



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 190 348**

②① Número de solicitud: 200101747

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C07J 41/00

A61P 35/00

①②

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **19.07.2001**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.07.2003**

⑦① Solicitante/s: **Universidade da Coruña  
O.T.R.I./Escuela de Caminos-  
Campus de Elviña, s/n  
15071 A Coruña, ES**

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

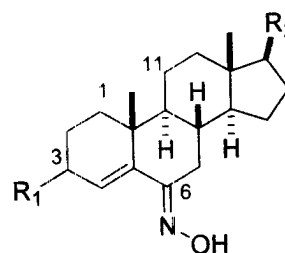
⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Nuevos 6E-hidroximoesteroides: su procedimiento de obtención mediante síntesis a partir de esteroides comerciales, y su aplicación como agentes citotóxicos.**

⑤⑦ Resumen:

Nuevos 6E-hidroximoesteroides: su procedimiento de obtención mediante síntesis a partir de esteroides comerciales, y su aplicación como agentes citotóxicos. Nuevos 6E-hidroximoesteroides con fórmula (I), Preparación y uso como agentes citotóxicos, en donde R<sub>1</sub> es ceto, R<sub>2</sub> cadena lateral tipo colesterol en la cara β(1); R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es la cadena lateral tipo sitoesterol en la cara β(2); R<sub>1</sub> es ceto, R<sub>2</sub> es la cadena lateral tipo gorgosterol en la cara β: (3); R<sub>1</sub> es ceto, R<sub>2</sub> es H (4); R<sub>1</sub> β-OH, R<sub>2</sub> cadena lateral tipo colesterol en la cara β: (5); R<sub>1</sub> es β-OH, R<sub>2</sub> cadena tipo sitoesterol en la cara β: (6); R<sub>1</sub> β-OH, R<sub>2</sub> cadena lateral presente en gorgosterol en la cara β (7); R<sub>1</sub> es β-OH, R<sub>2</sub>H:(8).

La obtención comprende: formación de 3-acetyloxi-5, 6-epoxiderivados; oxidación para formar un 5-hidroxi-6-cetoderivado; eliminación de hidroxilo en 5 para la formación Δ<sup>4,5</sup>, síntesis de la oxima E en 6, (5-8) y oxidación (1-4). Utilización de estos compuestos como agentes citotóxicos y como anticancerosos.



ES 2 190 348 A1

## DESCRIPCION

Nuevos 6*E*-Hidroximoesteroides: su procedimiento de obtención mediante síntesis a partir de esteroides comerciales y su aplicación como agentes citotóxicos.

5

**Objeto de la invención**

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

10

**Estado de la técnica anterior a la invención**

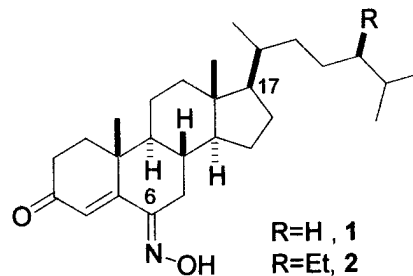
15

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

20

25

30



35

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

40

**Descripción**

45

De particular interés en el campo de esta invención y de los esteroides es la Preparación de los 6*E*-hidroximinoesteroides 1 y 2, y de una manera especial análogos que puedan incrementar la actividad citotóxica frente a las líneas tumorales P-388 (linfoma de ratón), A-549 (carcinoma de pulmón humano), HT-29 (carcinoma de colon humano) y MEL-28 (melanoma humano) tal como se describirá en las reivindicaciones.

50

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

55

60

Los compuestos se caracterizan por una fórmula general I



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

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

20 Esta invención describe la síntesis y la utilización como agentes citotóxicos de varios compuestos con las siguientes estructuras:

$R_1$  es un grupo ceto,  $R_2$  es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 1.

25  $R_1$  es un grupo ceto,  $R_2$  es la cadena lateral presente en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 2.

$R_1$  es un grupo ceto,  $R_2$  es la cadena lateral presente en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 3.

30  $R_1$  es un grupo ceto,  $R_2$  es H: Compuesto 4.

$R_1$  es  $\beta$ -OH,  $R_2$  es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 5.

35  $R_1$  es  $\beta$ -OH,  $R_2$  es la cadena lateral presente en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 6.

40  $R_1$  es  $\beta$ -OH,  $R_2$  es la cadena lateral presente en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} situada en la cara  $\beta$ : Compuesto 7.

$R_1$  es un  $\beta$ -OH,  $R_2$  es H: Compuesto 8.

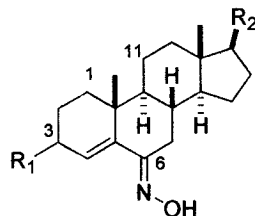
45

50

55

60

5



10

COMPUESTO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Nombre
1			6E-hidroximino-4-colesten-3-ona
2			6E-hidroximino-24-etilcolest-4-en-3-ona
3			6E-hidroximinogorgost-4-en-3-ona
4		H	6E-hidroximino-4-androsten-3-ona
5	$\beta$ -OH		3 $\beta$ -hidroxi-6E-hidroximino-4-colesteno
6	$\beta$ -OH		3 $\beta$ -hidroxi-6E-hidroximino-24-etilcolest-4-en-3-ona
7	$\beta$ -OH		3 $\beta$ -hidroxi-6E-hidroximinogorgost-4-en-3-ona
8	$\beta$ -OH	H	6E-hidroximino-4-androsten-3 $\beta$ -ol

15

20

25

30

35

40

Los compuestos 1-8 se sintetizan mediante una ruta general tal como se muestra en el esquema 1.

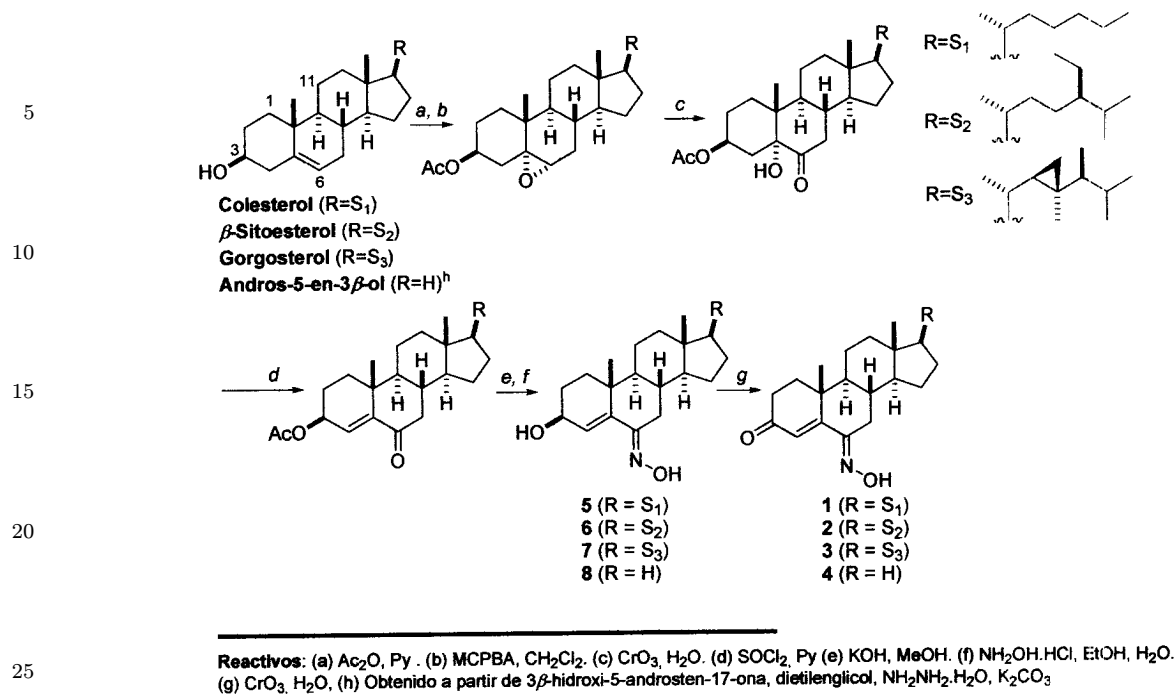
45

(Sigue en la página siguiente)

50

55

60



Esquema 1

30 Esta ruta se basa en una metodología puesta a punto por Holland y colaboradores<sup>4</sup> y que se aplica por primera vez tanto a la síntesis de 6*E*-hidroximino esteroides naturales como a análogos de estos. La Preparación de 1-8 se inició con los compuestos comerciales colesterol,  $\beta$ -sitoesterol, gorgosterol, aislado del coral blando *Sarcophyton* sp., y andros-5-en-3 $\beta$ -ol preparado por reducción de Wolf-Kishner a partir de la 3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona. Después de la protección del grupo hidroxilo en la posición 3 como acetato (paso a del Esquema), se epoxida la posición 5-6 con el tratamiento con ácido *m*-cloroperbenzoico en diclorometano (paso b). La siguiente etapa sintética consistió en la oxidación del epóxido que se llevó a cabo por reacción de éste con trióxido de cromo acuoso en etil, metil cetona (paso c), obteniéndose un  $\alpha$ -hidroxicetona que se convirtió en la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada por eliminación del alcohol terciario con cloruro de tionilo en piridina (paso d). La desprotección en medio básico metanólico del grupo hidroxilo en C-3 y la hidroximinación con clorhidrato de hidroxilamina (pasos e y f) da lugar a los 3 $\beta$ -hidroxi-6*E*-hidroximinoesteroides 1-4, los cuales se convierten en los 3-ceto derivados 5-8 por oxidación con trióxido de cromo acuoso (paso g). Este Esquema sintético se realiza en 7 etapas sintéticas con un rendimiento global medio del 12%.

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

50

55

60

TABLA 1

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

5

	<i>Compuesto</i>	<i>P-388</i>	<i>A-549</i>	<i>HT-29</i>	<i>MEL-28</i>
	<b>1</b>	1.25	1.25	1.25	2.5
10	<b>2</b>	10	10	10	10
	<b>3</b>	5	5	5	5
	<b>4</b>	5	5	5	5
15	<b>5</b>	10	10	10	10
	<b>7</b>	10	10	10	10

**Método de realización de la invención**

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

## Ejemplo 1

25 *Síntesis de 3 $\beta$ -hidroxi-6 $\underline{E}$ -hidroximino-4-colesteno (Compuesto 5) y 6 $\underline{E}$ -hidroximino-4-colesten-3-ona (Compuesto 1). Los pares Compuestos 6/2, Compuestos 7/3, Compuestos 4/8 se sintetizan de una manera análoga*

30 *Pasos a-b del Esquema 1*

Se disuelven 0.5 g (0.3 mmol) de colesterol en 10 mL de una mezcla anhídrido acético-piridina (1:1) y se deja reaccionando a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas. Se elimina a presión reducida el disolvente de la reacción y el sólido resultante se redisuelve con 20 mL de EtOAc, se lava con 20 mL de disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mL de HCl (5%) y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (8:2), recogiendo 0.52 g de 3 $\beta$ -acetoxi-5-colesteno, sólido blanco, 94%. 0.58 g. (3.36 mmol) de ácido metacloroperbenzoico se disuelven en 20 mL de cloroformo y se mantienen con agitación en baño de hielo. Sobre la anterior disolución se añaden, gota a gota, 0.51 g (1.19 mmol) de 3 $\beta$ -acetoxi-5-colestano preparado anteriormente disueltos en 20 mL de cloroformo; concluida la adición se lleva la reacción a temperatura ambiente y se deja reaccionando durante 20 horas. Se vierte la reacción sobre 100 mL de disolución  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (5%), en baño de hielo-agua, y pasadas 6 horas se realizan dos extracciones con 20 mL de cloroformo, se lavan con 50 mL de agua y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Tras filtrar y eliminar a presión reducida el disolvente se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (8:2), recogiendo 0.51 g de mezcla de dos diastereoisómeros de 3 $\beta$ -acetoxi-5, 6-epoxi-colestano en relación (2:1), sólido blanco, 96%. Esta mezcla se utiliza tal cual en el paso siguiente de la síntesis.

35 *Pasos c-f del Esquema 1*

50 Se disuelven 0.50 g (1.12 mmol) de 3 $\beta$ -acetoxi-5, 6-epoxi-colestano en 20 mL de etilmetilcetona y se mantienen en baño de hielo con agitación. Se adicionan gota a gota sobre la anterior disolución 0.4 g (4.0 mmol) de trióxido de cromo disueltos en 1.2 mL de agua y tras 10 minutos se lleva la reacción a temperatura ambiente. En estas condiciones se repite otra adición igual a la anterior y después de otros 10 minutos se vierte la reacción sobre 90 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , formándose un precipitado que es filtrado a vacío, lavado con abundante agua (hasta que no queden restos de cromo), secado y purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano:EtOAc (7:3), recogiendo 0.47 g de 3 $\beta$ -acetoxi-5 $\alpha$ -hidroxi-colestan-6-ona, sólido blanco, 90%.

60 Se disuelven 0.46 g (1 mmol) de 3 $\beta$ -acetoxi-5 $\alpha$ -hidroxi-colestan-6-ona de la anterior reacción en 15 mL de piridina seca, dejándose la mezcla en baño de hielo y con agitación. Sobre la anterior disolución se adiciona, gota a gota, 0.36 mL (4.93 mmol) de cloruro de tionilo y dejando la reacción a evolución durante 45 minutos. La disolución resultante se vierte sobre 80 mL de agua formándose un precipitado, que es

extraído dos veces con 30 mL de acetato de etilo, lavado tres veces con 20 ml de HCl (5 %), una vez con 20 mL de disolución saturada de NaCl y secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida, se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica “flash” de silicagel con Hexano:EtOAc (8:2), recogiénose 0.41 g de 3β-acetoxi-4-colesten-6-ona, sólido blanco, 92 %.

Sobre 0.4 g (0.9 mmol) de 3β-acetoxi-4-colesten-6-ona se añaden 18 mL de disolución al 10 % de KOH:MeOH, dejando todo reaccionar con agitación y bajo atmósfera de Argon a temperatura ambiente durante 1 hora. Eliminado a presión reducida la mitad del disolvente y vertida la reacción sobre un baño de agua-hielo, se forma un precipitado que es extraído dos veces con 20 mL de acetato de etilo, lavado dos veces con 20 mL de disolución saturada de NaCl y secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Tras filtrar y eliminar todo el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido, que es purificado mediante una columna cromatográfica “flash” de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3), recogiénose 0.3 g de 3β-hidroxi-4-colesten-6-ona sólido blanco, 82 %.

Se disuelven 0.29 g (0.65 mmol) de 3β-hidroxi-4-colesten-6-ona en 15 mL de etanol absoluto, sobre los que se añaden una disolución de 0.34 g (4.89 mmol) de hidrocloreuro de hidroxilamina en 4 mL de una disolución de EtOH:H<sub>2</sub>O (50 %). A la anterior mezcla se adiciona una disolución de 0.4 g (2.94 mmol) de acetato sódico trihidratado en 8 mL de una disolución de EtOH:H<sub>2</sub>O (50 %). Queda todo reaccionando a temperatura ambiente durante 24 horas. Se elimina el etanol a presión reducida, y el resto de la reacción se extrae con 40 mL de una mezcla EtOAc: H<sub>2</sub>O(50 %). Secado el extracto orgánico sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y eliminado el disolvente a presión reducida, se obtiene un sólido que es purificado a través de una columna cromatográfica “flash” de silicagel con Hexano: EtOAc [(8:2), (7:3), (1:1)]. Se obtuvieron 0.29 g de 3β-hidroxi-6E-hidroximino-4-colesteno (7), sólido amarillo, 96 %.

#### Paso g del Esquema 1

Sobre 0.17 g (1.7 mmol) de trióxido de cromo, en baño de hielo, se añaden 1.8 mL de piridina, dejándose la mezcla con agitación durante 20 minutos. Sobre la anterior disolución se adicionan, gota a gota, 58 mg de 3β-hidroxi-6E-hidroximino-4-colesteno (7) disueltos en 2 mL de piridina. La reacción se deja evolucionar a temperatura ambiente reaccionando durante 1 hora. Se vierten 15 mL de EtOAc, se filtra el residuo sólido y los extractos orgánicos se lavan con disolución de HCl (10 %), disolución de NaHCO<sub>3</sub> (10 %), disolución saturada de NaCl, secándose finalmente sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Tras eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido que es purificado mediante una columna cromatográfica “flash” de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3), recogiénose 51 mg 6E-hidroximinocolest-4-en-3-ona (1), sólido amarillo, 88 %.

#### 6E-hidroximino-4-colesten-3-ona (Compuesto 1):

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.71 (OH, 1H, s a); 6.54 (H-4, 1H, s); 3.43 (H-7β, 1H, dd, J = 3.7 Hz and 16.0 Hz); 2.54 (H-2, 2H, m); 2.04 (H-1, 2H, m); 1.19 (H-19, 3H, s); 0.91 (H-21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.86 (H-26, H-27, 6H, d, J = 6.8 Hz); 0.70 (H-18, 3H, s). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 201.6 (C-3, s); 162.8 (C-5, s); 155.3 (C-6, s); 122.4 (C-4, d); 56.5 (C-14, s); 55.9 (C-17, d); 51.0 (C-9, d); 42.4 (C-13, s); 39.4 (C-24, t); 39.3 (C-12, t); 38.6 (C-10, s); 36.0 (C-22, t); 35.6 (C-20, d); 34.7 (C-1, t); 33.5 (C-2, t); 32.5 (C-8, d); 29.5 (C-7, t); 28.1 (C-16, t); 28.0 (C-25, q); 24.0 (C-15, t); 23.7 (C-23, t); 22.8 (C-26, q); 22.5 (C-27, q); 20.8 (C-11, t); 18.6 (C-21, q); 16.5 (C-19, q); 11.9 (C-18, q). EIMS (70 eV, m/z %): 413 (M, 21); 396 (M - OH, 42); 370 (M - NOH - H<sub>2</sub>O, 100).

#### 6E-Hidroximino-24-etileolest-4-en-3-ona (Compuesto 2)

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ<sub>H</sub>: 10.43 (OH, 1H, br s); 6.43 (H-4, 1H, s); 3.42 (H-7β, 1H, dd, J = 3.7 Hz and 16.0 Hz); 2.53 (H-2, 2H, m); 2.05 (H-1, 2H, m); 1.13 (H-19, 3H, s); 0.93 (H-21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.86 (H-29, 3H, t, d, J = 6.6 Hz); 0.84/0.81 (H-26, H-27, 6H, d, J= 6.6 Hz); 0.70 (H-18, 3H, s). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ<sub>C</sub>: 201.0 (C-3, s); 162.3 (C-5, s); 156.0 (C-6, s); 122.6 (C-4,d); 56.6 (C-14, s); 55.9 (C-17,d); 51.2 (C-9,d); 46.1 (C-24, t); 42.5 (C-13,s); 39.3 (C-12,t); 38.7 (C-10,s); 36.2 (C-20,d); 34.8 (C-1,t); 33.8 (C-22,t); 33.6 (C-2, t); 32.7 (C-8, d); 29.6 (C-7, t); 29.0 (C-25, q); 28.1 (C-16, t); 26.4 (C-23, t); 24.0 (C-15, t); 23.1 (C-28, t); 20.8 (C-11, t); 19.0 (C-26, q); 19.6 (C-27, q); 18.7 (C-21, q); 16.6 (C-19, q); 12.3 (C-29, q); 12.0 (C-18, q). EIMS 70 eV, m/z %): 441 (M, 17); 425 (M - OH, 23); 399 (M - NOH - H<sub>2</sub>O, 78).

6E-Hidroximino-4-en-3-ona (Compuesto 3)

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.36 (H-4, 1H, s); 3.43 (H-7β, 1H, dd, *J* = 3.9 Hz, and 11.2 Hz); 2.48 (H-2, 2H, m); 2.07 (H-2, 2H); 1.14 (H-19, 3H, s); 0.94 (H-21, 3H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.88 (H-26, H-27, 6H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.77 (H-30, 3H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.71 (H-18, 3H, s); 0.46 (H-28, 1H, m); 0.21 (H-22, 1H, m); -0.12 (H-28, 1H, m). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 200.6 (C-3, s); 161.9 (C-6, s); 156.4 (C-5, s); 122.8 (C-4, d); 56.5; 55.8; 51.3; 42.5; 39.2; 39.0; 38.8; 36.1; 34.8; 33.7; 33.6; 32.8; 32.0; 31.4; 30.5; 29.6; 29.3; 28.0; 24.0; 20.8; 20.5 (C-26, q); 18.8 (C-21, q); 17.6 (C-29, q); 16.6 (C-19, q); 15.4; 11.9 (C-18, q). EIMS (70 eV, *m/z*%): 453 (M, 3); 410 (M - NOH H<sub>2</sub>O, 13).

## Ejemplo 2

Síntesis de 6E - hidroximino - 4 - androsten - 3 - β - ol (Compuesto 8) y 6E - hidroximino - 4 - androsten - 3 - ona (Compuesto 4)

## Esquema 2 Paso a

Se disuelven 0.2 g (1.45 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 0.5 g (1.73 mmol) de 3β-hidroxi-5-androsten-17-ona en 15 mL de dietilenglicol. Sobre la anterior mezcla y con agitación se añaden 0.4 mL, (8.25 mmol) de monohidrato de hidrazina. Se eleva la temperatura a 125° dejando refluir durante 5 horas. El exceso de monohidrato de hidrazina (que queda por reaccionar) es eliminado por destilación. La temperatura de la reacción se incrementa hasta 200° y se mantiene refluendo 15 horas más. Se deja enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y sobre ella se vierten 100 mL de agua, precipitando un sólido blanco que es extraído 3 veces con 40 mL de éter, lavado dos veces con 40 mL de agua y secado sobre sulfato sódico anhídrido. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida se obtiene un sólido blanco, que es purificado mediante una columna cromatográfica "flash" de silicagel con Hexano: EtOAc (7:3) recogiendo 0.32 g de 5-androsten-3β-ol, sólido blanco, 63%. Este compuesto se sometió a los pasos a-f del esquema 1, para obtener el Compuesto 8, y este se hizo reaccionar bajo las condiciones de oxidación del paso g del esquema 1 para obtener el Compuesto 4.

6E-Hidroximino-4-androsten-3-ona (Compuesto 4) RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ(ppm): 6.50 (H4, 1H, s); 3.45 (H7α, 1H, dd, *J*= 0.8 Hz y 11.8 Hz); 2.48(H2, 2H, m); 2.10 (H1, 2H, m); 1.15 (H18, 3H, s); 0.75 (H19, 3H, s). RMN-<sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ(ppm): 201.3; 162.2; 155.5; 122.5; 547; 51.4; 40.7; 40.0; 38.8; 38.1; 34.8; 33.6; 33.0; 30.0; 25.3; 20.9; 20.4; 17.3; 16.5. EIMS (70 eV, *m/z*% ): 301 (M<sup>+</sup>, 12.60); 284 (M<sup>+</sup>-OH, 18.75); 270 (M<sup>+</sup>-NOH, 25.31); 258 (M<sup>+</sup>-NOH-H<sub>2</sub>O, 77.80).

Análisis Elemental

Compuesto	FM	Encontrado			Calculado		
		C	H	N	C	H	N
1	C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	78.30	10.68	3.28	78.40	10.48	3.39
2	C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>2</sub>	78.56	10.96	2.98	78.86	10.73	3.17
3	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>2</sub>	79.10	10.38	3.02	79.42	10.44	3.09
4	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>	75.30	9.10	4.76	75.71	9.03	4.65
6	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>2</sub>	78.02	10.98	3.30	78.02	10.91	3.37
7	C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>2</sub>	79.00	11.01	3.50	78.50	11.13	3.16
8	C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>2</sub>	79.34	10.89	2.99	79.07	10.84	3.07

## Referencias

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



## ES 2 190 348 A1

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

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

5 4 Holland, H. L.; Kumaresan, S.; Tan, L.; Njar, V.C.O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* 1992, 585-587.

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

10

15

20

25

30

35

40

45

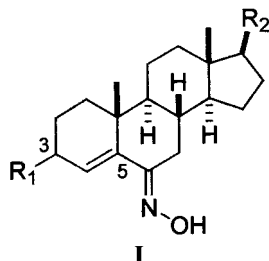
50

55

60

## REIVINDICACIONES

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



En donde R<sub>1</sub> puede ser hidrógeno, hidroxilo, ceto, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub>) lineal o ramificado.

R<sub>2</sub> puede ser hidrógeno, hidroxilo, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub>) lineal o ramificado.

2. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 1.

3. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 2.

4. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} situada en la cara β: Compuesto 3.

5. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es H: Compuesto 4.

6. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es β-OH, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 5.

7. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es β-OH, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] situada en la cara β: Compuesto 6.

8. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es β-OH, R<sub>2</sub> es la cadena lateral presente en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} situada en la cara β: Compuesto 7.

9. Un 6*E*-Hidroximinoesteroide, según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto, R<sub>2</sub> es H: Compuesto 8.

10. Procedimiento general de obtención de los 6*E*-hidroximinoesteroides en donde R<sub>1</sub> es β-OH y R<sub>2</sub> puede ser H (Compuesto 8) ó la cadena lateral situada en la cara β presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] (Compuesto 5) ó en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] (Compuesto 7) ó en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} (Compuesto 8), según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> y 9<sup>a</sup>. Este se realiza por acetilación del esteroide-producto de partida (5-androsten-3β-ol-para 8; colesterol -para 5, sitoesterol -para 6; gorgosterol -para 7), epoxidación en la posición 5-6; oxidación del epóxido a α-hidroxicetona, eliminación del grupo hidroxilo para obtenerse la γ-acetiloxi-cetona α,β-insaturada seguido de hidroximinación de la cetona con la posterior eliminación del grupo acetato en la posición 3.

11. Procedimiento general de obtención de los 6*E*-Hidroximinoesteroides en donde R<sub>1</sub> es un grupo ceto y R<sub>2</sub> puede ser H (Compuesto 4) ó la cadena lateral situada en la cara β presente en colesterol [(1*R*)-1,5-dimetilhexil] (Compuesto 1) ó en sitoesterol [(1*R*,4*R*)-4-etil-1,5-dimetilhexil] (Compuesto 2) ó en gorgosterol {(1*S*)-[(1*R*,2*R*)-2-[(1*R*)-1,2-dimetilpropil]-2-metilciclopropil]etil} (Compuesto 3) según las reivindicaciones 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>. Este se realiza por oxidación del grupo hidroxilo en tres de los compuestos preparados según la reivindicación 10<sup>a</sup>.

## ES 2 190 348 A1

12. El uso de un 6*E*-hidroximinoesteroide sintetizado según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 11<sup>a</sup> para preparar un medicamento actividad citotóxica.

13. El uso de un 6*E*-hidroximinoesteroide preparado según las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 11<sup>a</sup> en una  
5 cantidad eficaz adecuada para preparar un medicamento anticanceroso.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C07J 41/00, A61P 35/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RODRÍGUEZ, JAIME y col. Isolation and synthesis of the first natural 6-hydroximino-4-en-3-one-steroids from the sponges <i>Cinachyrella</i> spp. <i>Tetrahedron Letters</i> , 1997, Vol. 38, N° 10, páginas 1833-1836, ISSN 0040-4039. Compuestos con RN 188968-44-7 y 188968-43-6.	1-3,10,11
X	KOVGANKO, N.V. y col. Synthesis of oximes of stigmastane 5beta-hydroxy-6-ketosteroids. <i>Chemistry of Natural Compounds (Translation of Khimiya Prirodnikh Soedinenii)</i> , 2001, Vol. 37, N° 3, páginas 256-258, ISSN 0009-3130. Compuesto con RN 188968-43-6.	1,3,10,11
X	KOVGANKO, N.V. y col. Novel synthesis of (24R,6E)-24-ethylcholest-6-hydroxyimino-4-en-3-one, a steroidal oxime from <i>Cinachyrella</i> spp. sponges. <i>Chemistry of Natural Compounds (Translation of Khimiya Prirodnikh Soedinenii)</i> , 2000, Vol. 36, N° 2, páginas 189-191, ISSN 0009-3130. Compuesto con RN 188968-43-6.	1,3,10,11
X	DUDDECK, HELMUT y col. Synthesis and spectroscopic characterization of dimeric steroidal oximes. <i>Liebigs Annalen der Chemie</i> , 1992, Vol. 7, páginas 715-18, ISSN 0170-2041. Compuesto con RN 110556-49-5.	1,6
X	ANASTASIA, MARIO y col. Beckmann rearrangement of gamma4-6-hydroxyimino steroids. <i>Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry (1972-1999)</i> , (1986), Vol. 12, páginas 2123-6, ISSN 0300-922X. Compuesto con RN 110556-49-5.	1,6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

24.04.2003

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C07J 41/00, A61P 35/00

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GERVAIS, MIREILLE; TAN, LIAT. 6-Hydroximinoandrostenedione, a new specific inhibitor of estrogen biosynthesis and its effect on T47D human breast cancer cells. Anticancer Research, 1993, Vol. 13, N° 2, páginas 383-8, ISSN 0250-7005. Compuesto con RN 140421-64-3; página 384; figura 1; compuesto 5.	1,12,13
X	NJAR, VINCENT C.O. y col. Synthesis of 6alpha,7alpha- and 6beta,7beta-aziridinoandrost-4-ene-3,17-diones and related compounds: potential aromatase inhibitors. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry, (1995), (8), 985-91, ISSN: 0300-922X. Compuesto con RN 140421-63-2; página 985; esquema 1; compuesto 2.	1,12,13
X	SIGINOME, HIROSHI y col. Photoinduced molecular transformations. Part 149. Stereospecific photoadditions and photorearrangements of the oximes of some steroidal alpha,beta-unsaturated cyclic ketones and their deuterio derivatives. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry, (1994), (21), 3239-50, ISSN: 0300-922X. Compuesto con RN 110612-22-1; página 3241; compuesto 32.	1

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

24.04.2003

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

2/2