico como resultado de un glaucoma agudo o crónico, retinopatía hipertensiva, daño retiniano diabético, degeneración y maculopatía del pigmento retiniano, y enfermedades del sistema nervioso central, tales como apoplejía, lesión cerebral, lesión espinal, enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Huntington (HD) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I), un solvato del mismo o las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención.

"Solvato" se refiere a formas del compuesto que se asocian con un disolvente, normalmente, mediante una reacción de solvólisis. Esta asociación física incluye enlaces de hidrógeno. Los disolventes convencionales incluyen agua, etanol, ácido acético y similares. Los compuestos de la invención se pueden preparar, por ejemplo, en forma cristalina, y se pueden solvatar o hidratar. Los solvatos adecuados incluyen solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, e incluyen además solvatos estequiométricos y solvatos no estequiométricos.

En ciertos casos, el solvato podrá aislarse, por ejemplo, cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente a la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" abarca solvatos tanto en fase de solución como aislables. Los solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para preparar el compuesto de fórmula (I). El método usa androst-5-en-3-ol como material de partida para obtener el compuesto VI, es decir, 3 $\beta$ -*p*-toluensulfoniloxi-5 $\alpha$ -hidroxi-androst-6-ona; el compuesto VI se somete, a continuación, a una reacción de eliminación, obteniéndose el compuesto IX, es decir, 5 $\alpha$ -hidroxi-androst-2-en-6-ona; luego, se somete el compuesto IX a oxidación en el doble enlace de la posición 2 y a hidrólisis, obteniéndose el compuesto I.

El compuesto VI se puede preparar mediante una pluralidad de métodos que se ilustran a continuación.

(1) Material de partida: androst-5-en-3-ol, seguido de la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ácido fórmico, la hidrólisis alcalina, la oxidación con NBS y la protección con cloruro de *p*-toluensulfonilo. Específicamente, el método comprende las siguientes etapas.

(1a) A un matraz de reacción, se añade androst-5-en-3-ol y ácido fórmico, y luego se añade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gota a gota a baja temperatura. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante de 1 a 2 horas, y luego se calienta. Se añade agua a la mezcla de reacción, y se agita para dispersarla. Se filtra la mezcla y se seca, dando el compuesto II en forma de un sólido blanco. El material de partida: ácido fórmico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es 1:10~30:0,5~3 (p: v: v);

(1b) A un matraz de reacción, se añade una solución de metanol alcalino y el compuesto II. Se calienta la mezcla de reacción a reflujo durante 1-2 h, y se vierte en agua para dispersarla. Se filtra la mezcla y se seca, proporcionando el compuesto III en forma de un sólido blanco. Se escoge la solución de metanol alcalino de entre una solución de hidróxido de potasio, hidróxido de sodio o metóxido de sodio en metanol. La concentración de álcali de la mezcla de reacción es del 2-10 %;

(1c) A un matraz de reacción, se añade el compuesto III, dioxano y agua. Se añade NBS en un lote. La mezcla se hace reaccionar durante 2-4 h, tras lo que se añade sulfito de sodio. Se filtra la mezcla, se lava con agua hasta que se vuelve neutra, y se seca, dando el compuesto V en forma de un sólido blanco; y

(1d) A un matraz de reacción, se añade el compuesto V, piridina y cloruro de *p*-toluensulfonilo. Se agita la mezcla de reacción durante 24-36 h a temperatura ambiente y luego se añade a una solución de ácido clorhídrico helada. Se filtra la mezcla, se lava con agua hasta que se vuelve neutra, y se seca, dando el compuesto VI en forma de un sólido blanco.

(2) Material de partida: androst-5-en-3-ol, seguido de la oxidación con ácido *m*-cloroperoxibenzoico, la acidólisis, la oxidación con NBS y la protección con cloruro de *p*-toluensulfonilo. Específicamente, el método comprende las siguientes etapas.

(2a) A un matraz de reacción, se añade androst-5-en-3-ol y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se añade ácido *m*-cloroperoxibenzoico en un lote mientras se agita. Se agita la mezcla más durante 2-5 h en baño de hielo. Una vez completada la reacción, se lavó la mezcla con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y agua, se secó y se concentró, dando el compuesto IV;

(2b) A un matraz de reacción, se añade el compuesto IV y solución acuosa de acetona ácida, y se agita a temperatura ambiente durante horas. Una vez completada la reacción, se ajusta la solución de reacción a pH neutro con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se retira la acetona y se extrae el residuo con acetato de etilo. Se recoge la capa orgánica, se seca y se concentra, proporcionando el compuesto III. El ácido de la solución acuosa de acetona ácida es ácido sulfúrico o ácido peryódico. Compuesto IV: acetona: ácido 1 N es 1:20~30:5~10(p: v: v);

(2c) A un matraz de reacción, se añade el compuesto III, dioxano y agua. Se añade NBS en un lote. La mezcla se hace reaccionar durante 2-4 h, tras lo que se añade sulfito de sodio. Se filtra la mezcla, se lava con agua hasta que se vuelve neutra, y se seca, dando el compuesto V en forma de un sólido blanco; y (2d) A un matraz de reacción, se añade el compuesto V, piridina y cloruro de *p*-toluensulfonilo. Se agita la mezcla de reacción durante 24-36 h a temperatura ambiente y luego se añade a una solución de ácido clorhídrico helada. Se filtra la mezcla, se lava con agua hasta que se vuelve neutra, y se seca, dando el compuesto VI en forma de un sólido blanco.

(3) Material de partida: androst-5-en-3-ol, seguido de la protección con cloruro de *p*-toluensulfonilo, la oxidación con ácido *m*-cloroperoxibenzoico y la oxidación con el reactivo de Jones.

Específicamente, el método comprende las siguientes etapas.

(3a) A un matraz de reacción, se añade androst-5-en-3-ol, piridina anhidra y cloruro de *p*-toluensulfonilo. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, se vierte la mezcla en una solución helada de ácido clorhídrico, se agita, se filtra, se lava con agua hasta volverla neutra y se seca, proporcionando el compuesto VII en forma de un sólido blanco;

(3b) A un matraz de reacción, se añade el compuesto VII y diclorometano, y se añade ácido *m*-cloroperoxibenzoico en un lote mientras se agita. La mezcla de reacción se agita más en un baño de hielo. Una vez completada la reacción, la mezcla se lava con solución saturada de sulfito de sodio, solución de carbonato de sodio y agua destilada. Se recoge la capa orgánica, se seca, se concentra y se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, proporcionando el compuesto VIII en forma de un sólido blanco;

(3c) A un matraz de reacción, se añade el compuesto VIII y acetona, seguidos de la adición de reactivo de Jones mientras se agita. Se deja reaccionar la mezcla durante horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla se inactiva con isopropanol y se ajusta hasta pH neutro. Se concentra la mezcla a presión reducida para eliminar la acetona, se extrae con acetato de etilo, se lava, se seca y se concentra, dando un sólido verde pálido. El sólido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, proporcionando el compuesto VI en forma de un sólido blanco.

En los métodos de la presente invención, el compuesto IX se prepara, por ejemplo, de la siguiente manera. A un matraz de reacción, se añade el compuesto VI, DMF, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y LiBr. Se calienta la mezcla de reacción a reflujo y se vierte en una solución acuosa helada de ácido clorhídrico. Se agita la mezcla, se filtra, se lava hasta volverla neutra y se seca, dando el compuesto IX en forma de un sólido blanco. Preferentemente, compuesto VI: DMF es 1:3~15 (p: v); compuesto VI: Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: LiBr es 1:4~ 12:4~12 (M: M: M).

En los métodos de la presente invención, el compuesto I también puede prepararse a partir del compuesto IX mediante métodos ilustrados de la siguiente manera.

(1) El compuesto I se prepara a partir del compuesto IX mediante la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ácido fórmico y la hidrólisis alcalina. Específicamente, el método comprende las siguientes etapas.

(1a) A un matraz de reacción, se añade el compuesto IX y ácido fórmico, y luego se añade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gota a gota a baja temperatura. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante de 1 a 2 horas, y luego se calienta. Se añade agua a la mezcla de reacción, y se agita para dispersarla. Se filtra la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. La torta se seca, dando el compuesto X en forma de un sólido blanco. El compuesto X: ácido fórmico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es 1:10~30:0,5~3 (p: v: v);

(1b) A un matraz de reacción, se añade una solución alcalina de metanol y el compuesto X. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1-2 h, y se vierte en agua para dispersarla. Se filtra la mezcla y se seca, proporcionando el compuesto de fórmula (I) en forma de un sólido blanco. Se escoge la solución de metanol alcalino de entre una solución de hidróxido de potasio, hidróxido de sodio o metóxido de sodio en metanol. La concentración de álcali de la mezcla de reacción es del 2-10 %.

(2) El compuesto I se prepara a partir del compuesto IX mediante la oxidación con ácido *m*-cloroperoxibenzoico y la acidólisis.

Específicamente, el método comprende las siguientes etapas.

(2a) A un matraz de reacción, se añade el compuesto IX y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se añade ácido *m*-cloroperoxibenzoico en un lote mientras se agita. Se agita la mezcla más durante 2-5 h en baño de hielo. Una vez completada la reacción, se lavó la mezcla con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y agua, se secó y se concentró, dando el compuesto XI;

(2b) A un matraz de reacción, se añade el compuesto XI y solución de acetona ácida, y se agita a temperatura ambiente durante horas. Una vez completada la reacción, se ajusta la solución de reacción a pH neutro con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se retira la acetona y se extrae el residuo con acetato de etilo. Se recoge la capa orgánica, se seca y se concentra, proporcionando el compuesto I. El ácido de la solución acuosa de acetona ácida es ácido sulfúrico o ácido peryódico. compuesto XI: acetona: ácido 1 N es 1:20~30:5~10 (p: v: v).

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la inhibición de las células LN18 y DBTRG-50MG del compuesto I de la presente invención (n = 3\*, p < 0,05).

La Figura 2 muestra que el compuesto I protege las neuronas granulares del cerebelo del daño inducido por el glutamato.

La Figura 3 muestra que el compuesto I mejora la supervivencia de las neuronas granulares del cerebelo de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 4 muestra que el compuesto I protege las neuronas granulares del cerebelo de la muerte inducida por el bajo nivel de potasio.

La Figura 5 muestra que las CGR se reducen significativamente en un modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico, mientras que se muestra que el compuesto I previene la disminución de las CGR. La Figura 6 es un gráfico que muestra las estadísticas de las CGR en diferentes grupos de muestras en un modelo de lesión por pinzamiento del nervio óptico.

La Figura 7 muestra que las CGR disminuyen significativamente en un modelo de hipertensión ocular e isquemia, mientras que se muestra que el compuesto I previene la disminución de las CGR.

La Figura 8 es un gráfico que muestra las estadísticas de las CGR en diferentes grupos de muestras en un modelo de hipertensión ocular e isquemia.

### Descripción detallada

Lo siguiente se proporciona solo con fines ilustrativos. Se entiende que el alcance de la invención no estará limitado a los ejemplos proporcionados a continuación. En los siguientes ejemplos, el compuesto I se refiere a 2β,3α,5α-trihidroxi-androst-6-ona; el compuesto II se refiere a 3β,6β-diformiloxi-5β-androst-5-ol; el compuesto III se refiere a androst-3β,5α,6β-triol; el compuesto IV se refiere a 3β-hidroxiandrost-5β,6β-epoxi; el compuesto V se refiere a 3β,5α-dihidroxi-androst-6-ona; el compuesto VI se refiere a 3β-p-toluensulfoniloxi-5α-hidroxi-androst-6-ona; el compuesto VII se refiere a 3β-p-toluensulfoniloxi-androst-5-en; el compuesto VIII se refiere a 3β-p-toluensulfoniloxi-androst-5β,6β-epoxi; el compuesto IX se refiere a 5α-hidroxi-androst-2-en-6-ona; el compuesto X se refiere a 2β,3α-diformiloxi-5α-hidroxi-androst-6-ona; y el compuesto XI se refiere a 2β,3β-epoxi-5α-hidroxi-androst-6-ona.

### Preparación del compuesto I - Ejemplo 1

Etapa 1 - A un matraz de reacción de 2 l, se añadió compuesto androst-5-en-3-ol (54,5 g) y ácido fórmico (1 l, 88 %). Se enfrió la mezcla de reacción a 25 °C, y se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (82,5 ml, 30 %). Una vez

completada la reacción según lo evidenciado por TLC, se calentó la mezcla hasta 75 °C para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Se añadió agua (1 l) y se agitó para dispersar. Se filtró la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. Se sumergió la torta en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto II (62,4 g) en forma de un sólido blanco.

5 Etapa 2 - A un matraz de reacción de 2 l, se añadió hidróxido de potasio (45 g), metanol (1.500 ml), agua (300 ml) y el compuesto II (60 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo. La TLC confirmó que no había compuesto II residual. Se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente, y se vertió en agua (3 l) para dispersarla. Se ajustó la mezcla a pH = 7 mediante ácido clorhídrico concentrado y se dejó que se produjera una laminación de sedimentación. Se filtró la mezcla y se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, obteniéndose el compuesto III (49,6 g) en forma de un sólido blanco.

15 Etapa 3 - A un matraz de reacción de 1 l, se añadió compuesto III (49 g), dioxano (600 ml) y agua (200 ml). Una vez que el compuesto III se hubo disuelto por completo, se añadió *N*-bromo-succinimida (42,5 g) en cuatro lotes. Una vez agotado el compuesto III según lo evidenciado mediante TLC, se detuvo la reacción. Se añadió sulfito sódico (11 g) para reducir el exceso de oxidante. La mezcla se dispersa en agua (4 l) y se filtra. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto V (47,8 g) en forma de un sólido blanco.

20 Etapa 4 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió piridina (135 ml), compuesto V (44,3 g) y cloruro de *p*-toluensulfonilo (45 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente. Una vez agotado el compuesto V según lo evidenciado mediante TLC, se detuvo la reacción. Se vertió la mezcla en una solución acuosa helada de ácido clorhídrico (300 ml, 1:1 (V:V)), se agitó y se filtró. Se lavó la torta del filtro a pH = 7 y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto VI (61,7 g) en forma de un sólido blanco.

25 Etapa 5 - A un matraz de reacción de 1 l, se añadió *N,N*-dimetilformamida (325 ml), compuesto VI (54 g), Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (52,1 g) y LiBr (60,5 g). La mezcla se calentó a reflujo. Una vez agotado el compuesto VI según lo evidenciado mediante TLC, se detiene la reacción. Se vertió la mezcla en una solución acuosa de ácido clorhídrico helada (2 l, 1:1 (v: v)), se agitó y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto IX (32 g) en forma de un sólido blanco.

30 Etapa 6 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió compuesto IX (30 g) y ácido fórmico (600 ml, 88 %). Se calentó la mezcla para disolver el compuesto sólido y luego se enfrió por debajo de 25 °C. Se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (24 ml, 30 %). Una vez agotado el compuesto IX según lo evidenciado mediante TLC, se calentó la mezcla hasta 75 °C durante 10 minutos para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Se añadió agua (3 l) y se agitó para dispersar. Se filtró la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. Se sumergió la torta en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto X (26 g) en forma de un sólido blanco.

40 Etapa 7 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió hidróxido de potasio (27 g), metanol (600 ml), agua (72 ml) y compuesto X (23,4 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo. La TLC confirmó que no había compuesto X residual. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se vertió en agua (3 l) para dispersarla. Se ajustó la mezcla a pH = 7 mediante ácido clorhídrico concentrado y se dejó que se produjera una laminación de sedimentación. Se filtró la mezcla y se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, seguido de la recristalización en acetona, y se secó, obteniéndose el compuesto I (16 g) en forma de un sólido blanco.

45 p.f: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, *J* = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) ν: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) *m/z* 319(M-3).

### Preparación del compuesto I - Ejemplo 2

55 Etapa 1 - A un matraz de reacción de 2 l, se añadió compuesto androst-5-en-3-ol (70 g) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.200 ml). A la mezcla, se añadió ácido *m*-cloroperóxibenzoico (105 g, *m*CPBA) en un lote mientras se agitaba. Se agita más la mezcla de reacción en un baño de hielo durante 5 h. Una vez completada la reacción, se lavó la mezcla con solución saturada de sulfato de sodio, solución de carbonato de sodio y agua destilada. Se recogió la capa orgánica, se secó y se concentró, proporcionando el compuesto IV (62 g) en forma de un sólido amarillo.

60 Etapa 2 - se disolvió el compuesto IV (60 g) en acetona (3 l). A la solución, se añadió solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N (400 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez completada la reacción, se ajustó la mezcla a pH neutro con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentró a presión reducida para eliminar la acetona. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo, y se recogió la capa orgánica y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, dando un sólido amarillo (48 g). Se recristalizó el sólido en acetona, proporcionando el compuesto III (30,5 g).

65

Las Etapas 3 a 7 fueron idénticas a las Etapas 3 a 7 del Ejemplo 1.

p.f.: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, J = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) m/z 319(M-3).

### Preparación del compuesto I - Ejemplo 3

Las Etapas 1 a 5 fueron idénticas a las Etapas 1 a 5 del Ejemplo 1.

Etapa 6 - En un matraz de reacción de 500 ml, se disolvió el compuesto IX (23 g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 ml). A la mezcla, se añadió ácido *m*-cloroperoxibenzoico (34,6 g, *m*CPBA) en un lote mientras se agitaba. Se agita más la mezcla de reacción en un baño de hielo durante 5 h. Una vez completada la reacción, se lavó la mezcla con solución saturada de sulfito de sodio, solución de carbonato de sodio y agua destilada. Se recogió la capa orgánica, se secó y se concentró, proporcionando el compuesto XI (20,7 g) en forma de un sólido amarillo.

Etapa 7 - En un matraz de reacción de 2 l, se disolvió el compuesto XI (17,4 g) en acetona (900 ml). A la mezcla, se añadió una solución 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (180 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Una vez completada la reacción, se ajustó la mezcla a pH neutro con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se concentró a presión reducida para eliminar la acetona. Se extrajo la mezcla con acetato de etilo, y se recogió la capa orgánica y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, dando un sólido amarillo (14,4 g). Se recristalizó el sólido en acetona, proporcionando el compuesto I en forma de un sólido blanco.

p.f.: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, J = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) m/z 319(M-3).

### Preparación del compuesto I - Ejemplo 4

Etapa 1 - A un matraz de reacción de 250 ml, se añadió androst-5-en-3-ol (14,64 g) y piridina anhidra (125 ml). A la mezcla, se añadió en un lote cloruro de *p*-toluenosulfonilo (26,05 g). La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez agotados los materiales de partida según lo evidenciado por TLC, se detuvo la reacción. La mezcla se vertió en una solución helada de HCl (2.000 ml, 17 %) bajo agitación vigorosa y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó al vacío, proporcionando el compuesto VII (22,48 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 2 - A un matraz de reacción de 250 ml, se añadió compuesto VII (15,00 g) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml). A la mezcla, se añadió ácido *m*-cloroperoxibenzoico (15,12 g, *m*CPBA) en un lote mientras se agitaba. Se agita más la mezcla de reacción en un baño de hielo durante 5 h. Una vez completada la reacción, se lavó la mezcla con solución saturada de sulfito de sodio, solución de carbonato de sodio y agua destilada. Se recogió la capa orgánica y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se evaporaron los disolventes orgánicos. Se secó el residuo al vacío, proporcionando el producto en bruto (14,07 g). Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice, proporcionando el compuesto VIII (12,3 g) en forma de un sólido blanco.

Etapa 3 - A un matraz de reacción de 1.000 ml, se añadió compuesto VIII (14,07 g) y acetona (750 ml). A la mezcla, se añadió reactivo de Jones (30 ml) mientras se agitaba. Se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Una vez completada la reacción según lo evidenciado por TLC, la mezcla se inactiva con isopropanol y se ajusta hasta pH neutro con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se concentra la mezcla a presión reducida para eliminar la acetona y se extrae con acetato de etilo. Se recogió la capa orgánica y se lavó con agua destilada varias veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró, dando un sólido verde pálido. El sólido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, proporcionando el compuesto VI (12,89 g) en forma de un sólido blanco.

Las Etapas 4 a 6 fueron idénticas a las Etapas 5 a 7 del Ejemplo 1.

p.f.: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, J = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) m/z 319(M-3).

**Preparación del compuesto I - Ejemplo 5**

Las Etapas 1 a 4 fueron idénticas a las Etapas 1 a 4 del Ejemplo 1.

5 Etapa 5 - A un matraz de reacción de 1 l, se añadió *N,N*-dimetilformamida anhidra (325 ml), compuesto VI (54 g),  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  seco (69,5 g) y LiBr (80,6 g). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo. Una vez consumido el compuesto VI según lo evidenciado por TLC, se detuvo la reacción. Se añadió la mezcla a una solución acuosa de HCl helada (2 l, 1:1 (v: v)), se agitó y se filtró. Se lavó la torta del filtro con agua hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto IX (32,5 g) en forma de un sólido blanco.

10

Las Etapas 6 a 7 fueron idénticas a las Etapas 6 a 7 del Ejemplo 1.

p.f: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,65 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0,87 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3,76~3,83 (d,  $J = 28$  Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 15,52 ( $\text{CH}_3$ ), 17,27( $\text{CH}_3$ ), 19,94( $\text{CH}_2$ ), 20,53( $\text{CH}_2$ ), 24,68( $\text{CH}_2$ ), 26,90( $\text{CH}_2$ ), 33,02( $\text{CH}_2$ ), 36,45(CH), 39,72( $\text{CH}_2$ ), 40,92(C), 41,26( $\text{CH}_2$ ), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI)  $m/z$  319(M-3).

15

**Preparación del compuesto I - Ejemplo 6**

20

Las Etapas 1 a 4 fueron idénticas a las Etapas 1 a 4 del Ejemplo 1.

Etapa 5 - A un matraz de reacción de 1 l, se añadió *N,N*-dimetilformamida anhidra (325 ml), compuesto VI (54 g),  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  seco (34,7 g) y LiBr (40,3 g). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo. Una vez consumido el compuesto VI según lo evidenciado por TLC, se detuvo la reacción. Se añadió la mezcla a una solución acuosa de HCl helada (2 l, 1:1 (v: v)), se agitó y se filtró. Se lavó la torta del filtro con agua hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto IX (30,2 g) en forma de un sólido blanco.

25

Las Etapas 6 a 7 fueron idénticas a las Etapas 6 a 7 del Ejemplo 1.

30

p.f: 197~201 °C; rotación específica:-50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,65 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0,87 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3,76~3,83 (d,  $J = 28$  Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 15,52 ( $\text{CH}_3$ ), 17,27( $\text{CH}_3$ ), 19,94( $\text{CH}_2$ ), 20,53( $\text{CH}_2$ ), 24,68( $\text{CH}_2$ ), 26,90( $\text{CH}_2$ ), 33,02( $\text{CH}_2$ ), 36,45(CH), 39,72( $\text{CH}_2$ ), 40,92(C), 41,26( $\text{CH}_2$ ), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI)  $m/z$  319(M-3).

35

**Preparación del compuesto I - Ejemplo 7**

Las Etapas 1 a 4 fueron idénticas a las Etapas 1 a 4 del Ejemplo 1.

40

Etapa 5 - A un matraz de reacción de 1 l, se añadió *N,N*-dimetilformamida anhidra (432 ml), compuesto VI (54 g),  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  seco (52,1 g) y LiBr (60,5 g). La mezcla se calentó a temperatura de reflujo. Una vez consumido el compuesto VI según lo evidenciado por TLC, se detuvo la reacción. Se añadió la mezcla a una solución acuosa de HCl helada (2 l, 1:1 (v: v)), se agitó y se filtró. Se lavó la torta del filtro con agua hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto IX (30,5 g) en forma de un sólido blanco.

45

Etapa 6 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió compuesto IX (30 g) y ácido fórmico (600 ml, 88 %). Se calentó la mezcla para disolver el compuesto sólido y luego se enfrió por debajo de 25 °C. Se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (20 ml, 30 %). Una vez agotado el compuesto IX según lo evidenciado mediante TLC, se calentó la mezcla hasta 75 °C durante 10 minutos para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Se añadió agua (3 l) y se agitó para dispersar. Se filtró la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. Se sumergió la torta en una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto X (28 g) en forma de un sólido blanco.

50

Etapa 7 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió hidróxido de potasio (18 g), metanol (600 ml), agua (72 ml) y compuesto X (25 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo. La TLC confirmó que no había compuesto X residual. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se vertió en agua (3 l) para dispersarla. Se ajustó la mezcla a pH = 7 mediante ácido clorhídrico concentrado y se dejó que se produjera una laminación de sedimentación. Se filtró la mezcla y se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, seguido de la recristalización en acetona, y se secó, obteniéndose el compuesto I (8,8 g) en forma de un sólido blanco.

55

60

p.f: 197~201 °C; rotación específica:-50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,65 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 0,87 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3,76~3,83 (d,  $J = 28$  Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 15,52 ( $\text{CH}_3$ ), 17,27( $\text{CH}_3$ ), 19,94( $\text{CH}_2$ ), 20,53( $\text{CH}_2$ ), 24,68( $\text{CH}_2$ ), 26,90( $\text{CH}_2$ ), 33,02( $\text{CH}_2$ ), 36,45(CH), 39,72( $\text{CH}_2$ ), 40,92(C), 41,26( $\text{CH}_2$ ), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI)  $m/z$  319(M-3).

65



**Preparación del compuesto I - Ejemplo 8**

Las Etapas 1 a 5 fueron idénticas a las Etapas 1 a 5 del Ejemplo 7.

- 5 Etapa 6 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió compuesto IX (30 g) y ácido fórmico (600 ml, 88 %). Se calentó la mezcla para disolver el compuesto sólido y luego se enfrió por debajo de 25 °C. Se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (36 ml, 30 %). Una vez agotado el compuesto IX según lo evidenciado mediante TLC, se calentó la mezcla hasta 75 °C durante 10 minutos para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Se añadió agua (3 l) y se agitó para dispersar. Se filtró la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. Se sumergió la torta en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta que se eliminaron las burbujas y luego se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto X (24 g) en forma de un sólido blanco.

La Etapa 7 es idéntica a la Etapa 7 del Ejemplo 7.

- 15 p.f: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, J = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) m/z 319(M-3).

20

**Preparación del compuesto I - Ejemplo 9**

Las Etapas 1 a 5 fueron idénticas a las Etapas 1 a 5 del Ejemplo 7.

- 25 Etapa 6 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió compuesto IX (30 g) y ácido fórmico (600 ml, 88 %). Se calentó la mezcla para disolver el compuesto sólido y luego se enfrió por debajo de 25 °C. Se añadió lentamente peróxido de hidrógeno (45 ml, 30 %). Una vez agotado el compuesto IX según lo evidenciado mediante TLC, se calentó la mezcla hasta 75 °C durante 10 minutos para eliminar el exceso de peróxido de hidrógeno. Se añadió agua (3 l) y se agitó para dispersar. Se filtró la mezcla, obteniéndose una torta del filtro blanca. Se sumergió la torta en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta que se eliminaron las burbujas y luego se filtró. Se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, y se secó, proporcionando el compuesto X (23 g) en forma de un sólido blanco.

30

Etapa 7 - A un matraz de reacción de 500 ml, se añadió hidróxido de potasio (27 g), metanol (300 ml), agua (36 ml) y compuesto X (12,5 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo. La TLC confirmó que no había compuesto X residual. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se vertió en agua (3 l) para dispersarla. Se ajustó la mezcla a pH = 7 mediante HCl y se dejó que se produjera una laminación de sedimentación. Se filtró la mezcla y se lavó la torta del filtro hasta volverla neutra, seguido de la recristalización en acetona, y se secó, obteniéndose el compuesto I (8,0 g) en forma de un sólido blanco.

35

- 40 p.f: 197~201 °C; rotación específica: -50 °(2 mg/ml, etanol absoluto); RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0,65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0,87 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 3,76~3,83 (d, J = 28 Hz, 2H, 2-CH y 3-CH); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 15,52 (CH<sub>3</sub>), 17,27(CH<sub>3</sub>), 19,94(CH<sub>2</sub>), 20,53(CH<sub>2</sub>), 24,68(CH<sub>2</sub>), 26,90(CH<sub>2</sub>), 33,02(CH<sub>2</sub>), 36,45(CH), 39,72(CH<sub>2</sub>), 40,92(C), 41,26(CH<sub>2</sub>), 42,54(C), 44,99(CH), 54,04(CH), 68,94(CH), 70,19(CH), 79,71(C), 210,65(C); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) v: 3.296, 2.937, 1.726, 1.064; MS (APCI) m/z 319(M-3).

45

**Actividad antitumoral del compuesto I**

Siembra celular y tratamiento: se preparó la fase logarítmica de células LN18 y DBTRG-50MG en suspensiones celulares con medio completo. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 100 µl por pocillo, 3 x 10<sup>4</sup>/ml. 12 h después de la siembra, se observó la adhesión celular completa. A los pocillos, se añadió YC-10 hasta una concentración final de YC-10 de 250, 500 y 1000 µM, teniendo cada grupo de concentración 5 repeticiones.

50

Reacción de MTT con succinato deshidrogenasa: a las 24 h de cultivo, se añadieron a cada pocillo 10 µl (5 mg/ml) de MTT, seguido de incubación durante 4 h. En este momento, se puede observar cristalino de formazano granulado violeta en células vivas mediante microscopía.

55

Disolución de partículas de formazano: se descargó el sobrenadante cuidadosamente. A los pocillos, se añadió DMSO a 100 µl/pocillo para disolver el cristalino. Se hizo vibrar la mezcla en un mini oscilador durante 5 minutos y se midió la densidad óptica (valor de DO) a 570 nm para cada pocillo mediante un ensayo inmunométrico ligado a enzimas.

60

Cada grupo de experimentos se repitió 3 veces.

- 65 Supervivencia (%) = valor de DO en el grupo de tratamiento/valor de DO en el grupo de control x 100 %.

Todos los datos se presentaron como la media  $\pm$  DT. Se usó el software del paquete de estadísticas SPSS 13.0. Se usaron ANOVA de una vía y la prueba t para analizar los datos. Se usó el software Sigmaplot para dar la Figura 1. Como se puede ver en la Figura 1, 24 h después del tratamiento con 250, 500, 1.000  $\mu$ M de YC-10, las tasas de supervivencia celular del grupo de tratamiento fueron estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control ( $p < 0,05$ ). YC-10 destruyó las células tumorales de una manera dependiente de la dosis.

### Actividad protectora de las neuronas del compuesto I

Se estudiaron la toxicidad *in vivo* e *in vitro* y las funciones farmacológicas de YC-10 para evaluar su actividad protectora de las neuronas y la posibilidad de convertirse en un posible fármaco clínico. En resumen, los resultados mostraron que no se observó ninguna anomalía evidente en los ratones a los que se administraron altas dosis de YC-10 (250 mg/kg). Los estudios demostraron que YC-10 fue significativamente eficaz en la mejora de la tasa de supervivencia de las neuronas granulares del cerebelo en los modelos de lesión inducida por glutamato y bajo nivel de potasio. También se observó que YC-10 mejoraba significativamente la tasa de supervivencia de las células ganglionares de la retina en un modelo de animales que padecían tanto lesión del nervio óptico como isquemia retiniana. Esos resultados mostraron que YC-10 tenía actividad protectora de las neuronas, sin efectos tóxicos o secundarios evidentes.

#### 1 Estudio toxicológico

##### *Ensayo de dosis de tolerancia máxima*

Se prepararon inyecciones de YC-10 a una concentración de 25 mg/ml con hidroxipropil-ciclodextrina al 40 % y se inyectaron a través de la vena de la cola a 30 ratones KM (mitad varones y mitad hembras, con pesos de 18-22 g) a dosis de 0,1 ml/10 g.

Los ratones se observaron de manera continua. Todos los ratones se comportaron y comieron como de costumbre, con un pelaje brillante y una piel fina. No se observaron secreciones anormales en la boca, en los ojos, en la nariz ni en las orejas. Los ratones defecaron con normalidad. Los pesos de los ratones tuvieron un aumento despreciable. No murió ningún ratón. Los ratones se sacrificaron tras 14 días, se diseccionaron y se examinaron a simple vista órganos importantes tales como el corazón, el hígado, el bazo, el riñón y el sistema gastrointestinal. No se observaron cambios anormales. Esos resultados mostraron que YC-10 no fue tóxico para el ratón a 250 mg/kg.

#### 2 Estudios farmacológicos

##### *2.1 Neuronas granulares del cerebelo protegidas con YC-10 del daño inducido por el glutamato*

Se agruparon neuronas granulares del cerebelo cultivadas *in vitro* durante 8 días. Los grupos de tratamiento recibieron MK801 o YC-10 a diversas concentraciones, seguido de la incubación durante 30 minutos. Tras ello, el grupo modelo y todos los grupos de tratamiento se reemplazaron con tampón Locke exento de  $Mg^{2+}$ , y se añadieron glutamato (concentración final de 100  $\mu$ M), glicina (concentración final de 10  $\mu$ M) y fármacos a las respectivas concentraciones. Las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se reemplazaron por medio original, se incubaron durante 24 h más, seguido de la tinción con FDA. Los resultados se mostraron en la Figura 2.

Los resultados mostraron que el glutamato puede inducir lesión y muerte de las neuronas granulares del cerebelo. MK801 pudo prevenir la lesión inducida por el glutamato de las neuronas granulares del cerebelo. YC-10 también fue eficaz en la prevención del daño por excitotoxinas inducido por el glutamato de las neuronas granulares del cerebelo de una manera dependiente de la dosis. YC-10 protegió las neuronas granulares del cerebelo contra el daño inducido por el glutamato (Fig. 3).

##### *2.2 Neuronas granulares del cerebelo protegidas con YC-10 de la muerte inducida por un bajo nivel de potasio*

Se cultivaron neuronas granulares del cerebelo *in vitro* durante 8 días. Los grupos de tratamiento recibieron YC-10 a diversas concentraciones y se incubaron durante 30 min. Tras ello, el grupo modelo y todos los grupos de tratamiento se reemplazaron por medio BME 5K (es decir, KCl 5 mM) (BME 25K para el grupo de control) y se añadió YC-10 a las respectivas concentraciones. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 h, seguido de la tinción con FDA. Los resultados se mostraron en la Figura 4.

Como se muestra en la Fig. 4, el medio con bajo nivel de potasio puede reducir la muerte de las neuronas granulares del cerebelo. YC-10 (50  $\mu$ M) pudo evitar que las neuronas murieran por inducción de un bajo nivel de potasio. YC-10 protegió a las neuronas granulares del cerebelo de la muerte inducida por un bajo nivel de potasio.

##### *2.3 YC-10 protegió a las células ganglionares de la retina de la muerte inducida por la lesión de pinzamiento del nervio óptico*

Se usó hidrato de cloral al 10 % para anestesiarse a las ratas. Se administraron YC-10 (20 mg/kg) o disolventes a

través de la vena de la cola 20 min antes de la cirugía. Los ojos se sometieron a anestesia tópica. Se cortó la conjuntiva a lo largo de la córnea del limbo con tijeras corneales y micropinzas intraoculares. Se diseccionó bruscamente el recto lateral para exponer el nervio óptico por completo. Se usaron pinzas de acción cruzada para sujetar el nervio óptico durante 5 segundos a 2 mm por detrás del globo ocular, y luego se soltó. Tras la operación, se aplicó una pomada ocular antibiótica para prevenir la infección. Los fármacos se administraron 2 horas después de la operación, el día 2 y el día 3. El día 7, se extrajeron los globos oculares para el examen patológico.

Como se muestra en la Fig. 5, el examen patológico mostró que la lesión por pinzamiento del nervio óptico puede inducir la muerte de las células ganglionares de la retina (CGR). Se demostró que YC-10 ralentiza o previene la muerte inducida por la lesión de pinzamiento, es decir, YC-10 puede proteger a las células ganglionares de la retina de la muerte inducida por la lesión de pinzamiento del nervio óptico. Se registraron los recuentos de CGR en cada grupo y se presentaron en la Fig. 6.

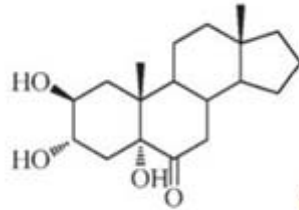
*2.4 YC-10 protegió a las células ganglionares de la retina de la muerte inducida por la alta presión ocular y la isquemia*

Se usó hidrato de cloral al 10 % para anestesiarse a las ratas. Los ojos se sometieron a anestesia tópica. Se colocó un aparato de perfusión 176 cm por encima de los globos oculares de las ratas (produciendo una presión intraocular de 130 mmHg). Se introdujo la aguja de la jeringa 30G 1/2 cuidadosamente en la cámara anterior. Los globos oculares se volvieron blancos y se registró la hora de inicio de la isquemia. 1 h después de la isquemia, se retiró la aguja de la jeringa rápidamente y se trataron los ojos con gotas antibióticas oculares. Se devolvieron las ratas de nuevo a la jaula. Los fármacos se administraron 20 antes de la modelización para el grupo de disolvente y el grupo de YC-10 (20 mg/kg). A las 2 h, el día 2 y el día 3 después de la modelización, las ratas se trataron con YC-10 a través de la vena de la cola. El día 7 después de la modelización, se extrajeron los globos oculares para el examen patológico.

Como se muestra en la Fig. 7, el examen patológico mostró que la presión ocular alta y la isquemia pueden inducir la muerte de las células ganglionares de la retina (CGR). Se demostró que YC-10 reduce o previene la muerte inducida por isquemia, es decir, YC-10 puede proteger las células ganglionares de la retina de la muerte inducida por la alta presión ocular y la isquemia. Se registraron los recuentos de CGR en cada grupo y se presentaron en la Fig. 8.

REIVINDICACIONES

1. compuesto 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -trihidroxi-androst-6-ona, que tiene estructura de fórmula I, o un solvato del mismo:



(Fórmula I).

- 5
2. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1, o un solvato del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que comprende además un segundo agente protector de las neuronas.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el segundo agente protector de las neuronas es un agente protector de las células ganglionares de la retina.
- 15 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que comprende además un segundo fármaco antitumoral.
6. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en la protección de las células neuronales.
- 20 7. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de tumores.
8. Un método para preparar el compuesto I de la reivindicación 1, método que comprende:
- 25 (a) someter el compuesto VI, es decir, 3 $\beta$ -p-toluensulfoniloxi-5 $\alpha$ -hidroxi-androst-6-ona, a una reacción de eliminación, obteniéndose el compuesto IX, es decir, 5 $\alpha$ -hidroxi-androst-2-en-6-ona; y
- (b) someter el compuesto IX a oxidación en el doble enlace de la posición 2 y a hidrólisis, obteniéndose el compuesto I.

Inhibición del Compuesto I contra el crecimiento de células LN18 y DBTRG-50MG

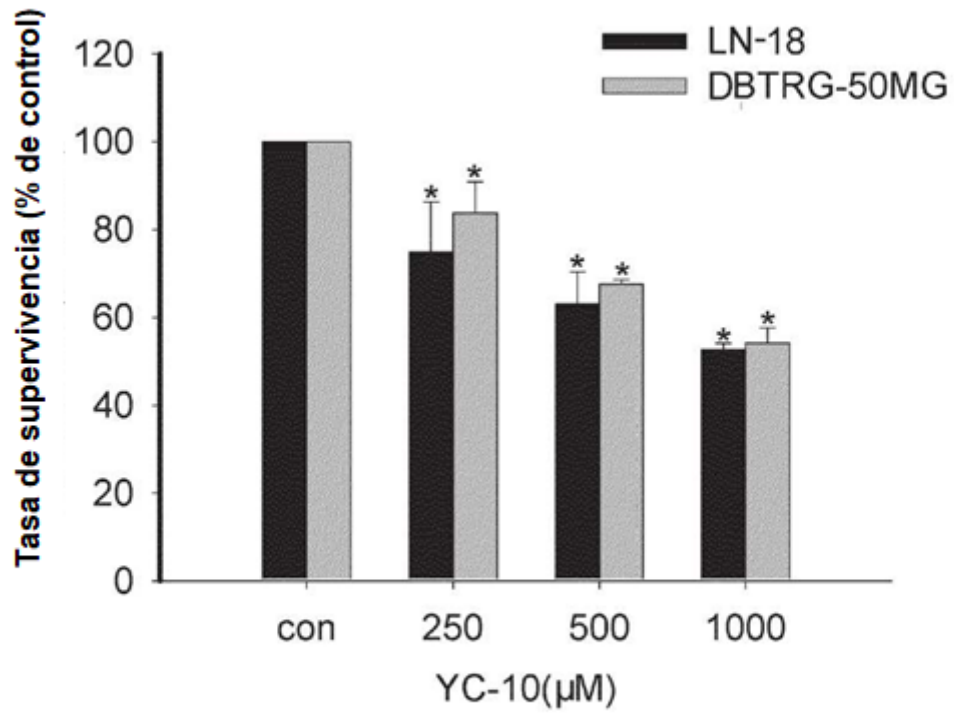


Fig. 1

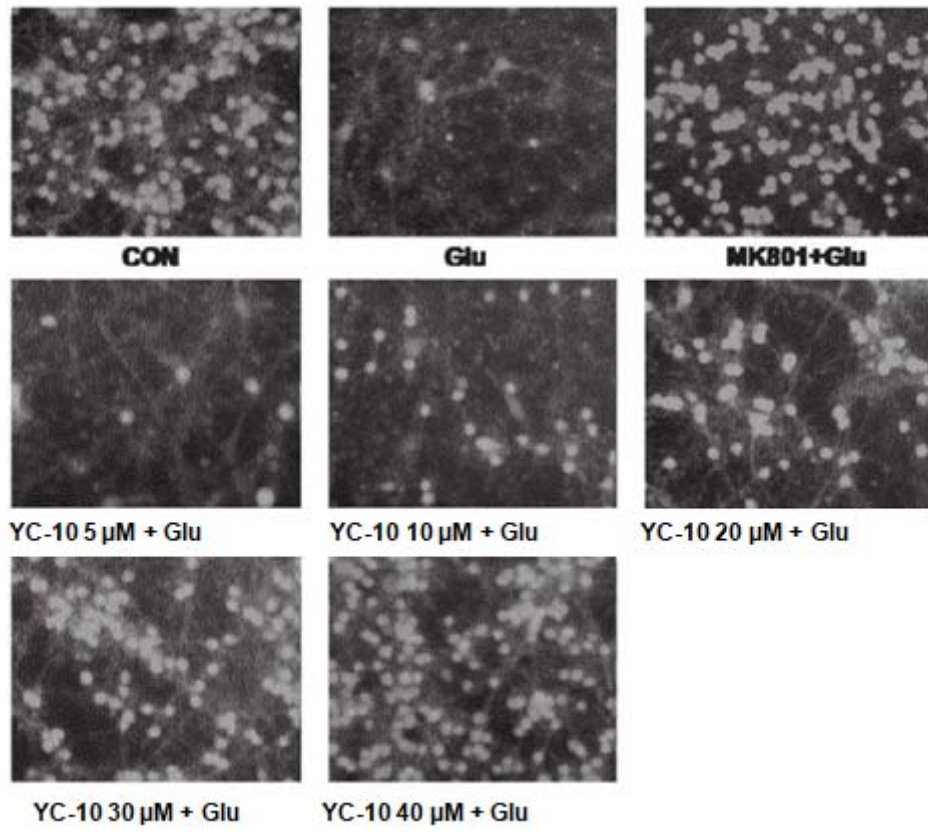


Fig. 2

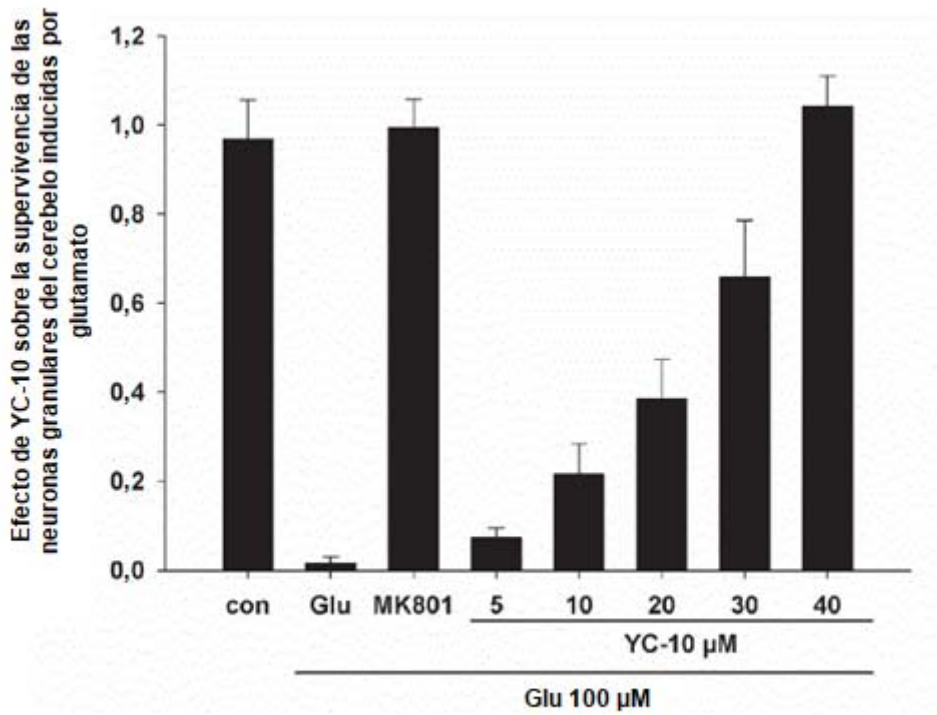


Fig. 3

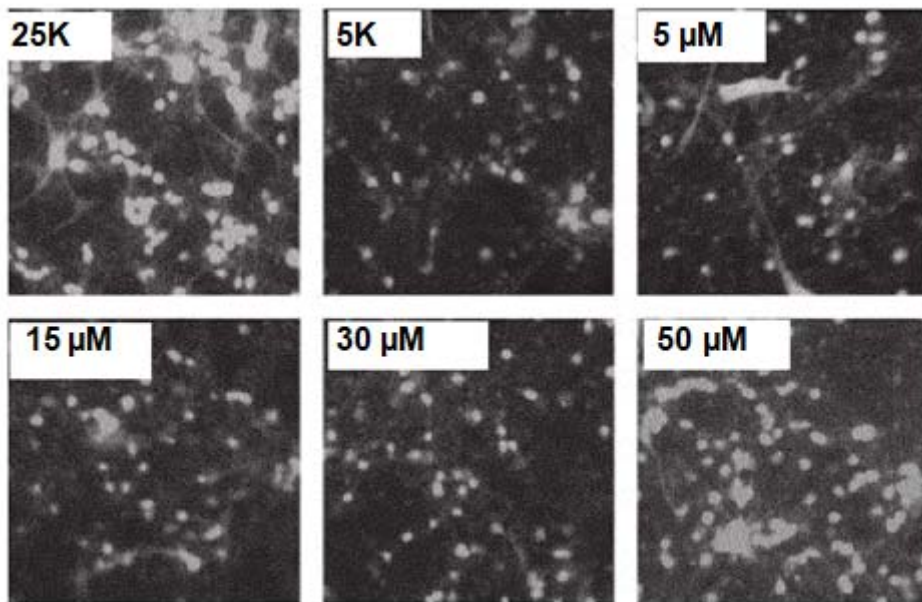


Fig. 4

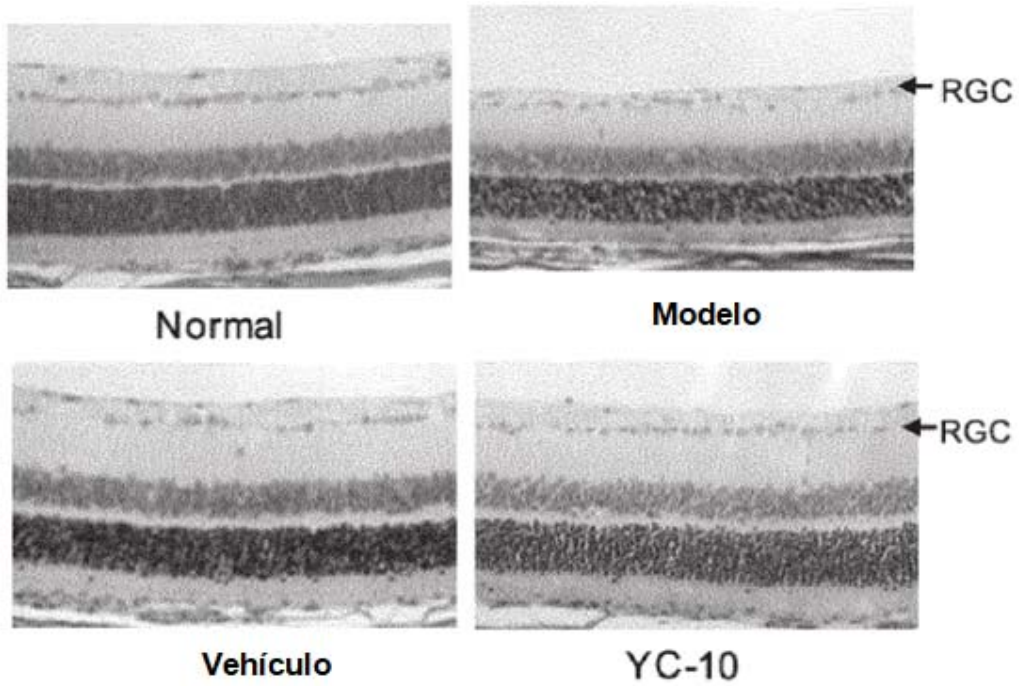


Fig. 5

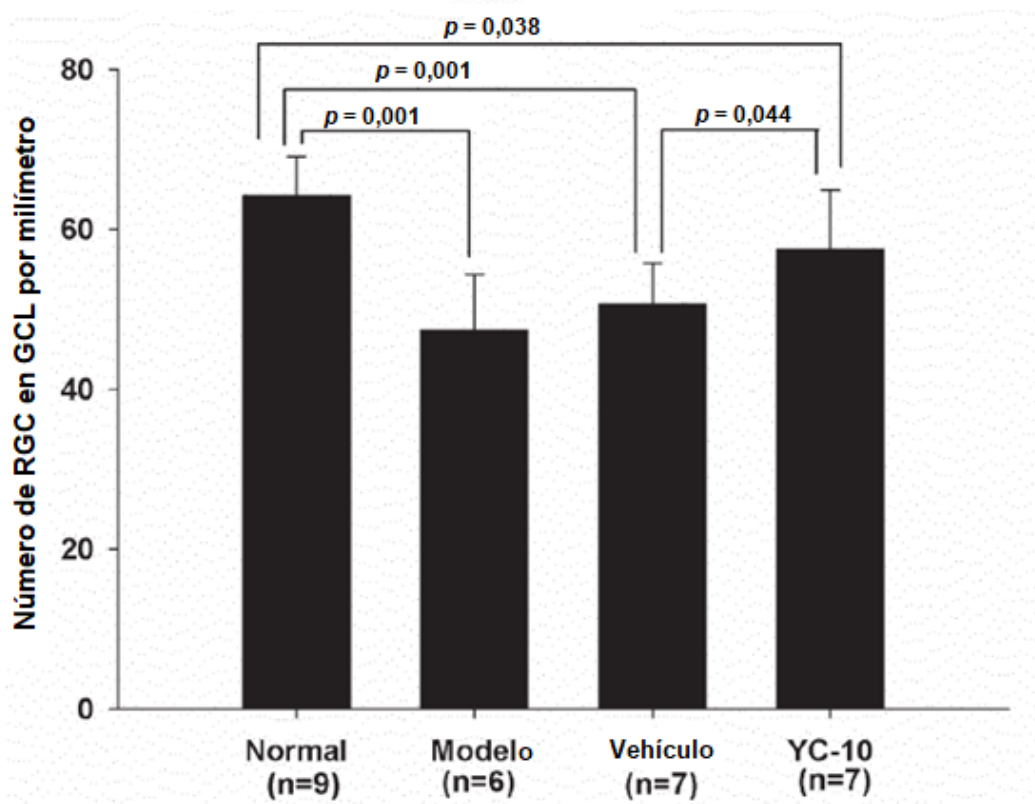


Fig. 6



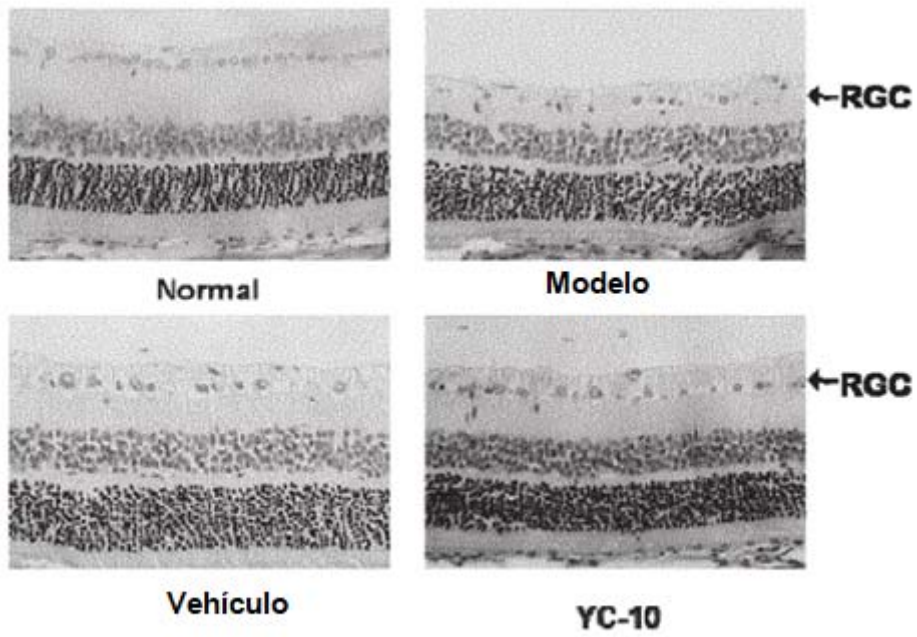


Fig. 7

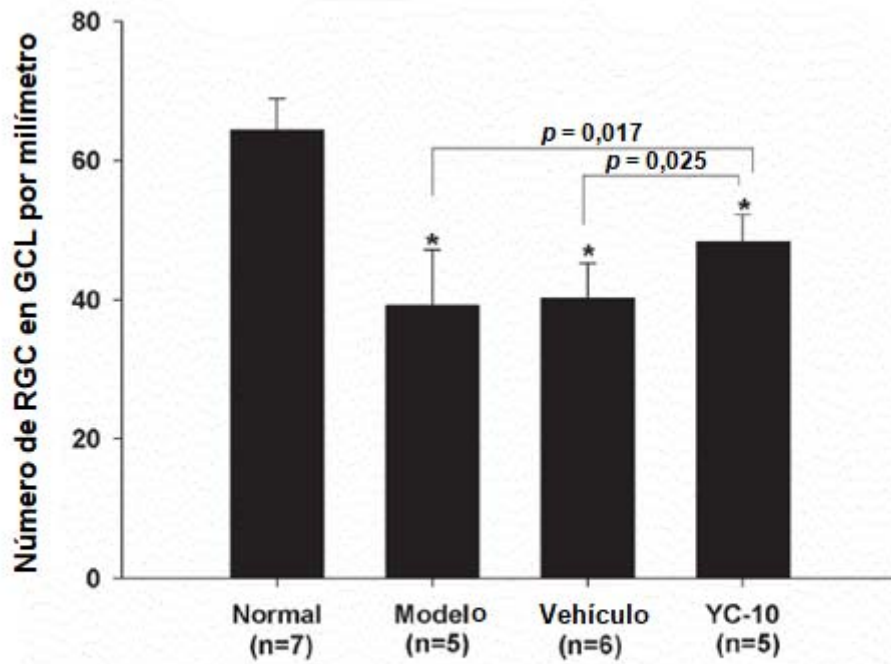


Fig. 8