

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 429**

51 Int. Cl.:

**C07J 73/00** (2006.01)

**A61K 31/58** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2016 PCT/EP2016/065071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2016 E 16739424 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3186268**

54 Título: **Ésteres de lactama esteroidea y derivados de ácido bis(2-cloroetil) aminofenoxi propanoico**

30 Prioridad:

**29.06.2015 EP 15386022**

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

**13.05.2019**

73 Titular/es:

**GALENICA S.A. (50.0%)**

**Eleftherias Str., 4**

**14564 Kifissia, GR y**

**ENERGONBIO TECHNOLOGIES S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TRAFALIS, DIMITRIOS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 712 429 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

Ésteres de lactama esteroidea y derivados de ácido bis(2-cloroetil) aminofenoxi propanoico

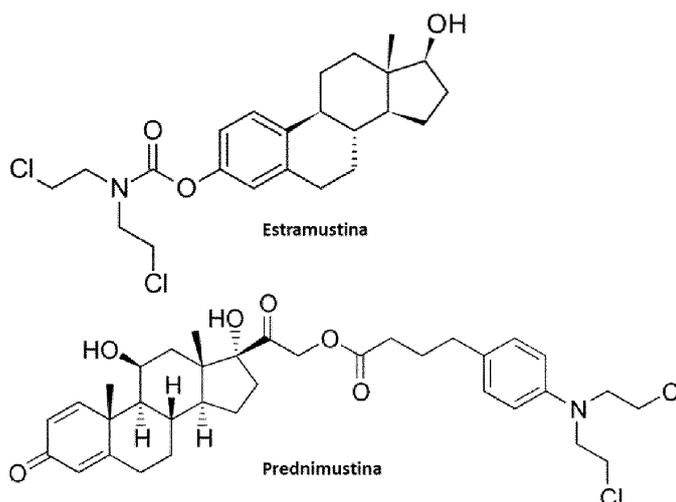
## Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos ésteres homo-aza-esteroideos con mostazas alquilantes, derivados de anilina, tales como ácido bis(2-cloroetil)aminofenoxi propanoico y derivados sustituidos.

## Antecedentes de la invención

10 En la actualidad, los agentes antineoplásicos alquilantes, como las mostazas de nitrógeno, todavía siguen siendo una clase eficaz de fármacos antitumorales en la práctica clínica actual, cuyos efectos terapéuticos proceden de su capacidad de unir grupos alquilo al ADN celular y producir un daño significativo en el ADN (Hurley LH, Nature Rev Cancer, 2002, 2:188-200; Brendel M y Ruhland A, Mutat Res, 1984; 133:51-85).

15 Los conjugados esteroideos se han usado previamente como portadores de agentes alquilantes citotóxicos, ya que reducen la toxicidad sistémica y mejoran la eficacia de la terapia del cáncer (Wall ME et al, J Med Chem, 1969, 12:810-8; Catane R, Cancer Treat Rep, 1978; 62:1264-5). En la actualidad se aplican agentes alquilantes esteroideos como Estramustina (éster de estradiol y mecloretamina) y Prednimustina (éster de prednisolona y clorambucilo) en la terapia del cáncer en el tratamiento del cáncer de próstata y neoplasias malignas linfoproliferativas, respectivamente (Catane R, Cancer Treat Rep, 1978, 62:1264-5; Matsumoto K et al, Med Oncol, 2013, 30:717; IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1990, 50:115-22; Hiddemann W, Eur J Cancer, 1995, 31A(13-14):2141-5).



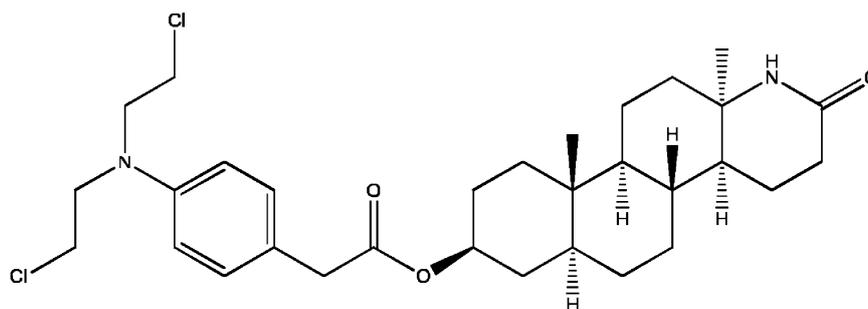
20 Aunque estos fármacos producen una toxicidad aguda y sistémica disminuida, al contrario que la toxicidad mucho mayor que sus componentes alquilantes producen por sí solos, su actividad antineoplásica no mejora tanto, al igual que la especificidad de la selectividad hacia las células cancerosas, que es más bien baja a pesar de las evaluaciones iniciales. Sin embargo, incluso si los mecanismos farmacológicos moleculares principales mediante los que estramustina y prednimustina ejercen su actividad antineoplásica son muy diferentes a la acción específica en los receptores esteroideos, en general muestran una eficacia terapéutica buena y mejorada en la práctica clínica.

25 Se han sintetizado previamente varios ésteres homo-aza-esteroideos o esteroideos lactámicos (esteroides que contienen el grupo lactama -NHC=O- en el/los anillo(s) esteroideo(s) conjugado(s) con agentes alquilantes) y se ha ensayado su toxicidad y actividad antineoplásica en el ámbito preclínico, *in vitro* e *in vivo* (Wampler GL y Catsoulacos P, Cancer Treat Rep, 1977, 61:37-41; Catsoulacos P y Catsoulacos D, Anticancer Res, 1991, 11:1773-7; Catsoulacos P y Catsoulacos D, Anticancer Res, 1993, 13(4): 1203-8; Catsoulacos P et al, Oncology, 1994, 51:74-8; Catsoulacos P y Catsoulacos D, Anticancer Res, 1994, 14(6B):2525-8; Camoutsis C y Trafalis DT, Invest New Drugs, 2003, 21:47-54; Koutsourea AI et al, Bioorg Med Chem, 2008, 16:5207-15). Efthimiou M et al., Mutation Res, 2010, 689:1-11 describe análogos de lactama esteroidea de ácido p-N,N-bis(2-cloroetil)aminofenilacético y su actividad en la proliferación celular. Catsoulacos P et al., J Heterocyclic Chem, 1995, 32:1063-1066 describe ésteres de estrona-lactama de ácido N,N-bis(2-cloroetil)aminocinámico y ácido N,N-bis(2-cloroetil)aminofenilbutírico, su toxicidad y su actividad contra la leucemia. Papaconstantinou IC et al., Anti-Cancer Drugs, 2013, 24(1):52-65 describe ésteres de lactama esteroidea de ácido 2-[4-N,N-bis(2-cloroetil)aminofenil]butanoico, su toxicidad *in vivo* y su actividad antileucémica. Papageorgiou A et al., Anti-Cancer Drugs, 2005, 16(10):1075-1082 describe ésteres de lactama esteroidea de ácido 4-N,N-bis(2-cloroetil)amino fenilacético, su toxicidad y su actividad antileucémica. Kapou A et al., J Chem Inf Model, 2008, 48:2254-2264 describe ésteres de lactama esteroidea de ácido p-N,N-bis(2-cloroetil)aminofenilacético, ácido p-metil-m-N,N-bis(2-cloroetil)aminobenzoico y ácido p-N,N-bis(2-

cloroetil)aminofenilbutírico, su toxicidad y su actividad antileucémica.

Los ésteres alquilantes esteroideos lactámicos mostraron que generan una toxicidad aguda significativamente disminuida *in vivo*, a la vez que mostraron una actividad antitumoral incrementada y muy prometedora *in vitro* e *in vivo*, mientras los respectivos agentes alquilantes esteroideos sin modificar (no lactámicos) produjeron una actividad antineoplásica significativamente inferior o escasa contra los respectivos sistemas de tumores experimentales. Excepto por la producción de daño en el ADN celular, todavía se desconocen los mecanismos farmacológicos moleculares que mejoraron significativamente el efecto antineoplásico de los ésteres alquilantes esteroideos lactámicos. Además, también se desconoce la importancia biológica de la posición en la que se incorporan uno o más grupos lactama en la estructura esteroidea. Además, el agente alquilante conjugado por medio de un enlace estérico en el esteroide lactámico desempeña un papel significativo, y modula la proporción de toxicidad aguda y actividad antitumoral, y por lo tanto el grado de índice terapéutico que genera un agente alquilante esteroideo lactámico. Hasta la fecha, se han sintetizado y ensayado varios agentes alquilantes esteroideos lactámicos activos, pero los que mostraron una mayor actividad antitumoral fueron más tóxicos, y los que mostraron una toxicidad menor fueron menos activos. Estas observaciones indican que existe una necesidad clara de desarrollar y producir nuevos conjugados de agentes alquilantes esteroideos lactámicos activos que generen de manera óptima la menor toxicidad y la mayor actividad antineoplásica, y por lo tanto un índice terapéutico óptimo.

Los estudios previos sobre ésteres alquilantes esteroideos lactámicos de derivados de mostazas de nitrógeno mostraron que el [p-[bis(2-cloroetil)amino]fenil]acetato de 3beta-hidroxi-13alfa-amino-13,17-seco-5alfa-androstan-17-oic-13,17-lactama (ASE, NSC-290205) produjo efectos muy bien equilibrados en ensayos preclínicos sobre la toxicidad aguda *in vivo* y la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, manteniendo un índice terapéutico significativamente elevado.



[p-[bis(2-cloroetil)amino]fenil]acetato de 3beta-hidroxi-13alfa-amino-13,17-seco-5alfa-androstan-17-oic-13,17-lactama (ASE, NSC-290205)

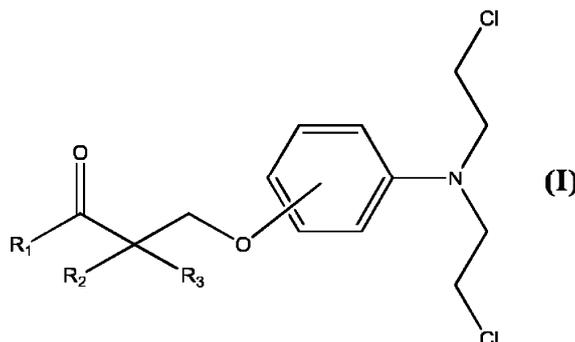
Por lo tanto, ASE representó la molécula de referencia para el desarrollo de moléculas nuevas de la misma clase de agentes, y para ensayarlas con respecto a la eficacia terapéutica en comparación con la de ASE.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona ésteres nuevos de lactamas esteroideas y agentes alquilantes. De manera más específica, los compuestos de la presente invención son ésteres de lactamas esteroideas con derivados de ácido bis(2-cloroetil)aminofenoxipropanoico. Estos compuestos exhiben una actividad antitumoral mayor y una toxicidad aguda menor en comparación con los ésteres alquilantes esteroideos lactámicos de la técnica anterior, y son útiles como agentes antineoplásicos y agentes terapéuticos del cáncer.

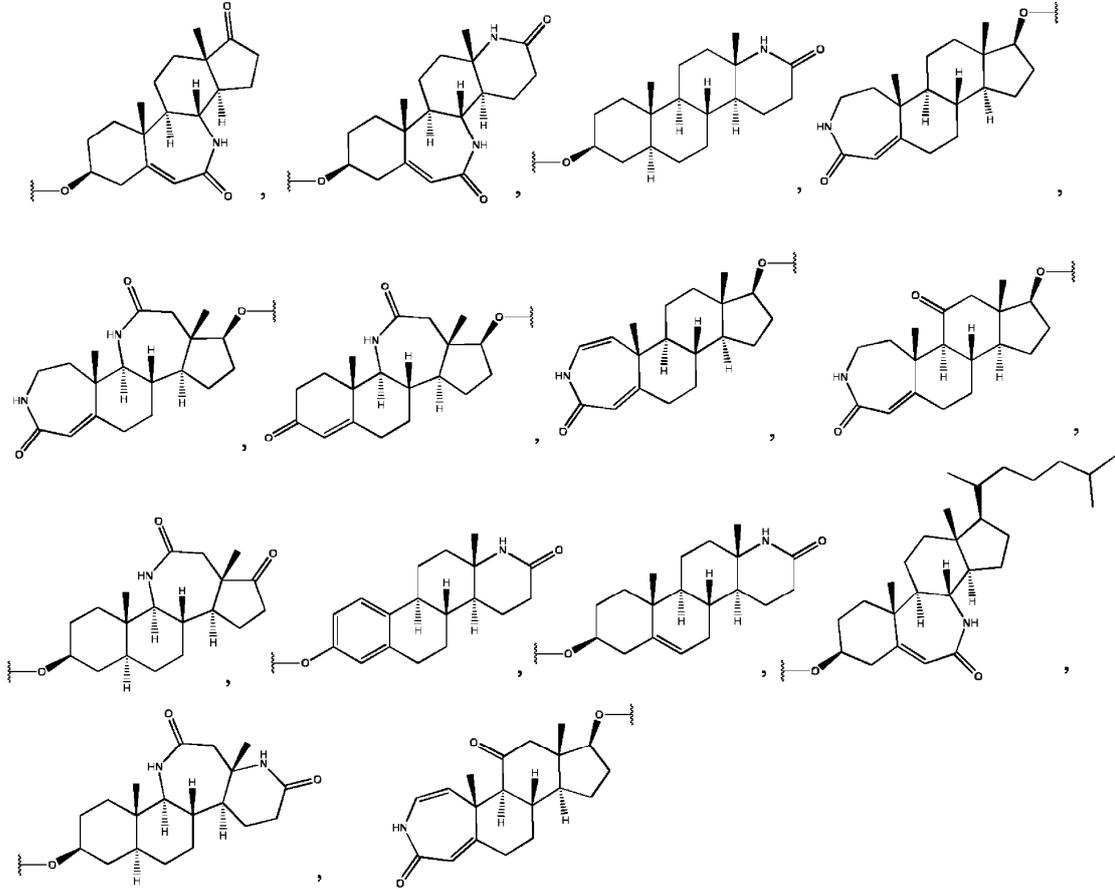
### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

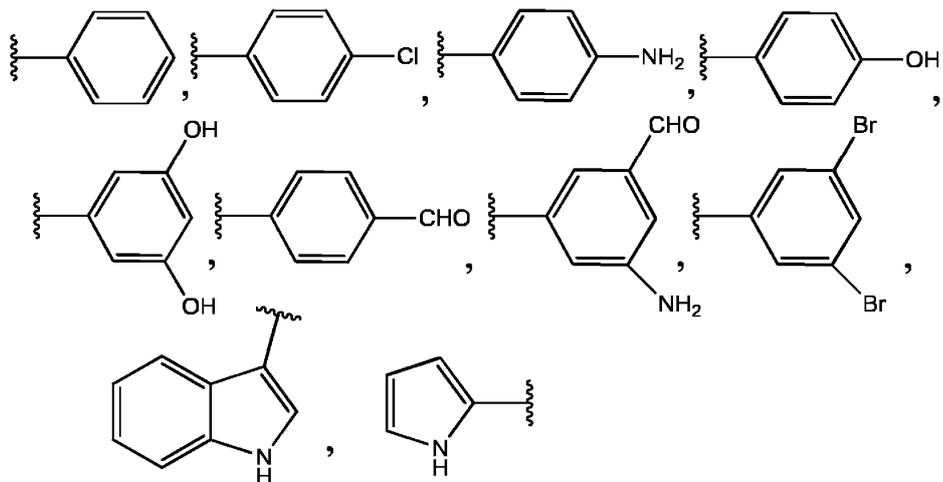


en la que

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en



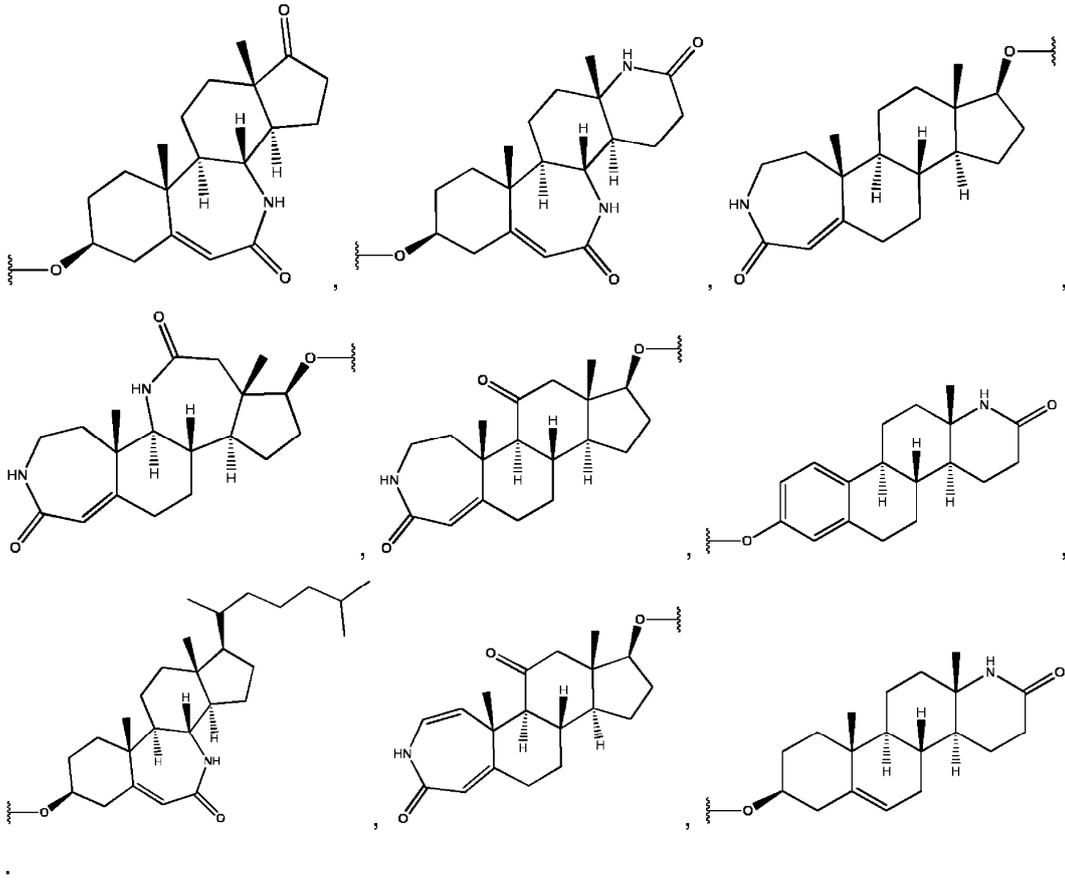
R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



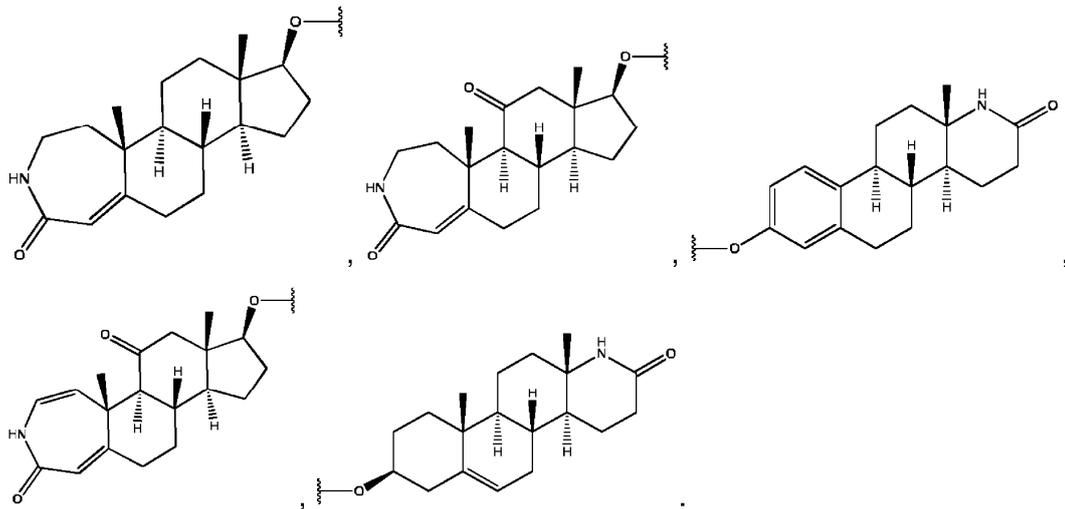
5

R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -OH, -NH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en



Más preferiblemente, R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en



5 Preferiblemente, R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Más preferiblemente, R<sub>2</sub> es H.

Preferiblemente, R<sub>3</sub> es H o NH<sub>2</sub>.

El grupo hidroxilo del resto de bis(2-cloroetil)aminofenol de los compuestos de fórmula (I) puede estar en posición orto, meta, o para con respecto al grupo amino del anillo fenilo.

10 Los compuestos de fórmula (I) contienen al menos un centro asimétrico. Cuando no se especifica la estereoquímica de un centro asimétrico, la estructura pretende abarcar todos los estereoisómeros individuales, así como sus mezclas.

Los compuestos de fórmula (I) contienen al menos un grupo funcional básico y son capaces, por lo tanto, de formar sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, fosfato, nitrato, acetato, propionato, butirato, maleato, fumarato, tartrato, citrato, lactato, oxalato, succinato, y benzoato.

Se pueden usar los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de una amplia diversidad de cánceres. Preferiblemente, se usan para el tratamiento del cáncer ovárico, de mama, de próstata o la leucemia.

Los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables exhiben una actividad antitumoral mayor y una toxicidad aguda menor en comparación con los ésteres alquilantes esteroideos lactámicos de la técnica anterior, y son útiles como agentes antineoplásicos y agentes terapéuticos del cáncer. Los ensayos preclínicos de la actividad biológica descritos en los ejemplos más adelante en la presente memoria incorporan, como comparación y para demostrar la superioridad de los nuevos ésteres esteroideos lactámicos alquilantes sobre la eficacia terapéutica contra el cáncer, dos controles positivos, el agente alquilante ácido (3-(4-(bis(2-cloroetil) amino)fenoxi)propanoico, pBCEAPOPA) solo, y la molécula de referencia de la clase descrita de agentes alquilantes esteroideos lactámicos experimentales, ASE (NSC-290205).

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Tal composición farmacéutica se puede formular para la administración mediante cualquier vía adecuada, tal como la vía oral, nasal, tópica o parenteral. Por ejemplo, se puede formular una composición farmacéutica en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución, suspensión, crema o gel. Tal composición contiene en general, además de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo comprende excipientes muy conocidos en la técnica, tales como diluyentes, aglutinantes, rellenos, disgregantes, lubricantes, disolventes, agentes de suspensión, agentes espesantes, tampones, conservantes. Estas composiciones se pueden preparar siguiendo métodos muy conocidos en la técnica.

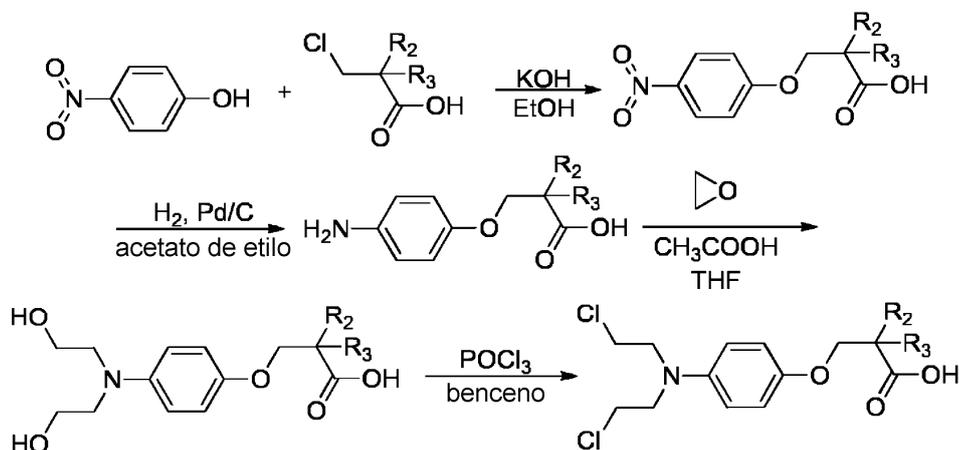
La presente invención también proporciona procesos para la preparación de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las lactamas esteroideas (aza-homo esteroideos) de los compuestos de fórmula (I) portan una o más funciones amida en los anillos de la estructura esteroidea básica. Se sabe que tales lactamas esteroideas se pueden sintetizar a partir de un cetoesteroide por medio de las oximas correspondientes y una transposición de Beckman (Koutsourea Al et al, Steroids, 2003, 68(7-8):659-66; Mazur RH, J Org Chem, 1963, 28(1):248-250; Morzycki JW et al, Bioorg Med Chem, 1996, 4(8): 1209-15; Camoutsis C y Catsoulacos P, J Heterocycl Chem, 1983, 20(4):1093-4; Huang Y et al, Molecules, 2013, 18(7):7436-47).

Procedimiento general para la transposición de Beckmann

Las oximas (1 mmol) se disolvieron en 17,5 mL de dioxano seco. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de tionilo (1,9 mL) gota a gota. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. La reacción se paró con NaHCO<sub>3</sub> y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en SiO<sub>2</sub>.

Los derivados de ácido bis(2-cloroetil)aminofenoxi propanoico de los compuestos de la presente invención se pueden preparar como sigue:



Los ácidos 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoicos sustituidos se sintetizaron partiendo de 4-nitrofenol. La alquilación de 4-nitrofenol con diferentes ácidos 3-cloropropanoicos proporcionó los ácidos 3-(4-nitrofenoxi)propanoicos, que se redujeron adicionalmente hasta los derivados amino mediante el uso de H<sub>2</sub> y Pd/C como catalizador. A continuación, el grupo amino se bis-alquiló con oxirano en CH<sub>3</sub>COOH, THF siguiendo un procedimiento conocido (Valu et al, J Med Chem, 1990, 33 (11): 3014-19). Finalmente, los grupos alcohol se transformaron en los cloruros correspondientes mediante el uso de POCl<sub>3</sub> en benceno y calentando, lo que proporcionó los ácidos 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoicos correspondientes. En ciertos casos, cuando hay presentes grupos amino o hidroxilo, son necesarias etapas extra para las reacciones de protección y desprotección. Por ejemplo, cuando R<sub>3</sub> es un grupo NH<sub>2</sub> u OH, se usan los grupos protectores Boc o Acetilo, respectivamente (Valu KK et al, J Med Chem, 1990, 33(11):3014-9). Siguiendo el mismo proceso, y partiendo de 2-nitrofenol o 3-nitrofenol, se pueden sintetizar derivados de fórmula (I) en los que el grupo hidroxilo está en posición orto o meta con respecto al grupo amino.

Para la producción de los ésteres de lactamas esteroideas con agentes alquilantes, las lactamas esteroideas que contienen el grupo OH reaccionan con el agente alquilante de ADN. Por ejemplo, una lactama esteroidea reacciona con el ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico con DCC, DMAP o con cloruro de 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoilo o con un anhídrido mixto de ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico para producir los ésteres correspondientes. Se puede derivatizar cualquier mono- o bis-lactama esteroidea mediante el uso del presente método.

#### Procedimiento general A para la esterificación de lactamas esteroideas

Se disolvió alcohol (1 mmol) en 28 mL de diclorometano seco. Después, se añadió ácido (2 mmol), DCC (2 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (3 %mol). Después de agitar la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice.

#### Procedimiento general B para la esterificación de lactamas esteroideas

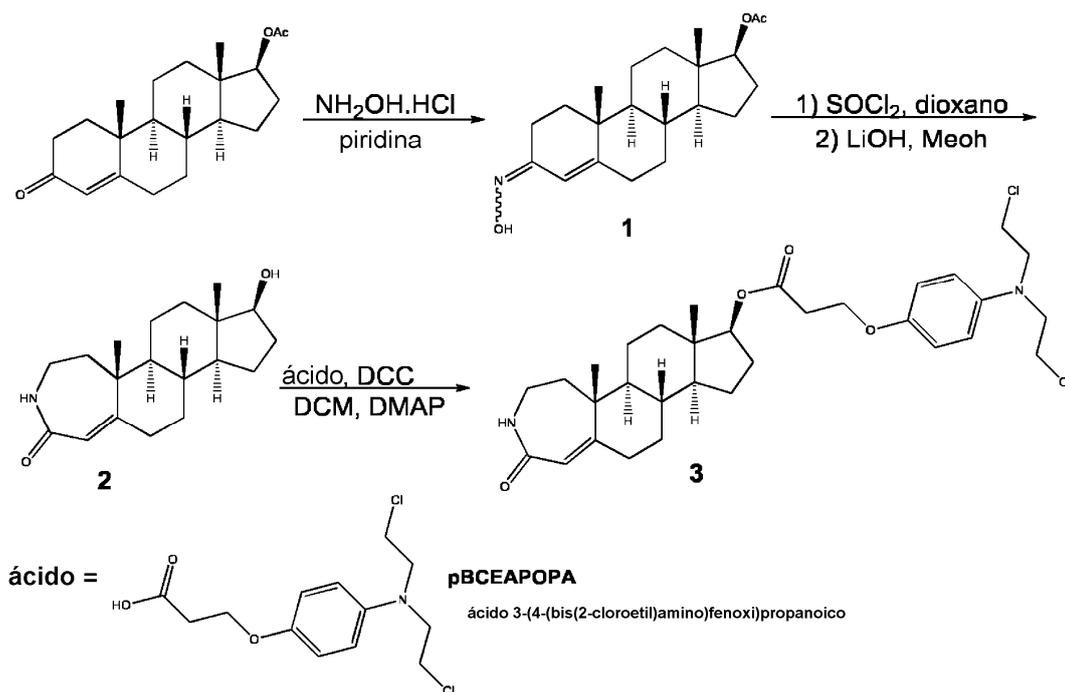
En un matraz de fondo redondo se diluyó 1 mmol del ácido en 3,3 mL de benceno seco. Se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (1,2 mmol) y trietilamina (2,4 mmol), y la mezcla se sometió a reflujo bajo Ar durante 1 h. A esta mezcla se le añadió una disolución del alcohol esteroideo, 50 mg (1 mmol) en 3,3 mL de benceno seco, y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. El reflujo continuó durante 3 h. Se eliminó completamente el benceno mediante evaporación a vacío, y el residuo restante se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla resultante se extrajo con una disolución acuosa de HCl del 5%, la capa orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> del 7% y finalmente con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna rápida con gel de sílice.

#### Procedimiento general C para la esterificación de lactamas esteroideas

Una mezcla de alcohol (1 mmol), Et<sub>3</sub>N (1,3 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), seguido de la adición de cloruro de benzoilo (0,12 mL, 1,1 mmol). La reacción se monitorizó mediante TLC y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, después se disolvió con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se paró con NH<sub>4</sub>Cl ac. saturado. La capa orgánica se secó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención.

#### Ejemplo 1



Esquema 1

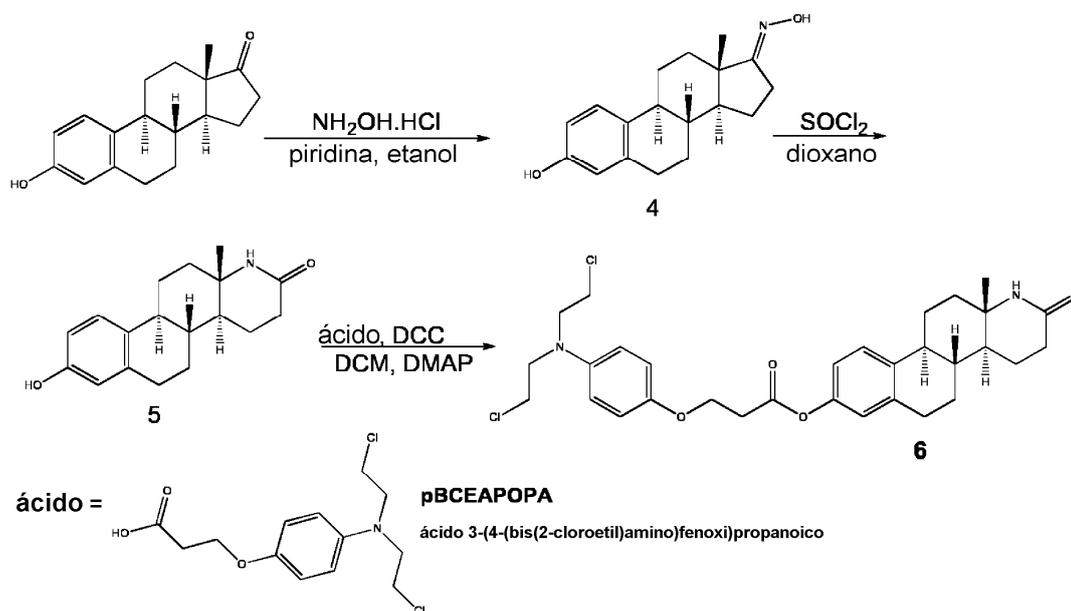
1: Se sintetizó 3-aza-17 $\beta$ -hidroxi-A-homo-4 $\alpha$ -androsten-4-ona mediante un procedimiento de modificación (Camoutsis C y Catsoulacos P, J Heterocycl Chem, 1983, 20(4):1093-4) de tres etapas a partir de 17- $\beta$ -acetato de testosterona. Se disolvió 17- $\beta$ -acetato de testosterona (914 mg, 2,77 mmol) en 10 ml de piridina seca. Se añadió hidrocloreuro de hidroxilamina (461 mg, 6,64 mmol), y la disolución se agitó a reflujo durante 6 h. La disolución se vertió en agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en SiO<sub>2</sub> (eluyente; hexano-acetato de etilo= 4/1) para proporcionar 675 mg de las *syn*- y *anti*-oximas (74%) en forma de sólidos blancos.

2: Se disolvieron las *syn*- y *anti*-oximas de 17-acetato de testosterona (100 mg, 0,145 mmol) en 3,5 mL de dioxano seco. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de tionilo (0,6 mL) gota a gota. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. La reacción se paró con NaHCO<sub>3</sub> y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en SiO<sub>2</sub> (acetato de etilo) para proporcionar 63 mg de 3-aza-17 $\beta$ -acetoxi-A-homo-4 $\alpha$ -androsten-4-ona (63%) en forma de un sólido blanco.

Se disolvió la 3-aza-17 $\beta$ -acetoxi-A-homo-4 $\alpha$ -androsten-4-ona 1 en 4,9 mL de MeOH y se añadió LiOH (1 N, 2 mL) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se paró con NH<sub>4</sub>Cl y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar 87 mg de la 3-aza-17 $\beta$ -hidroxi-A-homo-4 $\alpha$ -androsten-4-ona 2 con un rendimiento del 74%.

3: Se disolvió la 3-aza-17 $\beta$ -hidroxi-A-homo-4 $\alpha$ -androsten-4-ona 2 en 28 mL de diclorometano seco. Después se añadió ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico (106 mg, 0,573 mmol), DCC (119 mg, 0,574 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de agitar la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice (eluyente; hexano-acetato de etilo= 1/2) para proporcionar el conjugado 3 (191 mg, 99%). 3: p.f.=53-56 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> +10,5 (c= 0,91 CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6,92 (s, 1H), 6,83 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,66 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,72 (s, 1H), 4,66 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,17 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,63 (m, 4H), 3,59 (m, 4H), 3,32 - 3,04 (m, 2H), 2,75 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,48 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,15 (m, 2H), 1,50-1,98 (m, 10H), 1,33 (m, 2H), 1,14 (s, 3H), 1,05 (m, 1H), 0,80 (s, 3H); <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171,0, 170,4, 161,3, 151,3, 140,8, 118,8, 116,3, 114,4, 82,7, 64,4, 54,2, 53,2, 50,2, 44,5, 42,7, 41,9, 40,7, 36,7, 36,2, 35,3, 33,8, 33,1, 27,5, 25,6, 24,9, 23,4, 21,3, 12,1; FT-IR: 3450, 2925, 1731, 1651, 1607, 1512, 1469, 1353, 1238, 1181, 1041, 869, 813.

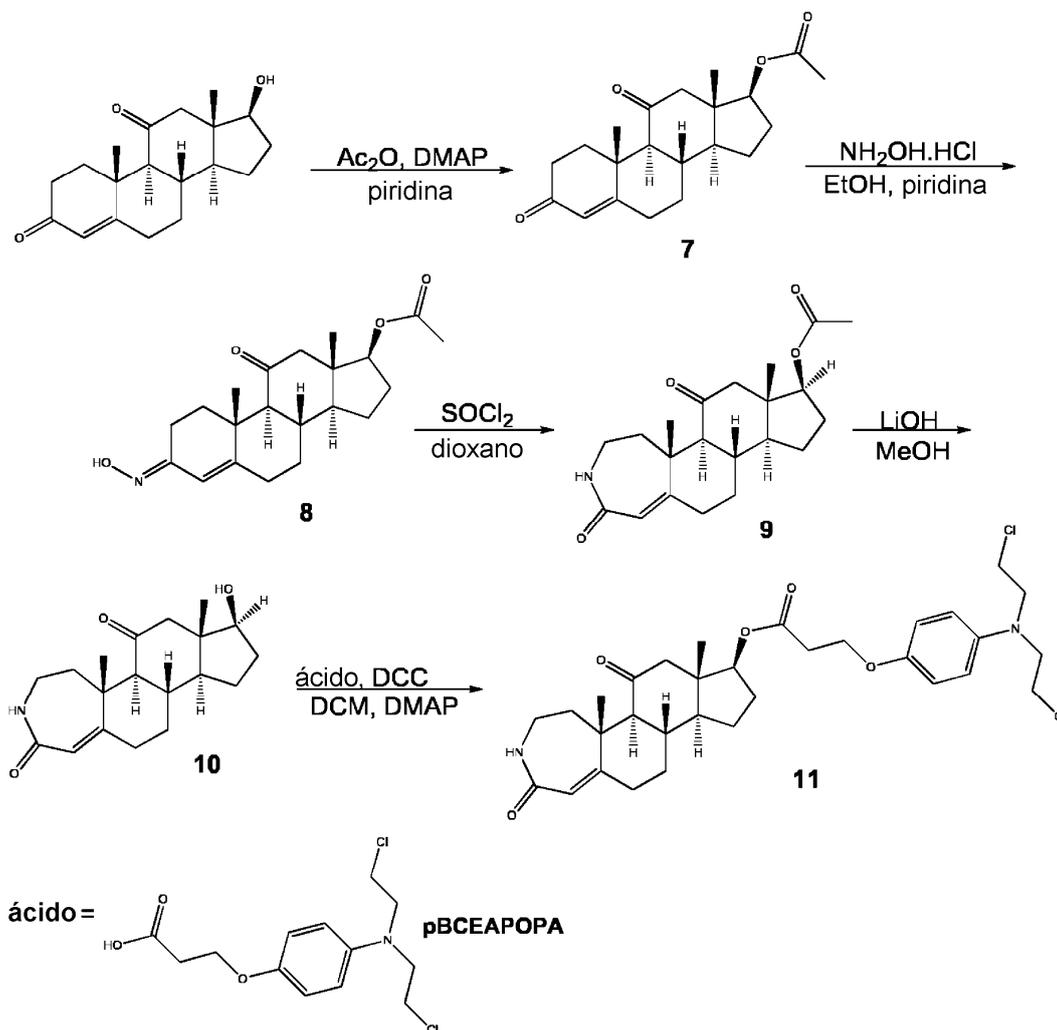
## Ejemplo 2



Esquema 2

- 4: La oxima de estrona se sintetizó según un procedimiento descrito previamente (Ivanenko TI et al, Pharm Chem J, 1982, 16(10):751-6). A una disolución de estrona (100 mg, 0,37 mmol) en 2,2 mL de etanol absoluto se le añadió hidrocloreuro de hidroxilamina (62 mg, 0,88 mmol) y piridina (1,2 mL). La mezcla se sometió a reflujo durante 6 horas. Después se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en SiO<sub>2</sub> (eluyente; hexano: acetato de etilo= 3:1) para proporcionar 105 mg de oxima de estrona (100 %) en forma de un sólido blanco.
- 5: La lactama 5 se sintetizó según un procedimiento descrito previamente (Regan BM y Newton Hayes F, J Am Chem Soc, 1956, 78(3): 639-43). La oxima de estrona (108 mg, 0,376 mmol) se disolvió en 6,3 mL de dioxano seco. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de tionilo (0,7 mL) gota a gota. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. La reacción se paró con NaHCO<sub>3</sub> y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en SiO<sub>2</sub> (eluyente; hexano: acetato de etilo= 2:1) para proporcionar 42 mg de la lactama 5 (56% respecto del material inicial recuperado) acompañada de material inicial recuperado [32 mg del material inicial (0,112 mmol)].
- 6: La lactama 5 se disolvió en 14 mL de DMF seca. Después se añadió ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico (90 mg, 0,293 mmol), DCC (61 mg, 0,293 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de agitar la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice (eluyente; diclorometano/acetona= 2/1) para proporcionar el conjugado 6 (56 mg, 68%). Conjugado 6: [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +73,5 (c= 0,90 CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,25 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,68 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,31 (s, 1H), 4,30 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,62 (dt, J = 29,2, 6,6 Hz, 8H), 2,97 (dd, J = 15,1, 9,0 Hz, 2H), 2,88 (m, 2H), 2,58 - 2,36 (m, 4H), 2,23 - 2,00 (m, 2H), 1,92 - 1,66 (m, 3H), 1,60 - 1,29 (m, 4H), 1,19 (s, 3H); <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171,7, 169,8, 151,3, 148,5, 141,0, 137,8, 137,2, 126,1, 121,3, 118,7, 116,5, 114,5, 64,4, 54,4, 54,2, 46,6, 43,4, 40,7, 39,9, 38,9, 34,9, 30,5, 29,5, 26,5, 25,9, 22,1, 19,8; FTIR: 3329, 2927, 2850, 1757, 1626, 1577, 1512, 1437, 1311, 1244, 1157, 1088, 1045, 892.

## Ejemplo 3



Esquema 3

- 7: Se disolvió 17-hidroxiandrost-4-en-3,11-diona (484 mg, 1,59 mmol) en 2,2 mL de anhídrido acético. Después se añadieron 4 mg (0,037 mmol) de DMAP y 0,25 mL de piridina seca. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se paró con agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (eluyente; hexano: acetato de etilo= 6:1) para proporcionar 472 mg de 17-acetoxiandrost-4-en-3,11-diona con un rendimiento del 86%. 7: p.f.=162-164 °C  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +148,0$  (c 1,68  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,69 (s, 1H), 4,76 (t,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 2,83 - 2,69 (m, 1H), 2,54 - 2,20 (m, 6H), 2,01 (d,  $J = 1,2$  Hz, 3H), 1,92 (m, 3H), 1,85 - 1,55 (m, 4H), 1,51 - 1,41 (m, 1H), 1,44 - 1,34 (m, 3H), 1,32 - 1,10 (m, 2H), 0,85 - 0,69 (m, 3H);  $^{13}\text{C RMN}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  208,3, 199,5, 170,8, 168,3, 124,6, 80,2, 62,6, 54,8, 49,4, 46,2, 38,2, 37,0, 34,7, 33,7, 32,1, 31,7, 27,6, 22,9, 20,9, 17,2, 12,8; FT-IR: 3443, 2958, 2935, 2850, 1732, 1702, 1677, 1618, 1426, 1373, 1360, 1343, 1271, 1238, 1224, 1045, 1027.
- 8: A una disolución de 17-acetoxiandrost-4-en-3,11-diona (465 mg, 1,35 mmol) en 7 mL de etanol absoluto se le añadió hidrocloreto de hidroxilamina (100 mg, 1,44 mmol) y piridina seca (4,2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (eluyente; diclorometano: acetato de etilo= 20:1) para proporcionar 461 mg de las oximas 8 (95 %).
- 9: Las oximas 8 (264 mg, 0,74 mmol) se disolvieron en 13 mL de dioxano seco. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de tionilo (1,4 mL) gota a gota. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. La reacción se paró con  $\text{NaHCO}_3$  y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (eluyente; acetato de etilo: metanol = 1: 0,03) para proporcionar 163 mg de la lactama 9 con un rendimiento del 62 %. 9:  $^1\text{H RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,39 (s, 1H), 5,75 (s, 1H), 4,78 (t,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 3,35 - 3,18 (m, 1H), 3,09 (dt,  $J = 14,7, 7,2$  Hz, 1H), 2,67 (dd,  $J = 14,9, 8,2$  Hz, 1H),

2,48 (td,  $J = 13,6, 3,9$  Hz, 1H), 2,34 - 2,20 (m, 3H), 2,14 (dd,  $J = 9,3, 6,5$  Hz, 1H), 2,03 (s, 3H), 2,01 - 1,86 (m, 2H), 1,83 - 1,53 (m, 5H), 1,48 - 1,37 (m, 1H), 1,38 (s, 3H), 1,28 - 1,08 (m, 1H), 0,76 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  209,0, 170,8, 169,5, 158,4, 120,1, 80,1, 62,4, 55,1, 49,9, 46,7, 43,6, 40,4, 36,8, 36,8, 35,5, 33,2, 27,6, 22,8, 21,1, 20,9, 12,8; FT-IR: 3428, 2971, 2920, 2878, 2364, 2341, 1736, 1701, 1664, 1639, 1599, 1444, 1375, 1339, 1245, 1127, 1089, 1046.

5

10: La lactama 9, 76 mg (0,21 mmol) se disolvió en 3 mL de MeOH y se añadió LiOH (1 N, 1,2 mL) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se paró con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 5 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar 67 mg de la lactama 10. 10:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO)  $\delta$  7,72 (s, 1H), 5,51 (s, 1H), 4,66 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H), 3,66 (dd,  $J = 13,4, 8,4$  Hz, 1H), 3,08 - 2,90 (m, 2H), 2,47 - 2,32 (m, 2H), 2,29 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 2,21 (d,  $J = 11,2$  Hz, 1H), 2,14 - 2,01 (m, 2H), 2,01 - 1,78 (m, 3H), 1,74 - 1,50 (m, 3H), 1,40 (m, 1H), 1,28 (s, 3H), 1,23 (s, 1H), 1,15 - 1,02 (m, 1H), 0,55 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, DMSO)  $\delta$  210,2, 167,8, 157,3, 120,3, 78,1, 61,0, 54,5, 48,8, 47,1, 43,1, 40,4, 36,8, 35,5, 34,9, 33,1, 29,9, 22,3, 20,9, 11,8; FT-IR: 3423, 3262, 2952, 2923, 2853, 1693, 1647, 1609, 1458, 1407, 1375, 1353, 1261, 1062.

10

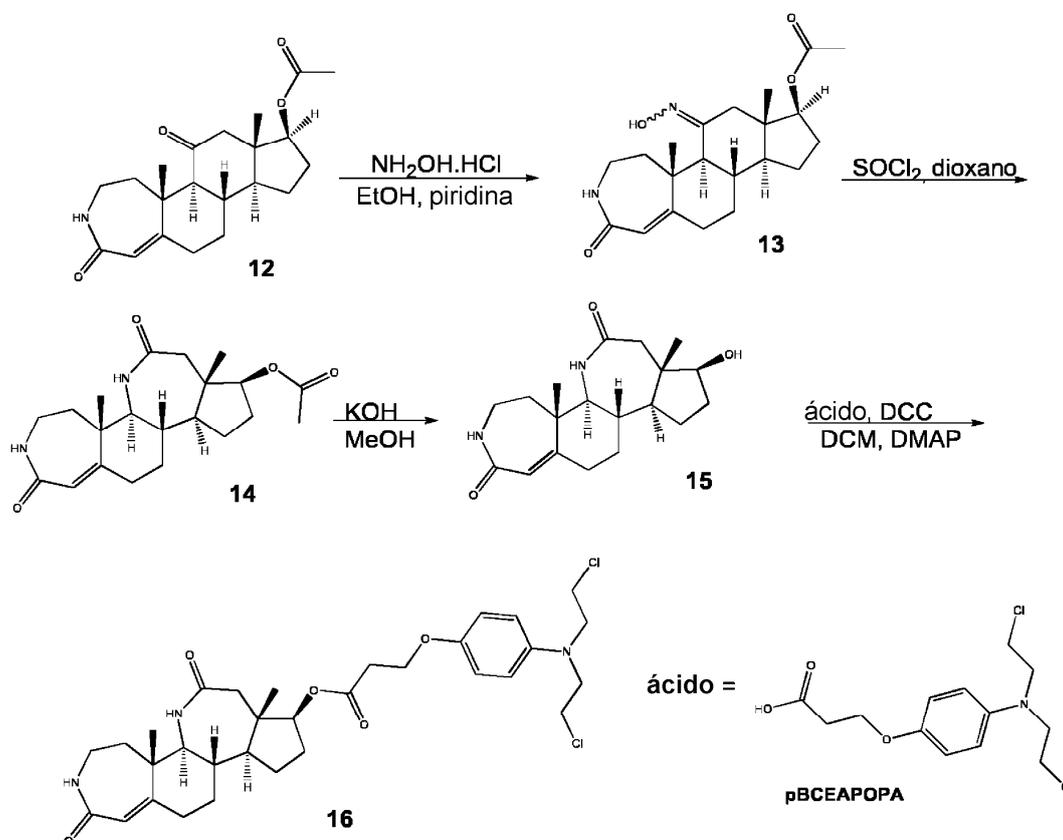
15

11: La lactama 10 se disolvió en 8,2 mL de DCM seco. Después se añadió ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico (51 mg, 0,17 mmol), DCC (51 mg, 0,25 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de agitar la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice (eluyente; acetato de etilo) para proporcionar el conjugado 11 (48,5 mg, 96%). Conjugado 11:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,83 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 6,67 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 6,11 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,86 (t,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 4,17 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 3,61 (m, 8H), 3,25 (m, 1H), 3,18 - 3,01 (m, 1H), 2,84 - 2,59 (m, 2H), 2,59 - 2,38 (m, 1H), 2,37 - 2,25 (m, 3H), 2,16 (m, 1H), 2,10 - 1,89 (m, 3H), 1,87 - 1,55 (m, 4H), 1,39 (s, 3H), 1,26 (m, 2H), 1,12 (m, 1H), 0,76 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  208,9, 170,9, 169,5, 158,7, 151,3, 140,9, 119,9, 116,2, 114,5, 80,4, 64,2, 62,4, 55,1, 54,3, 49,9, 46,8, 43,6, 40,7, 36,8, 35,5, 34,9, 33,9, 27,6, 25,6, 24,9, 22,8, 21,2, 12,8; FT-IR: 3432, 3328, 2927, 2850, 1733, 1701, 1664, 1626, 1599, 1513, 1444, 1389, 1369, 1310, 1273, 1243, 1179, 1087, 1041, 999.

20

25

## Ejemplo 4



Esquema 4

30

13: A una disolución de 12 (100 mg, 0,28 mmol) en 1,5 mL de etanol absoluto en un tubo sellado se le añadió hidrocloreuro de hidroxilamina (21 mg, 0,31 mmol) y piridina seca (0,9 mL). La mezcla se calentó a  $140^\circ\text{C}$  durante 7 días. Después se añadió agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL). Las capas orgánicas se

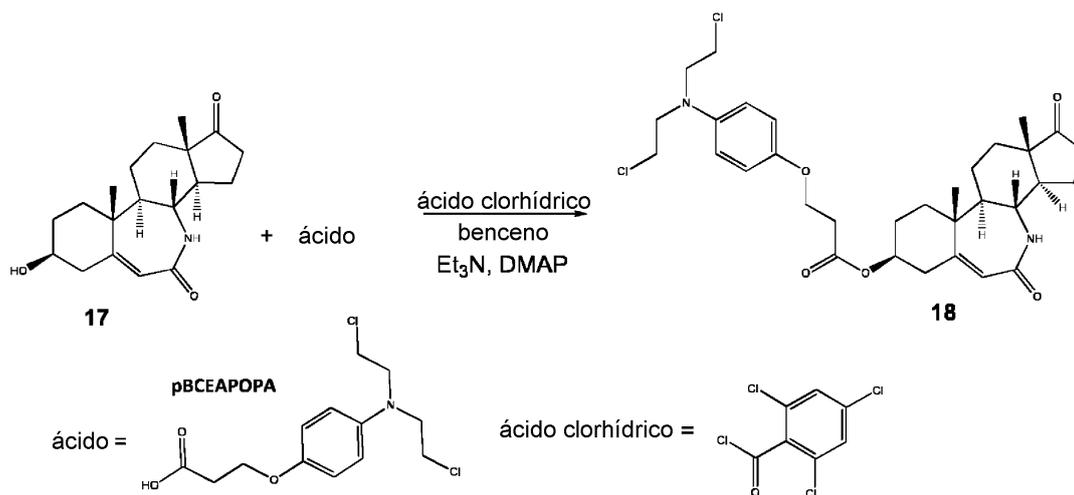
secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar un producto bruto, que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

14: Las oximas 13 brutas descritas anteriormente (0,28 mmol) se disolvieron en 4,9 mL de dioxano seco. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió cloruro de tionilo (0,54 mL) gota a gota. Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. La reacción se paró con  $\text{NaHCO}_3$  y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (eluyente; acetato de etilo: metanol = 1: 0,1) para proporcionar 52 mg de lactama con un rendimiento del 50 %. 14:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,00 (s, 1H), 5,77 (s, 1H), 5,59 (s, 1H), 4,61 (t,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 3,20 (m, 2H), 3,02 (dd,  $J = 9,6, 5,0$  Hz, 1H), 2,48 - 2,40 (m, 2H), 2,31 (d,  $J = 13,7$  Hz, 1H), 2,16 (m, 2H), 2,09 - 2,0 - 1,97 (m, 5H), 1,74-1,84 (m, 2H), 1,51 - 1,40 (m, 2H), 1,35-1,30 (m, 1H), 1,24 (s, 3H), 1,23 (m, 1H), 1,08 (m, 1H), 0,95 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175,1, 170,9, 169,4, 156,3, 120,4, 80,1, 64,2, 55,5, 45,2, 44,6, 41,0, 40,8, 38,0, 36,3, 34,4, 31,0, 25,4, 25,2, 21,9, 21,0, 11,7.

15: Se disolvió la lactama 14, 28 mg (0,084 mmol) en 1,2 mL de MeOH y se añadió LiOH (1 N, 0,5 mL) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se paró con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 mL). Las capas orgánicas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en  $\text{SiO}_2$  (eluyente; acetato de etilo: metanol = 1: 0,1) para proporcionar 28 mg de la lactama 15 con un rendimiento del 100 %. 15:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO)  $\delta$  7,75 (s, 1H), 6,13 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 5,53 (s, 1H), 4,66 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 3,40 (m, 2H), 3,11 - 2,93 (m, 2H), 2,44 - 2,34 (m, 1H), 2,29 (s, 2H), 2,04 - 1,72 (m, 5H), 1,65 (m, 2H), 1,24 (m, 3H), 1,20 (s, 3H), 0,89 (m, 1H), 0,66 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, DMSO)  $\delta$  174,6, 167,7, 156,1, 120,1, 78,1, 69,8, 63,4, 44,9, 44,2, 41,2, 40,4, 37,7, 35,3, 33,7, 31,3, 27,7, 24,4, 20,9, 10,7.

16: La lactama 15 (30 mg, 0,09 mmol) se disolvió en 9 mL de DCM seco. Después se añadió ácido 3-(4-(bis(2-cloroetil)amino)fenoxi)propanoico (67 mg, 0,22 mmol), DCC (60 mg, 0,29 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de agitar la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 h, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice (eluyente; acetato de etilo/MeOH=10/1) para proporcionar el conjugado 16 (39 mg, 70%).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,85 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 6,65 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 5,79 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 4,68 (t,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,17 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 3,60 (m, 4H), 3,51 - 3,42 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 3,02 (dd,  $J = 9,5, 5,0$  Hz, 1H), 2,85 - 2,67 (m, 2H), 2,51 (d,  $J = 13,8$  Hz, 1H), 2,44 (dd,  $J = 13,6, 10,1$  Hz, 1H), 2,33 (d,  $J = 13,8$  Hz, 1H), 2,25 - 2,06 (m, 2H), 2,07 - 1,73 (m, 5H), 1,73 - 1,28 (m, 5H), 1,25 (s, 3H), 1,17 - 1,03 (m, 2H), 0,96 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,7, 170,9, 169,1, 155,6, 151,3, 140,9, 120,7, 116,3, 114,4, 80,5, 64,2, 64,1, 55,5, 54,2, 45,3, 44,5, 41,1, 40,7, 38,1, 36,3, 34,8, 34,4, 33,9, 31,0, 25,6, 25,5, 25,2, 24,9, 21,9, 11,8. FT-IR: 3410, 3330, 2926, 2850, 1734, 1654, 1627, 1577, 1513, 1445, 1349, 1273, 1243, 1180, 1133, 1110, 1087, 1044, 890.

#### Ejemplo 5



35

Esquema 5

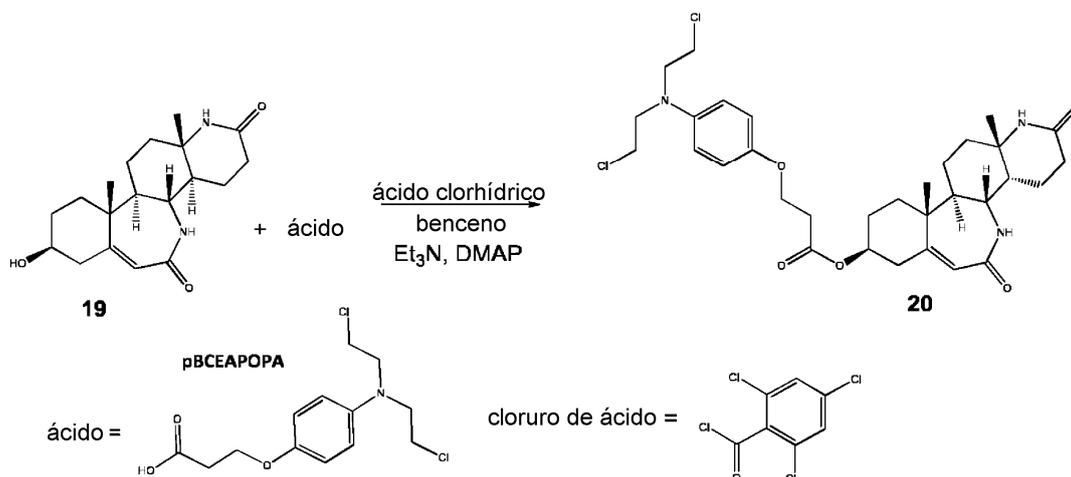
Se sintetizó la lactama 17 según Koutsourea et al (Steroids, 2003, 68(7-8):659-66).

18: En un matraz de fondo redondo se diluyeron 48 mg (0,157 mmol) del ácido en 0,5 mL de benceno seco. Se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (30  $\mu\text{l}$ , 0,189 mmol) y trietilamina (53  $\mu\text{l}$ , 0,378 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo bajo Ar durante 1 h. A esta mezcla se le añadió una disolución del alcohol esteroideo, 50 mg (0,157 mmol) en 0,5 mL de benceno seco, y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. El reflujo continuó durante 3 h. Se eliminó completamente el benceno mediante evaporación a vacío, y el residuo restante se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La

40

mezcla resultante se extrajo con una disolución acuosa de HCl del 5%, la capa orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> del 7% y finalmente con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice (eluyente; acetato de etilo/MeOH=100/1) para proporcionar 46 mg del conjugado 18 con un rendimiento del 48%. Conjugado 18: <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,67 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,90 (s, 1H), 5,86 (s, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,19 (m, 2H), 3,58-3,59 (m, 8H), 3,48 (m, 1H), 2,61-1,25 (18H), 1,29 (s, 3H), 0,88 (s, 3H); [M+H]<sup>+</sup>=605.

## Ejemplo 6

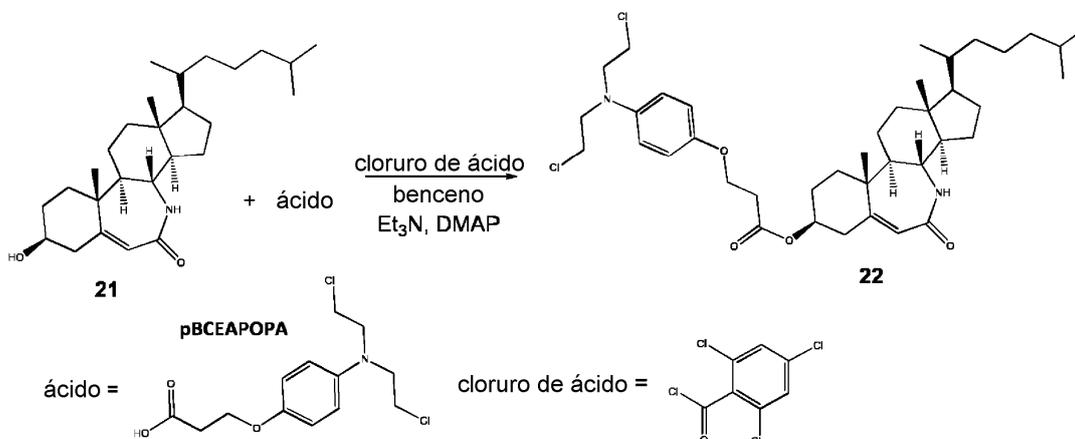


Esquema 6

10 Se sintetizó la lactama 19 según Koutsourea et al (Steroids, 2003, 68(7-8):659-66).

20: En un matraz de fondo redondo se diluyeron 46 mg (0,15 mmol) del ácido en 0,5 mL de benceno seco. Se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (28 µl, 0,18 mmol) y trietilamina (50 µl, 0,36 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo bajo Ar durante 1 h. A esta mezcla se le añadió una disolución del alcohol esteroideo, 50 mg (0.150 mmol) en 0,5 mL de benceno seco, y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. El reflujo continuó durante 3 h. Se eliminó completamente el benceno mediante evaporación a vacío, y el residuo restante se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla resultante se extrajo con una disolución acuosa de HCl del 5%, la capa orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> del 7% y finalmente con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice (eluyente; acetato de etilo/MeOH=100/2) para proporcionar 19 mg del conjugado 20 con un rendimiento del 20%. 20: <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,18 (s, 1H), 6,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,65 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,60 (s, 1H), 5,82 (s, 1H), 4,80 (1H, m), 4,21 (2H, m), 3,50 (m, 8H), 3,20 (1H, m), 2,80-1,30 (19H), 1,20 (s, 3H), 0,9 (s, 3H); [M+H]<sup>+</sup>=621.

## Ejemplo 7



Esquema 7

25 Se sintetizó la lactama 21 según Koutsourea et al (Steroids, 2003, 68(7-8):659-66).

22: En un matraz de fondo redondo se diluyeron 37 mg (0,12 mmol) del ácido en 0,4 mL de benceno seco. Se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (22 µl, 0,144 mmol) y trietilamina (40 µl, 0,288 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo bajo Ar durante 1 h. A esta mezcla se le añadió una disolución del alcohol esteroideo, 50 mg (0,120 mmol) en 0,4 mL de benceno seco, y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. El reflujo continuó durante 3 h. Se eliminó completamente el benceno mediante evaporación a vacío, y el residuo restante se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla resultante se extrajo con una disolución acuosa de HCl del 5%, la capa orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> del 7% y finalmente con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice (eluyente; acetato de etilo) para proporcionar 34 mg del conjugado 22 con un rendimiento del 40%. 22: <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,60 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,90 (s, 1H), 5,79 (s, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,15 (m, 2H), 3,5 (m, 8H), 3,25 (m, 1H), 2,8- 0,8 (22H); [M+H]<sup>+</sup>=605.

#### Ejemplo 8

Ensayo biológico *in vitro* e *in vivo* de la actividad antineoplásica

##### A) Actividad antineoplásica *in vitro*

Se trataron nueve líneas celulares de cáncer humano bien establecidas (tabla 1) para ensayar la actividad citostática y citotóxica producida por los compuestos recién sintetizados. Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en diferentes medios de cultivo según las instrucciones. El ensayo de MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un método bien establecido y estandarizado para determinar la actividad citostática y citotóxica de fármacos y productos químicos (Trafalis DT et al, J BUON, 2003, 8:333-9; Trafalis DT et al, J BUON, 2004, 9(3):275-82; Trafalis DT et al, J BUON, 2005, 10:227-34; Trafalis DT et al, Breast Cancer Res Treat, 2006, 97:17-31). Brevemente, las células se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de ~3 x10<sup>4</sup> células/ml por pocillo, y se mantuvieron durante 72 h a 37 °C en un incubador con un 5% de CO<sub>2</sub> y se cultivaron en forma de monocapas o suspensiones. Después de 24 horas, las células se trataron con 0,1-100 µmol/l de los compuestos durante 48 h. Se estimó la viabilidad de las células cultivadas con el ensayo metabólico de MTT (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) como se describió previamente. La absorbancia del colorante convertido se midió a una longitud de onda de 540 nm en un lector de ELISA (Versamax, Orleans, EE.UU.). Las concentraciones medias de cada fármaco que generaron una inhibición del crecimiento del 50% o inhibición total del crecimiento (100%) (GI50 y TGI, respectivamente), así como las concentraciones de fármaco que produjeron citotoxicidad contra el 50% de las células cultivadas [(concentración citotóxica semimáxima (IC50)] se calcularon mediante el uso del método de regresión lineal. Mediante el uso de siete medidas de absorbancia [tiempo 24 h (Ct24), crecimiento de control 72 h (Ct72), y crecimiento de ensayo en presencia de fármaco a cinco niveles de concentración (Tt72x)], se calculó el porcentaje de crecimiento a cada nivel de concentración de fármaco. Se calculó la inhibición del crecimiento en porcentaje según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) como: [(Tt72x)-(Ct24) / (Ct72)-(Ct24)] x 100 para concentraciones para las que Tt72x>Ct24 y [(Tt72x)-(Ct24)/Ct24] x 100 para concentraciones para las que Tt72x<Ct24; GI50 se calculó a partir de [(Tt72x)-(Ct24)/(Ct72)-(Ct24)] x 100=50, TGI a partir de [(Tt72x)-(Ct24)/(Ct72)-(Ct24)] x 100=0, e IC50 a partir de [(Tt72x)-(Ct24)/Ct24] x 100= 50. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 1

Tipo de Cáncer	Denominación de la línea celular humana	Oncogenes	Características especiales
Adenocarcinoma Ovárico	SK-OV-3 (SKOV-3)		Factor de Necrosis Tumoral; Toxina de la Difteria; Resistente a Cis-platino y Adriamicina
Adenocarcinoma Ovárico Epitelial	NIH:OVCAR-3		Positivo para receptor de Andrógenos/Estrógenos/Progesterona; Resistente a Adriamicina, Melfalano y Cisplatino
Carcinoma Ovárico	UWB1.289	p53 + BRCA1 - (mutado)	Negativo para receptor de Estrógenos/Progesterona
Carcinoma Ovárico	UWB1.289+BRCA1	p53 + BRCA1 +	Negativo para receptor de Estrógenos/Progesterona
Adenocarcinoma Epitelial de Mama	MCF7	WNT7B+	Positivo para receptor de estrógenos proteínas de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP) BP-2; BP-4; BP-5

Adenocarcinoma Epitelial de Mama	T-47D	WNT7B+	calcitonina; receptor de andrógenos, positivo; receptor de progesterona, positivo; glucocorticoide; prolactina; receptor de estrógenos, positivo
Adenocarcinoma de Próstata	PC-3		Resistente a hormonas
Leucemia linfoblástica T aguda	MOLT-4		Desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) expresada
Leucemia mielógena crónica	K-562		

Los resultados de los efectos citostáticos (GI50, TGI) y citotóxicos (IC50) *in vitro* inducidos mediante los compuestos ensayados contra las líneas celulares de cáncer humano se presentan en las tablas 2, 3, 4.

Tabla 2

LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO	Compuestos								
	pBCEAPOPA			ASE			22		
	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	20	76	>100	16	30	54	80	>100	>100
UWB1.289+BRCA1	>100	>100	>100	80	>100	>100	>100	>100	>100
OVCAR-3	56	92	>100	36	52	64	>100	>100	>100
SKOV-3	50	>100	>100	45	92	>100	>100	>100	>100
MCF-7	>100	>100	>100	29	57	96	>100	>100	>100
T-47D	95	>100	>100	22	47	92	85	>100	>100
PC-3	89	>100	>100	34	49	89	90	>100	>100
MOLT-4	31	75	>100	8	56	93	22	63	>100
K-562	46	91	>100	9	78	>100	36	94	>100

5

Tabla 3

LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO	Compuestos								
	18			20			6		
	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	13	42	70	9	36	76	6	20	44
UWB1.289+BRCA1	20	38	69	30	76	>100	18	66	88
OVCAR-3	20	47	70	54	82	>100	30	40	56
SKOV-3	24	46	68	42	78	>100	12	76	>100
MCF-7	21	46	79	25	68	>100	15	36	65
T-47D	14	32	72	26	59	98	10	30	55
PC-3	23	36	70	29	44	68	16	29	51
MOLT-4	5	38	76	11	46	85	5	28	50
K-562	6	38	87	13	49	90	5	30	50

Tabla 4

LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO	Compuestos								
	3			11			16		
	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50	GI50	TGI	IC50
UWB1.289	3	8	20	6	20	25	3	28	40
UWB1.289+BRCA1	12	25	40	22	31	42	12	32	50
OVCAR-3	21	32	42	8	18	22	9	20	35
SKOV-3	18	52	76	20	32	44	20	46	70
MCF-7	17	38	70	25	68	>100	15	36	65
T-47D	10	25	66	26	59	98	10	30	55
PC-3	22	30	56	29	44	68	16	29	51
MOLT-4	3	27	65	1,5	20	45	4	36	56
K-562	3	30	71	2	35	55	7	47	65

*B) Toxicidad aguda in vivo*

5 Para el tratamiento intraperitoneal (i.p.), se prepararon disoluciones de reserva de los compuestos ensayados inmediatamente antes del uso. Se suspendieron en aceite de maíz a la concentración deseada tras la disolución inicial en sulfóxido de dimetilo del 10% (DMSO). Esta concentración por sí misma no produjo un efecto tóxico observable.

Se usaron ratones C57Bl/6 hembra para los estudios de toxicidad. Los ratones se obtuvieron de la sección experimental del Instituto Pasteur griego.

10 Brevemente, se determinó la toxicidad aguda inducida mediante los compuestos ensayados, como se había descrito muy bien previamente (Catsoulacos P et al, Cancer Chemother Pharmacol, 1979, 3(1):67-70; Catsoulacos P et al, J Pharm Sci, 1978, 67(9):1342-3; Catsoulacos P et al, Anticancer Res, 1995; 15:827-30) tras una única inyección intraperitoneal (i.p.) en grupos de diez (10) ratones C57Bl/6 a cuatro dosis diferentes; los ratones se observaron durante 30 días, y se determinó la dosis terapéutica de los compuestos, que se define normalmente como LD10 (dosis letal para el 10% de los animales) así como la LD50 (dosis letal para el 50% de los animales) tras la estimación gráfica (curvas de 30 días). La toxicidad de los compuestos ensayados se estudió a partir de la letalidad en ratones C57Bl/6. Los valores de LD50 y LD10 se estimaron gráficamente, donde el porcentaje de muertes debidas a la toxicidad de cada dosis se mostró en el eje de ordenadas, mientras las dosis administradas se indicaron en el eje de abscisas (tabla 5).

*C) Actividad antitumoral in vivo*

20 El experimento se inició en el día 0 implantando de manera intraperitoneal (i.p.)  $10^6$  células ascíticas de leucemia linfocítica P388 según el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), EE.UU. Para el tratamiento i.p., se prepararon disoluciones de reserva de los compuestos ensayados inmediatamente antes del uso. La actividad antitumoral se estudió a partir del parámetro oncostático T/C%, que es el tiempo de supervivencia mediano (MST) de los animales tratados con fármaco (T) respecto de los controles tratados con solución salina (C). Según el NCI (EE.UU.), el criterio mínimo de actividad es un T/C mayor del 125 %. Además, se estimó la actividad antitumoral a partir del número de supervivientes a largo plazo (curas: definidas como los ratones vivos durante 90 días tras la inoculación del tumor) (Golidim A et al, Nat Cancer Inst Monogr, 1980, 55: 25-26; Monografía del NCI, publicación del NIH 1986, 55:80-193).

30 Se usaron ratones BALB/c scid hembra para la evaluación antitumoral. Estos animales portan la mutación de la deficiencia inmunitaria combinada grave (scid) en la cepa BALB/c, y se obtuvieron del Instituto de Biología del NCSR "Demokritos". Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad constante, en jaulas estériles, con agua y alimentos. Se incluyeron seis ratones en cada grupo de tratamiento y ocho en el grupo de control.

La dosis terapéutica ensayada de los compuestos se definió a la LD10 respectiva (mg/kg).

35 Tabla 5. Toxicidad aguda de los compuestos en C57Bl/6. LD50 y LD10 = dosis letales para el 50 % y 10% de la población de ratones tratados.

COMPUESTOS	LD50 (mg/kg)	LD10 (mg/kg)
pBCEAPOPA	20	15
ASE	50	30
3	150	130
6	100	80
18	110	85
20	135	110
22	-	>300
11	130	100
16	165	140

Tabla 6. Actividad antileucémica de los compuestos ensayados contra la leucemia linfocítica P388 murina *in vivo*.

Compuestos	Calendario de tratamiento	Dosis (LD10) (mg/kg)	MST ± DE (días)	T/C %	Curas
pBCEAPOPA	Día 1	15 (ip)	19	211*	0/6
ASE	Día 1	30 (ip)	24	267*	0/6
3	Día 1	130 (ip)	39	433*	0/6
6	Día 1	80 (ip)	36	400*	0/6
18	Día 1	85 (ip)	34	378*	0/6
20	Día 1	110 (ip)	32	356*	0/6
11	Día 1	100 (ip)	56	622*	1/6
16	Día 1	140 (ip)	44	489*	0/6
Controles	Día 1	Solución salina	9 ± 1,5	100	0/8

\*p<0,001

5 Se usaron ratones BALB/c scid hembra para la evaluación antitumoral *in vivo* de los compuestos ensayados contra el cáncer ovárico humano SCOV-3. Se inocularon de manera subcutánea suspensiones de  $3 \times 10^6$  células de cáncer SCOV-3 / 0,2 ml / ratón en el flanco derecho o izquierdo de cada animal. Los ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad constante, en jaulas estériles, con agua y alimentos. Se incluyeron diez ratones en cada grupo de tratamiento y de control. El ensayo se llevó a cabo según protocolos de laboratorio bien establecidos. La eficacia de los fármacos se determinó mediante el cambio medio del volumen tumoral de los animales tratados (T) respecto del control (C) ( $T/C\% = T1$ , Inhibición Tumoral), y mediante el incremento del tiempo de supervivencia mediano, según la cinética y las propiedades biológicas de las células tumorales. Los volúmenes o pesos de los tumores se calcularon como  $0,52 \times a^2 \times b$ , donde a y b son los ejes menor y mayor del tumor, y los datos se representaron en un gráfico semilogarítmico como los volúmenes tumorales medios ± error estándar de la media (±EEM) frente al tiempo tras el tratamiento. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 0,085-0,1 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en grupos de control y de tratamiento con fármaco (10 ratones/grupo), con volúmenes tumorales medios similares en cada grupo. Los compuestos ensayados se administraron i.p. a dosis de LD10/4 respectivamente en los días 1, 5 y 9.

20 Para la evaluación del efecto antitumoral, se determinó (a) el cambio semanal en el peso tumoral medio o el volumen tumoral medio, y se calculó la inhibición tumoral (TI) mediante la fórmula:  $TI(\%) = [1 - (TWT)TWZ] / (TWC)TWZ] \times 100$ , en la que TWT se determina como el peso tumoral (mg) o el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) en los animales tratados en el momento de la evaluación, TWZ se determina como el peso tumoral (mg) o el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) en el momento de inicio del tratamiento (tiempo cero o día 1), TWC se determina como el peso tumoral (mg) o el volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) en los animales sin tratar (controles) en el momento de la evaluación, (b) el porcentaje de supervivientes (OS%) en el Día 70, (c) el porcentaje de supervivientes libres de progresión tumoral (PFS%) en el día 70. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antitumoral de los compuestos ensayados contra cáncer ovárico humano SCOV-3 *in vivo*.

Compuestos	Calendario de tratamiento	Dosis (LD10/4) (mg/kg)	TI% en el Día 35	OS% en el Día 70	PFS% en el Día 70
pBCEAPOPA	Días 1,5,9	4 (ip)	17	40	0
ASE	Días 1,5,9	8 (ip)	34	80	40
3	Días 1,5,9	32 (ip)	62	100	100
6	Días 1,5,9	20 (ip)	56	100	100
18	Días 1,5,9	21 (ip)	44	100	80
20	Días 1,5,9	28 (ip)	41	100	70
11	Días 1,5,9	25 (ip)	73	100	100
16	Días 1,5,9	37 (ip)	55	100	100
Controles	Días 1,5,9	Solución salina	0	0	0

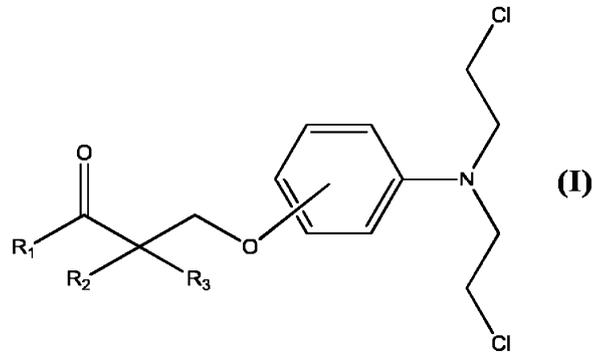
Todas las diferencias en TI%, OS%, PFS% son significativas a niveles de  $p < 0,05-0,001$

#### D) Efectos Farmacológicos

5 Los nuevos agentes alquilantes esteroideos lactámicos inducen un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP1/2) que muestra concentraciones inhibitorias semimáximas (IC50) menores de 1,7  $\mu\text{M}$ , mejores que el inhibidor conocido de PARP1/2, 3-aminobenzamida (3-AB). Además, los nuevos agentes alquilantes esteroideos lactámicos producen cambios significativos sobre la transcripción y expresión de mRNA de PARP1 y PARP2 de manera dependiente de la dosis y el tiempo, *in vitro* e *in vivo*. A las primeras dosis o a dosis inferiores, pueden inducir un incremento de la expresión de mRNA de PARP1 y PARP2 que alcanza valores 5-400 veces mayores que los valores de control, lo que genera cambios sobre las concentraciones intracelulares de NAD<sup>+</sup> y el agotamiento del ATP celular, y más tarde o en dosis mayores inducen una disminución de la expresión de mRNA de PARP1 y PARP2 que puede alcanzar un valor cercano al 100%. Los nuevos agentes alquilantes esteroideos lactámicos producen un daño significativo en el ADN comparable al inducido por su componente alquilante solo, como se determinó *in vitro* mediante un ensayo de intercambios de cromátidas hermanas (SCE's) e *in vivo* produciendo aductos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en suero u orina, a la vez que generan una actividad antitumoral significativamente mayor. Además, los nuevos agentes alquilantes esteroideos lactámicos inhiben significativamente (>60%) la fosforilación de ERK1/2 y AKT1/2, y por lo tanto la activación de las rutas de señalización molecular PI3K y MAPK. Por primera vez se investigaron en profundidad los efectos farmacológicos moleculares de los agentes alquilantes esteroideos lactámicos.

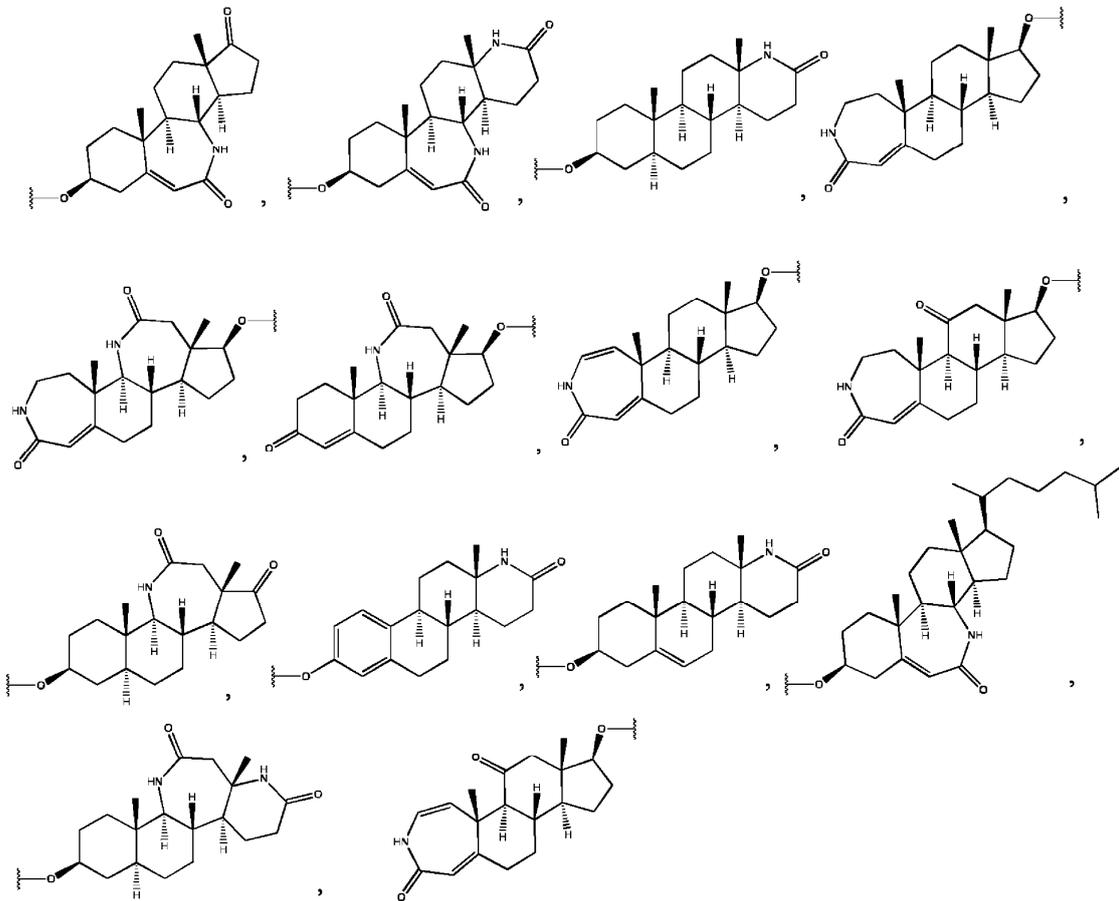
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

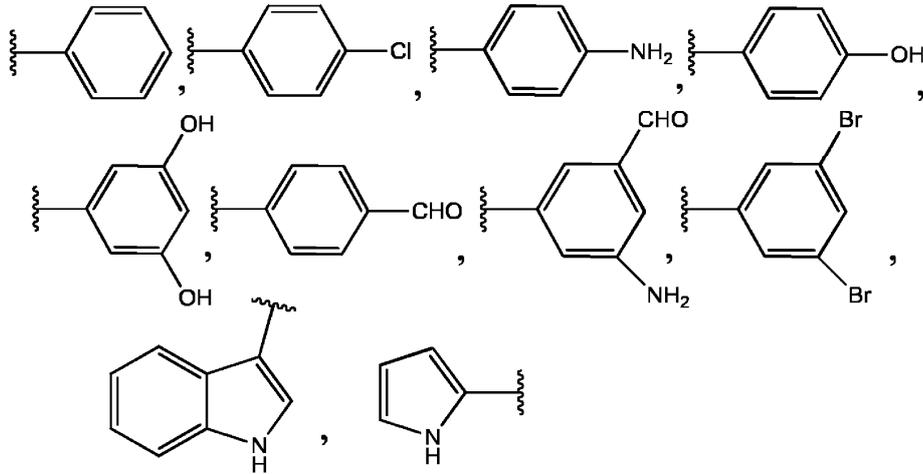


en la que

- 5 R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en

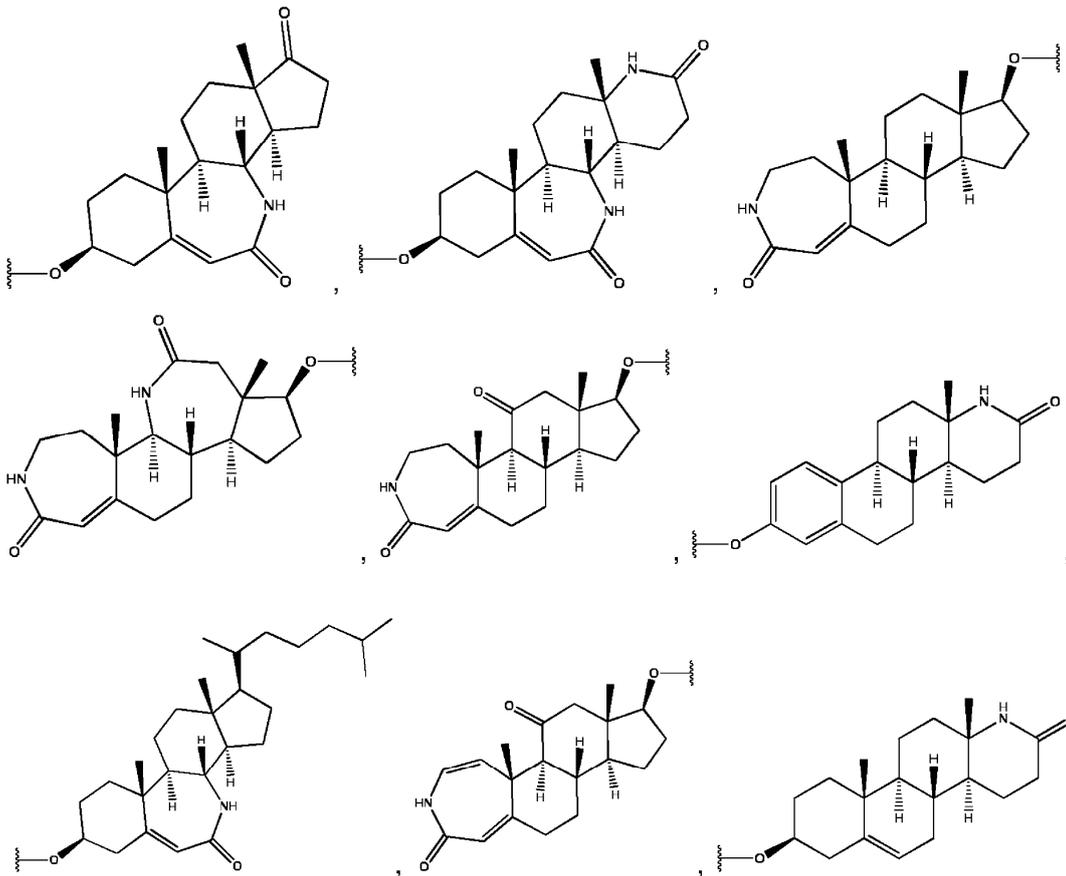


R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



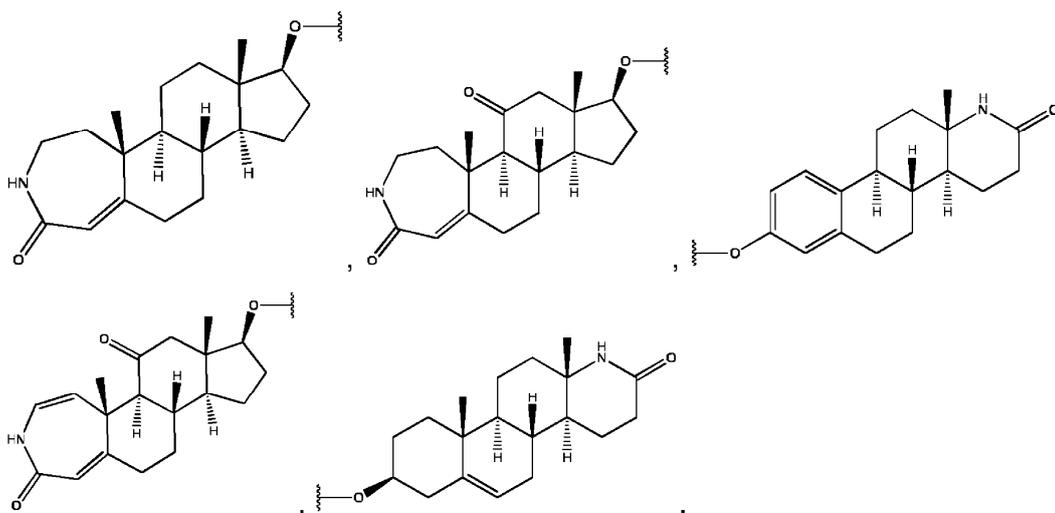
R<sub>3</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -OH, -NH<sub>2</sub>.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en

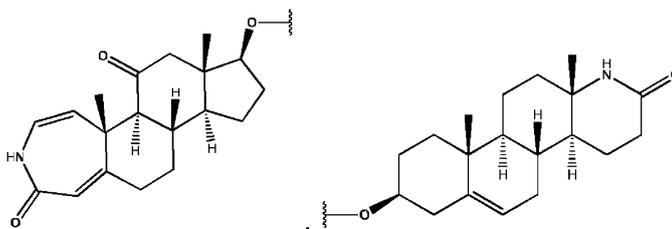


5

3. Un compuesto según la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en



4. Un compuesto según la reivindicación 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en



5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en H, -CH<sub>3</sub>, -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.
6. Un compuesto según la reivindicación 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>2</sub> es H.
7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>3</sub> es H.
10. 8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>3</sub> es -NH<sub>2</sub>.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en medicina.
10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento del cáncer.
15. 11. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento del cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de próstata o la leucemia.
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.