

INHIBIDORES IRREVERSIBLES DE 17BETA-HSD1

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud de patente reivindica los beneficios de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/519.779 titulada "INHIBIDORES IRREVERSIBLES DE 17BETA-HSD1", y presentada en la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Estados Unidos el 15 de agosto de 2023, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a la inhibición de 17 β -HSD1. En particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I) y composiciones que comprenden los mismos, que proporcionan un efecto inhibidor potente, no estrogénico e irreversible sobre 17 β -HSD1. La invención proporciona además métodos y usos terapéuticos basados en los nuevos compuestos y composiciones.

ANTECEDENTES

Estradiol (E2) se produce en mujeres premenopáusicas principalmente en los ovarios. Alcanza los tejidos diana mediante la ruta endocrina, donde ejerce su efecto mediante interacción con el receptor de estrógenos (ER) α . Tras la menopausia, el nivel de E2 en plasma disminuye hasta 1/10 del nivel de E2 en mujeres premenopáusicas. Después, E2 se produce principalmente en el tejido periférico, tal como tejido de mama, endometrio, tejido adiposo, piel a partir de precursores inactivos, etc. Estas reacciones tienen lugar con la participación de diversas enzimas esteroidogénicas (hidroxiesteroide deshidrogenasas, aromatasas), en el tejido periférico, donde los estrógenos activos ejercen su efecto. Como consecuencia de este mecanismo intracrino para la formación de E2, su concentración en el tejido periférico, especialmente en enfermedades dependientes de estrógenos, es mayor que en tejido sano. En particular, el crecimiento de muchas líneas celulares cancerosas se ve estimulado por una concentración de E2 localmente aumentada. Además, la aparición y progresión de enfermedades tales como endometriosis, leiomiomas, adenomiosis, menorragia, metrorragia y dismenorrea depende de un nivel de E2 significativamente aumentado en tejido correspondientemente enfermo. La endometriosis es una enfermedad dependiente de estrógenos que afecta a aproximadamente el 5-10 % de todas las mujeres en edad de procrear, padeciendo el 35 - 50 % de las mujeres dolor abdominal en la observación. La esterilidad tiene signos de endometriosis. Esta enfermedad se define como tejido estromal y glandular endometrial ectópico demostrado mediante histología. Esta enfermedad crónica,

que es propensa a recidivas, conduce a dolor de intensidad variable y carácter variable así como posiblemente a esterilidad si se da una forma correspondiente. Se distinguen tres estados macroscópicos: endometriosis peritoneal, endometriosis infiltrante profunda retroperitoneal que incluye adenomiosis uterina y endometriosis de ovario quístico.

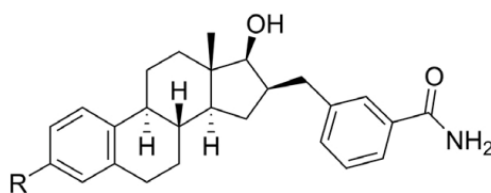
La 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17 β -HSD1) transforma estrona (E1) para dar E2, el ligando natural más potente para el ER α . Esta enzima también cataliza la reducción de deshidroepiandrosterona (DHEA) para dar 5-androsteno-3 β ,17 β -diol (A5-diol), un estrógeno más débil pero especialmente importante tras la menopausia. Por tanto, los inhibidores de 17 β -HSD1 son agentes terapéuticos interesantes para el control de enfermedades dependientes de estrógenos tales como cánceres de mama y endometriosis.

Durante los últimos treinta años, se han desarrollado intensos esfuerzos con el objetivo de diseñar potentes inhibidores de esta enzima esteroideogénica clave, pero sólo recientemente se han notificado candidatos principales con actividades inhibitoras muy buenas. La presencia de una actividad estrogénica residual asociada con inhibidores esteroideos, que con frecuencia se construyen alrededor de una estructura principal de estrano, representaba un inconveniente principal en su desarrollo.

Se ha notificado 16 β -(*m*-carbamoilbencil)estradiol (CC-156) como potente inhibidor de 17 β -HSD1. A pesar de su buena potencia inhibitora, se encontró que estimula *in vitro* las líneas celulares de cáncer de mama sensibles a estrógenos tanto MCF-7 como T-47D, reduciendo por tanto en gran medida su potencial terapéutico.

Se han realizado muchos esfuerzos con el fin de superar la actividad estrogénica residual indeseable, sin afectar negativamente al efecto inhibitor.

Entre la nueva serie de compuestos desarrollados en este sector, se ha notificado el derivado de E2, 3-[[[(16 β ,17 β)-3-(2-bromoetil)-17-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-16-il]metil]benzamida (también denominada a continuación en el presente documento "PBRM"), como el primer inhibidor esteroideo irreversible no estrogénico de 17 β -HSD1 (Trottier A. *et al.*, "Insight into the mode of action and selectivity of PBRM, a covalent steroidal inhibitor of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1", *Biochemical Pharmacology*, 2017, 144, 149–161):



R = HO (CC-156)

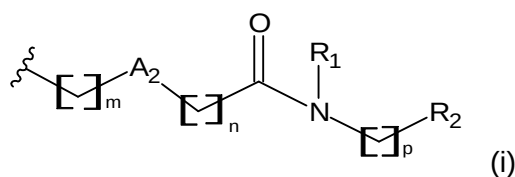
R = BrCH₂CH₂ (PBRM)

Se confirmó la irreversibilidad mediante la identificación de la unión covalente de PBRM a 17 β -HSD1 (Maltais R. *et al.*, "Discovery of a non-estrogenic irreversible inhibitor of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from 3-substituted-16 β -(*m*-carbamoylbenzyl)-estradiol derivatives", 2014, J. Med. Chem., 55(7), 204-222; Li T. *et al.*, "Combined biophysical chemistry reveals a new covalent inhibitor with low-reactivity alkyl halide", 2018, J. Phys. Chem. Lett. 9, 5275-5280). La naturaleza irreversible de la interacción resulta especialmente ventajosa con respecto a la eficacia aumentada y la acción extendida permitida mediante tal mecanismo desde un punto de vista terapéutico.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, todavía existe la necesidad de inhibidores irreversibles de 17 β -HSD1 no estrogénicos con propiedades mejoradas.

SUMARIO

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que, cuando se modificaba el compuesto PBRM sustituyendo el resto 16 β -metilbenzamida original por otro resto amida de fórmula (i):



el compuesto resultante no sólo conservaba la irreversibilidad y naturaleza no estrogénica del PBRM original sino que se lograba una mejora notable tanto en el efecto inhibidor sobre 17 β -HSD1 así como en la estabilidad metabólica.

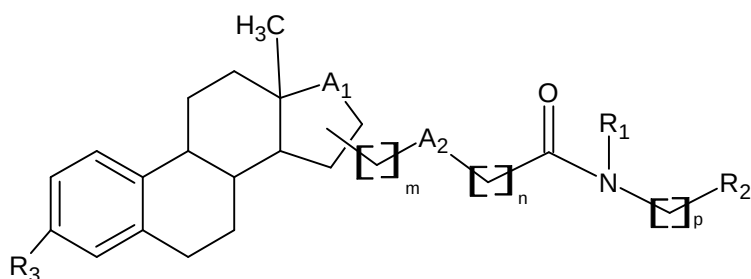
Por un lado, la figura 1 muestra que, cuando se administró uno de los compuestos de la invención (PBRM-II) a una línea celular de cáncer de mama ER+, T-47D, hubo una reducción notable en el crecimiento celular con respecto al control. Esto es indicativo de que los compuestos de la invención son eficientes en el tratamiento de una enfermedad dependiente de estrógenos, que está caracterizada por estar asociada con altos niveles de estrógenos, pero también, y de manera importante, de que no "añaden" estrogenicidad al entorno. Esto es un indicio adicional de lo seguros que son los compuestos de la invención cuando incluyen el resto amida de fórmula (i). A diferencia, por ejemplo, de CC-156 (un inhibidor reversible de 17 β -HSD1) que, cuando se administra a las células, induce estrogenicidad y da lugar a un aumento del crecimiento celular de las células tumorales, incluso cuando se usa a baja concentración (véase la figura 1).

Mirando la figura 1, también puede deducirse que los compuestos de la invención no sólo inhiben la diana de manera más potente, sino que esta potencia superior se traduce en un tratamiento a más eficiente de la enfermedad a las dosis más bajas (0,1 y 1 μ M) en comparación con PBRM.

Por otro lado, la tabla 1 a continuación muestra que el valor de CI_{50} se redujo 26 veces cuando se modificó PBRM sustituyendo la metilbenzamida por un resto amida de fórmula (i) ubicado en la posición 15 β y siendo R_2 un anillo de tiazolilo. Además, la figura 2 muestra que la estabilidad del compuesto se aumentó en más del 30 %.

En conjunto, los compuestos proporcionados por la presente invención suponen un gran avance en el campo de inhibidores irreversibles de 17 β -HSD1, en cuanto a potencia inhibidora, eficiencia, y seguridad.

Por tanto, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero o sal del mismo:



en el que:

A_1 se selecciona de C(O) y CHR_{z1} ;

A_2 se selecciona de CH_2 y O;

R_1 se selecciona del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo (C_1 - C_5) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z, alcoxilo (C_1 - C_5) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z, alquenilo (C_2 - C_5) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z, alquinilo (C_2 - C_5) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z; cicloalquilo (C_3 - C_8); arilo; y heteroarilo;

R_2 es un anillo aromático heterocíclico que tiene 5, 6 ó 7 miembros seleccionados del grupo que consiste en: CR_{z2} , N, S, y O, con la condición de que al menos uno de los miembros es N, S u O;

R_3 es alquilo (C_1 - C_5) sustituido con uno o más Br, Br^{76} , I, I^{123} , I^{124} , o I^{131} ;

R_{z1} se selecciona de OH, $NR_{x1}R_{x2}$, $=N-OR_{x3}$, halógeno, alcoxilo (C_1-C_5), $OC(O)$ -alquilo (C_1-C_5), y $OSO_2NR_{x4}NR_{x5}$;

R_{z2} se selecciona de hidrógeno, OH, alquilo (C_1-C_{10}) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z, y alcoxilo (C_1-C_{10}) opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes Z;

Z se selecciona de halógeno, OH, alquilo (C_1-C_5), haloalquilo (C_1-C_5), alcoxilo (C_1-C_5), haloalcoxilo (C_1-C_5), y $NR_{x1}R_{x2}$;

R_{x1} , R_{x2} , R_{x4} y R_{x5} son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo (C_1-C_5), haloalquilo (C_1-C_5), alcoxilo (C_1-C_5), y haloalcoxilo (C_1-C_5);

R_{x3} se selecciona de H, y alquilo (C_1-C_5);

m representa un valor de número entero seleccionado de 0 a 2;

n representa un valor de número entero seleccionado de 0 a 2;

p representa un valor de número entero seleccionado de 0 a 5;

en el que:

arilo es un sistema de anillo aromático que comprende 5 ó 6 miembros CR_c , en el que R_c se selecciona de H, halógeno, ciano, nitro, alquilo (C_1-C_5), haloalquilo (C_1-C_5), -O-alquilo (C_1-C_5), y -O-haloalquilo (C_1-C_5); y

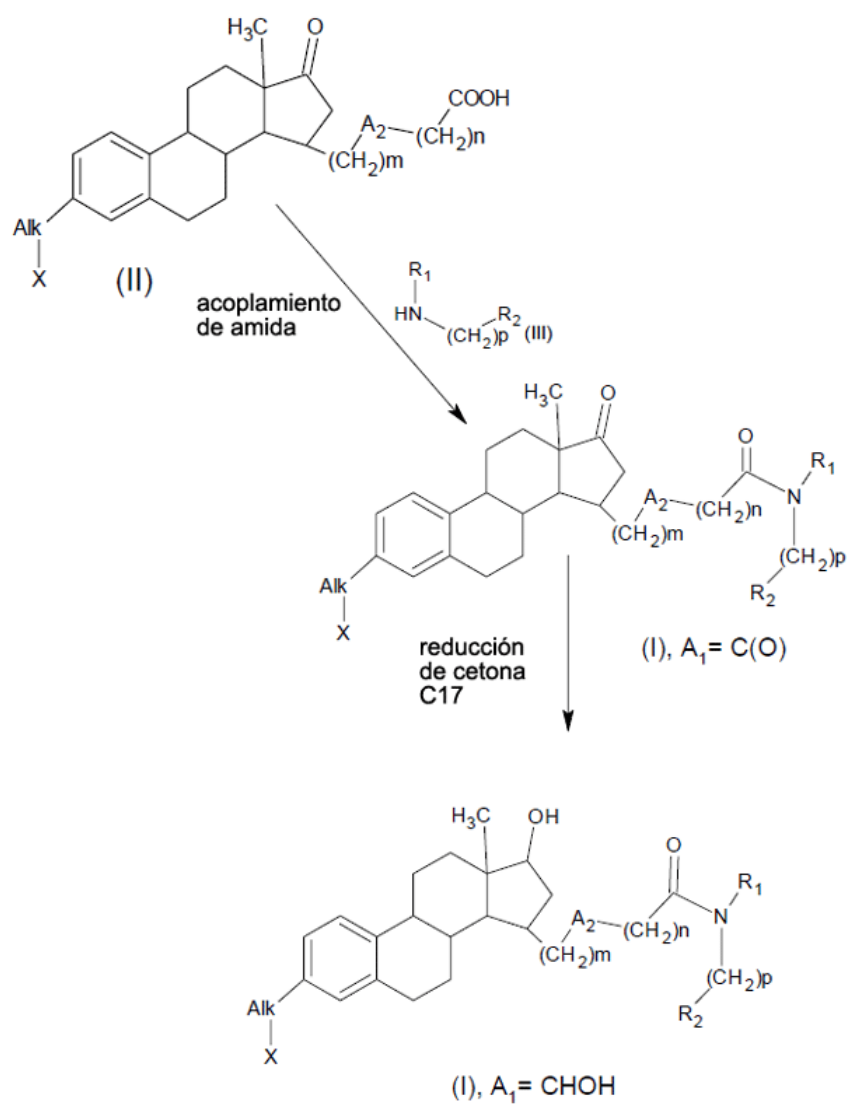
heteroarilo es un sistema de anillo aromático que comprende 5 ó 6 miembros seleccionados del grupo que consiste en: CR_d , O, N, NH, y S; en el que R_d se selecciona de H, halógeno, ciano, nitro, alquilo (C_1-C_5), haloalquilo (C_1-C_5), -O-alquilo (C_1-C_5), y -O-haloalquilo (C_1-C_5); y

en el que el compuesto de fórmula (I) tiene la capacidad de unirse de manera covalente (es decir, irreversible) a la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1.

La invención también proporciona procedimientos de síntesis para preparar los compuestos de la invención.

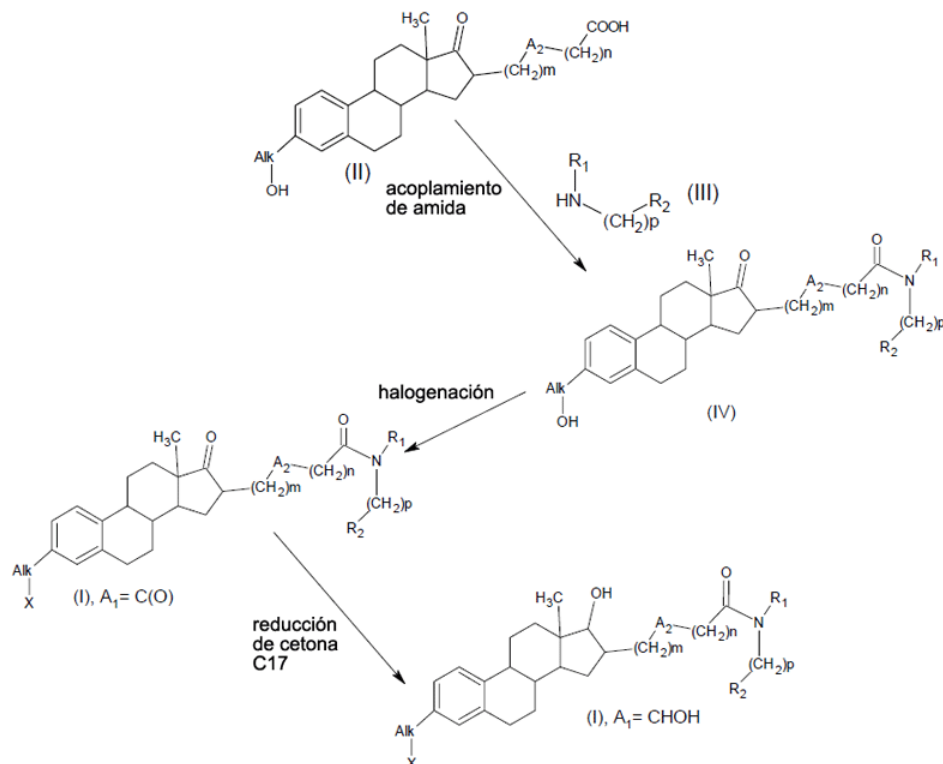
Por tanto, en un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento las etapas proporcionadas en los esquemas 1 ó 2 a continuación:

Esquema 1: obtención de análogos de C15



Alk= alquilo (C_1 - C_5); Alk-X= alquilo (C_1 - C_5) sustituido con un X seleccionado de Br, Br^{76} , I, I^{123} , I^{124} , o I^{131} .

Esquema 2: obtención de análogos de C16



Alk= alquilo (C_1-C_5); Alk-OH= alquilo (C_1-C_5) sustituido con un sustituyente OH; Alk-X= alquilo (C_1-C_5) sustituido con un X seleccionado de Br, Br^{76} , I, I^{123} , I^{124} , o I^{131} .

La etapa de acoplamiento de amida entre el compuesto de ácido carboxílico de fórmula (II) y la amina de fórmula (III) puede realizarse usando agentes de acoplamiento de amida bien conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes de acoplamiento de amida se seleccionan independientemente de TBTU, TCTU, HATU, T3P o COMU. La reacción de acoplamiento se realiza en presencia de DMF o cualquier otro disolvente aprótico adecuado, y un álcali, tal como DIPEA.

La etapa de halogenación (o bien bromación o bien yodación) del derivado de OH de fórmula (IV) puede realizarse usando reactivos y condiciones bien conocidos. A continuación se proporcionan condiciones ilustrativas, no limitativas, es decir, PPh_3 y CBr_4 .

La etapa de reducción de la cetona C17 también puede realizarse usando cualquier reactivo reductor y condición adecuado. El agente reductor reduce específicamente la cetona y la convierte en alcohol. En determinadas realizaciones, reactivos solubles en agua específicos son reactivos no tóxicos y/o verdes. Los ejemplos no limitativos de agentes reductores solubles en agua específicos incluyen borohidruro de sodio ($NaBH_4$); cianoborohidruro de sodio ($NaCNBH_3$); por ejemplo catalizador de níquel (Ni), platino (Pt) o paladio (Pd) en

presencia de gas hidrógeno (H_2); borano de amoníaco (H_3NBH_3), complejo de borano-dimetilamina $[(CH_3)_2NH \cdot BH_3]$; complejo de borano-*terc*-butilamina $[(CH_3)_3CNH_2 \cdot BH_3]$; o complejo de borano-pirimidina.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto tal como se definió en el primer aspecto de la invención, y uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit de partes que comprende:

- (i) el compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención,
- y
- (ii) un marcador detectable.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un compuesto tal como se definió en el primer aspecto de la invención, para su uso en terapia o diagnóstico.

Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en terapia, especialmente en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos dependientes de hormonas esteroideas que requieren la inhibición de enzima 17β -HSD1, en animales, en particular mamíferos, y seres humanos. En particular, los compuestos de fórmula (I) representan inhibidores de la enzima 17β -HSD1, que presentan propiedades farmacológicas para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades o trastornos dependientes de esteroides malignos tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma de próstata, cáncer de ovarios, cáncer uterino, cáncer endometrial e hiperplasia endometrial, pero también para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades o trastornos dependientes de esteroides benignos tales como endometriosis, mioma uterino, leiomioma uterino, adenomiosis, dismenorrea, menorragia, metrorragia, prostatodinia, hiperplasia prostática benigna, disfunción urinaria, síndrome de ovario poliquístico o síndrome de las vías urinarias bajas. Enfermedades dependientes de estrógenos adicionales que pueden tratarse y/o prevenirse con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención incluyen esclerosis múltiple, obesidad, artritis reumatoide, cáncer de colon, heridas en tejidos, arrugas en la piel y cataratas.

Por tanto, en un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la enzima 17β -HSD1 en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o de la composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención, a un sujeto que lo necesita. Este aspecto puede formularse como un compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica del

tercer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad inhibiendo la enzima 17 β -HSD1. Este aspecto también puede formularse alternativamente como el uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad inhibiendo la enzima 17 β -HSD1.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad dependiente de estrógenos, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica tal como se definió en el tercer aspecto de la invención, a un sujeto que lo necesita. Este aspecto puede formularse alternativamente como el compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad dependiente de estrógenos. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió en el primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica del tercer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad dependiente de estrógenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: efecto de inhibidores de 17 β -HSD1 sobre la proliferación de células T-47D dependiente de estrógenos.

Figura 2: estabilidad metabólica en microsomas hepáticos humanos de inhibidores de 17 β -HSD1 CC-156 (propósito comparativo), PBRM (propósito comparativo), y PBRM-II (invención).

Figura 3: irreversibilidad del compuesto de la invención PBRM-II.

Figura 4: concentración de PBRM-II cuando se administra por vía oral (30 mg/kg en DMSO:aceite de girasol / 8:92) en ratones.

Figura 5A: porcentaje de PBRM-II restante (% de PR) frente al tiempo (min).

Figura 5B: Ln del porcentaje de PBRM-II restante (% de PR) frente al tiempo (min) y semivida de PBRM-II a 4 μ M en microsomas hepáticos humanos (HLM).

Figura 5C: porcentaje de PBRM restante (% de PR) frente al tiempo (min).

Figura 5D: Ln del porcentaje de PBRM restante (% de PR) frente al tiempo (min) y semivida de PBRM-II a 4 μ M en microsomas hepáticos humanos (HLM).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A los términos no específicamente definidos en el presente documento se les deben dar los significados que les dará un experto en la técnica a la vista de la divulgación y el contexto. Sin embargo, tal como se usan en la memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen los significados indicados y se respetan los siguientes convenios.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las disposiciones adjuntas, los términos “comprender” y variaciones tales como “comprende”, “que comprende”, deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, se pretende que estos términos transmitan la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente mencionados, cuando el contexto lo permita. El término “comprender” también incluye el término “consiste en”.

Para los propósitos de la presente invención, cualquier intervalo facilitado incluye los puntos de extremo tanto inferior como superior del intervalo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona inhibidores irreversibles de 17 β -HSD1.

En el contexto de la invención, un compuesto es un inhibidor de 17 β -HSD1 cuando reduce la actividad de la enzima. En una realización, el compuesto inhibe al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de la actividad enzimática. Hay protocolos bien conocidos en el estado de la técnica para determinar la actividad inhibidora. A continuación se proporcionan ejemplos ilustrativos y se basan en (a) determinar E1 y E2 marcados después de poner en contacto una línea celular de cáncer de mama sensible a estrógenos, T-47D, con [14C]-E1 + E1 frío y el compuesto de prueba, y (b) calcular el % de transformación y el % de inhibición de la siguiente manera: % de transformación = $100 \text{ [14C]-E2} / ([14\text{C}]\text{-E1} + [14\text{C}]\text{-E2})$ y % de inhibición = $100 (\% \text{ de transformación sin inhibidor} - \% \text{ de transformación con inhibidor}) / \% \text{ de transformación sin inhibidor}$. La concentración de E1 y E2 (marcados y no marcados) puede determinarse usando cualquier técnica adecuada. La concentración que inhibe el 50 % de la transformación de E1 en E2 (CI₅₀) puede determinarse mediante cualquier protocolo o herramienta de rutina, tal como usando el software GraphPad Prism 6.

En el contexto de la invención, la irreversibilidad se debe a la capacidad de los compuestos de fórmula (I) para unirse de manera covalente a 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 de una manera irreversible y, por consiguiente, bloquear la capacidad de la enzima para convertir estrona (E1) en estradiol (E2). Hay métodos bien conocidos en el estado de la técnica para determinar si un compuesto se une de manera covalente a esta enzima. (Zang *et al.* Cell Chem Biol., 2019, 26 (11), 1486-1500). Los experimentos de lavado, en los que en primer lugar se exponen células al inhibidor, después se lavan y después se dejan determinar la actividad enzimática, se encuentran entre los métodos valiosos en el procedimiento de validación. La conversión de estrona en estradiol en células T-47D con lavado se comparó con condiciones “sin lavado” en presencia o no del inhibidor. El efecto sostenido para bloquear la conversión de estrona en estradiol de inhibidores covalentes sometidos a los experimentos de lavado se atribuye a la naturaleza irreversible de su unión con la diana. En los ejemplos proporcionados a continuación se proporcionan condiciones y reactivos particulares.

En el contexto de la invención, el término “alquilo” se refiere a una radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Los grupos alquilo típicos tienen desde 1 hasta aproximadamente 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, y *n*-pentilo, entre otros.

En el contexto de la invención, el término “alquenilo” se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace C=C, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Los radicales alquenilo típicos tienen desde 2 hasta aproximadamente 10, de 2 a aproximadamente 8 o de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. En una realización particular, el grupo alquenilo es vinilo, 1-metil-etenido, 1-propenilo, 2-propenilo, o butenilo.

En el contexto de la invención, el término “alquinilo” se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más triples enlaces C $\equiv$ C. Los ejemplos de alquinilo grupos incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 2-propinilo, y 2-butinilo.

En el contexto de la invención, el término “cicloalquilo” se refiere a un alquilo cíclico, en el que “alquilo” es tal como se definió anteriormente. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cicloalquilo son ejemplos de grupos cicloalquilo que incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, o cicloheptilo.

En el contexto de la invención, el término “alcoxilo” se refiere a un -O-alquilo, en el que “alquilo” es tal como se definió anteriormente. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de hidroxialquilo son metoxilo, etoxilo, o *t*-butoxilo, entre otros.

En el contexto de la invención, el término “haloalquilo” se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, en el que uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos por halógeno. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de haloalquilo son clorometilo, trifluorometilo, 1-cloro-2-fluoroetilo, y similares.

En el contexto de la invención, el término “haloalcoxilo” se refiere a un -O-haloalquilo, en el que “haloalquilo” es tal como se definió anteriormente.

En el contexto de la invención, el término “halógeno” se refiere a bromo, cloro, yodo o fluoro.

En el contexto de la invención, el término “nitro” se refiere a NO₂.

En el contexto de la invención, el término “ciano” se refiere a HC≡N.

En el contexto de la presente invención, el término “sal” debe entenderse como cualquier forma de un compuesto usado según esta invención en el que dicho compuesto está en forma iónica o está cargado y acoplado a un contraión (un catión o anión) o está en disolución. Esta definición también incluye sales de amonio cuaternario y complejos de la molécula activa con otras moléculas e iones, particularmente, complejos formados mediante interacciones iónicas. La definición incluye, en particular, sales fisiológicamente aceptables; este término debe entenderse como equivalente a “sales farmacológicamente aceptables” o “sales farmacéuticamente aceptables”.

En el contexto de la presente invención, el término “sales farmacéuticamente aceptables” significa cualquier sal que se tolera fisiológicamente (lo que significa normalmente que no es tóxica, particularmente, como resultado del contraión) cuando se usa de una manera apropiada para un tratamiento, aplicado o usado, particularmente, en seres humanos y/o mamíferos. Estas sales fisiológicamente aceptables pueden formarse con cationes o bases y, en el contexto de esta invención, se entiende que son sales formadas por al menos un compuesto usado según la invención (normalmente un ácido (desprotonado)) tal como un anión y al menos un catión fisiológicamente tolerado, preferiblemente inorgánico, particularmente cuando se usa en seres humanos y/o mamíferos. Las sales con metales alcalinos y alcalinotérreos se prefieren particularmente, así como aquellas formadas con cationes de amonio (NH₄⁺). Las sales preferidas son las formadas con (mono) o (di)sodio,

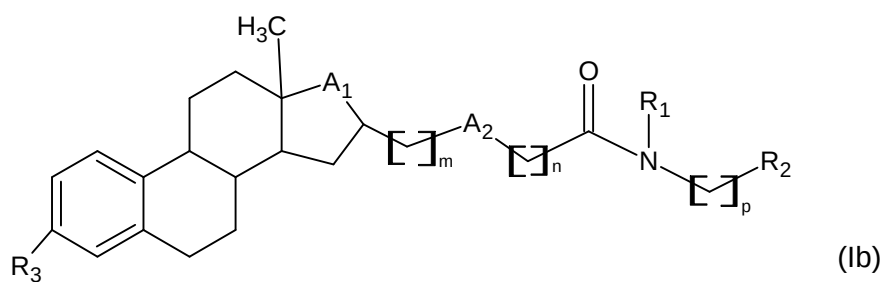
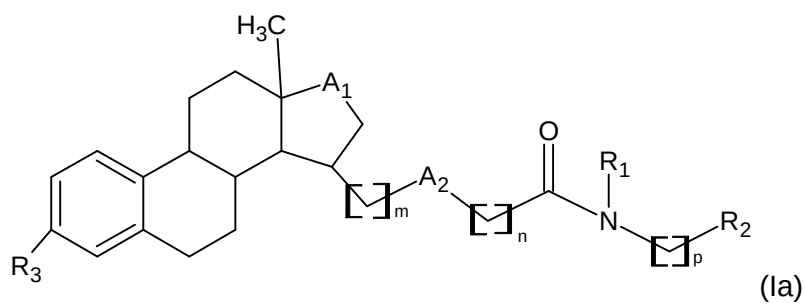
(mono) o (di)potasio, magnesio o calcio. Estas sales fisiológicamente aceptables también pueden formarse con aniones o ácidos y, en el contexto de esta invención, se entienden como sales formadas por al menos un compuesto usado según la invención (normalmente protonado, por ejemplo en nitrógeno) tal como un catión y al menos un anión fisiológicamente tolerado, particularmente cuando se usa en seres humanos y/o mamíferos. Esta definición incluye específicamente en el contexto de esta invención una sal formada mediante un ácido fisiológicamente tolerado, es decir, sales de un principio activo específico con ácidos orgánicos o inorgánicos fisiológicamente tolerados (particularmente cuando se usan en seres humanos y/o mamíferos). Los ejemplos de este tipo de sales son los formados con: ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido láctico o ácido cítrico.

Se presente que cualquier compuesto de fórmula (I) mencionado en el presente documento represente tal compuesto específico así como determinadas variaciones o formas. En particular, los compuestos mencionados en el presente documento pueden tener centros asimétricos y, por tanto, existir en diferentes formas enantioméricas o diastereoméricas. Por tanto, se pretende que cualquier compuesto dado de fórmula (I) mencionado en el presente documento represente uno cualquiera de un racemato, una o más formas enantioméricas, una o más formas diastereoméricas, y mezclas de las mismas. Asimismo, también es posible el estereoisomerismo o isomerismo geométrico alrededor del doble enlace, por tanto, en algunos casos, la molécula puede existir como isómero (*E*) o isómero (*Z*) (isómeros *trans* y *cis*). Cuando la molécula contiene varios dobles enlaces, cada doble enlace tendrá su propio estereoisomerismo, que puede ser igual al, o diferente del, estereoisomerismo de los otros dobles enlaces de la molécula. Además, los compuestos mencionados en el presente documento pueden existir como atropisómeros. Se considera que todos los estereoisómeros incluyendo enantiómeros, diastereoisómeros, isómeros geométricos y atropisómeros de los compuestos mencionados en el presente documento, y mezclas de los mismos, están dentro del alcance de la presente invención.

Además, cualquier compuesto de fórmula (I) mencionado en el presente documento puede existir como tautómero. Específicamente, el término tautómero se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales de un compuesto que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra.

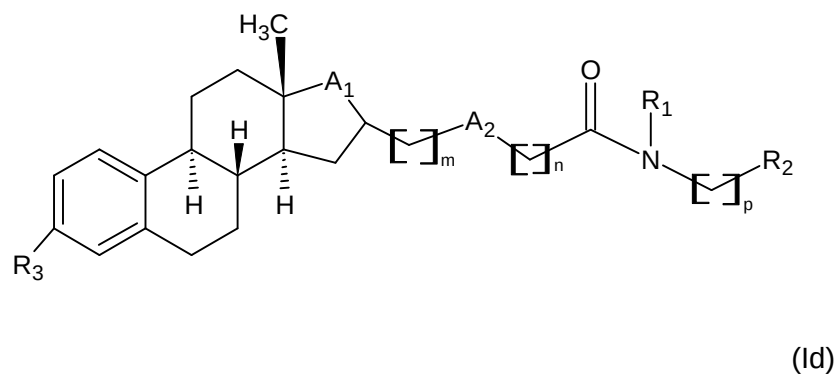
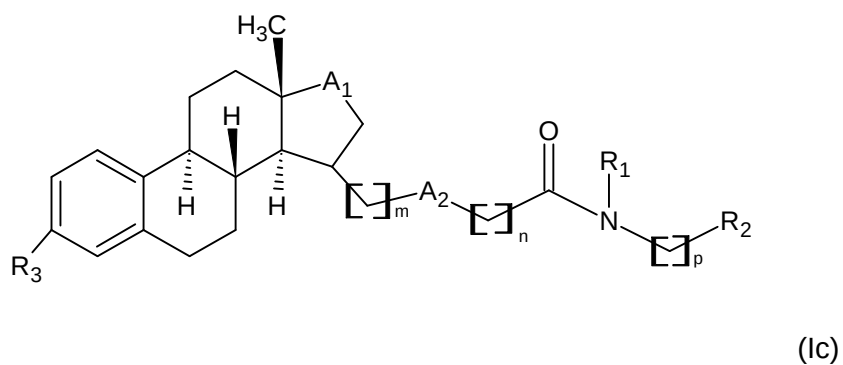
En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno de fórmula (Ia) o (Ib):

14



en el que de R_1 a R_3 , A_1 , A_2 , m , n , y p son tal como se definieron en el primer aspecto de la invención.

En otra realización el compuesto de la invención es de fórmula (Ic) o (Id):



en el que de R_1 a R_3 , A_1 , A_2 , m , n , y p son tal como se definieron en el primer aspecto de la invención.

En una realización de la invención, el compuesto es uno en el que A_1 es C(O). En una realización alternativa, A_1 es CR_{z1} , en el que R_{z1} se selecciona de OH, =N-OH, =N-OCH₃, NH₂, F, OCH₃, OCOCH₃, OSO₂NH₂; particularmente R_{z1} es OH. En una realización, A_1 se selecciona de C(O) o CHOH.

En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que m es distinto de 0, y $A_2 = CH_2$. En particular, m es 1, $A_2 = CH_2$ y n es 0.

En una realización alternativa, el compuesto de la invención es uno en el que m= 0, y $A_2 = -O-$. En otra realización, el compuesto de la invención es uno en el que m= 0, y $A_2 = -O-$ y n es distinto de 0, particularmente n= 1.

En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que R_1 es hidrógeno.

En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que R_3 es bromoetilo, particularmente 2-bromoetilo.

En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que p es 0 cuando R_2 representa un anillo aromático heterocíclico de 5 miembros.

En otra realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que p es 1 cuando R_2 representa un anillo aromático heterocíclico de 6 miembros.

En una realización de la invención, el compuesto de la invención es uno en el que R_2 es un anillo aromático heterocíclico que tiene 5 ó 6 miembros. Particularmente R_2 es un anillo aromático heterocíclico que tiene uno o dos heteroátomos. En otra realización particular, R_2 es un anillo aromático heterocíclico que tiene uno o dos heteroátomos seleccionados de N o S. En una realización R_2 es un anillo de tiazolilo en el que R_{z2} es tal como se definió anteriormente, particularmente R_{z2} se selecciona de H y alquilo (C_1-C_5). En una realización alternativa R_2 representa un anillo de piridinilo, en el que R_{z2} es tal como se definió anteriormente, particularmente R_{z2} se selecciona de H y alquilo (C_1-C_5).

En una realización adicional, el compuesto de la invención se selecciona del grupo que consiste en:

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-II);

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-II-OH);

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-III);

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-IV);

3-[3-(2-bromoetil)-17- β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-V);

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (PBRM-VII);

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]acetamida (PBRM-VIII);

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (PBRM-IX);

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]acetamida (PBRM-X);

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (PBRM-XI);

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (PBRM-XII);

2-[[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]oxi]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-XIII); y

2-[[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]oxi]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-XIV);

y cualquier sal o estereoisómero de los mismos.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la invención, tal como se definió anteriormente.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz", se entiende la cantidad del/de los compuesto(s) que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar hasta cierto alcance, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se trata.

La dosis terapéutica precisa del/de los componente(s), así como la cantidad del/de los compuesto(s) de la invención, pueden depender de varias variables. Algunas serán: vía de administración, tiempo de liberación de fármaco (por ejemplo, instantáneo o prolongado), pauta posológica, intensidad del dolor, estado del paciente, y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como forma de dosificación líquida, semisólida o sólida, por ejemplo en forma de disoluciones para inyección, gotas, jugos, jarabes, pulverizaciones, suspensiones, comprimidos, parches, cápsulas, apósitos, supositorios, pomadas, cremas, lociones, geles, emulsiones, aerosoles o en forma de múltiples partículas, por ejemplo en forma de pastillas o gránulos, si es apropiado comprimidas para dar comprimidos, decantadas en cápsulas o suspendidas en un líquido, o administradas como tales.

Estas composiciones pueden prepararse con la ayuda de medios, dispositivos, métodos o procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Los adyuvantes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en tales composiciones son adyuvantes, vehículos o excipientes conocidos por los expertos en la técnica o habitualmente usados en la preparación de composiciones terapéuticas, que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en excipientes, cargas, disolventes, diluyentes, tensioactivos, colorantes, conservantes, disgregantes, agentes deslizantes, lubricantes, agentes aromatizantes o aglutinantes.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de seres humanos sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones proporcionales con una razón de beneficio/riesgo razonable en animales y, particularmente, en seres humanos.

La selección de adyuvantes fisiológicamente compatibles o el número de adyuvantes que van a usarse depende de la forma de administración de la composición farmacéutica, es decir, oral, subcutánea, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intranasal, bucal, rectal, ótica o intratimpánica. Las preparaciones en forma de comprimidos, grageas, cápsulas, gránulos, pastillas, gotas, en particular gotas óticas, jugos o jarabes son preferiblemente adecuadas para administración oral; disoluciones, suspensiones, preparaciones secas fácilmente reconstituibles o también pulverizaciones son preferiblemente adecuadas para administración parenteral, tópica o por inhalación. Los

compuestos según la invención usados en la composición farmacéutica según la invención en un depósito, en una forma disuelta o en un apósito, o si es apropiado que tienen otros agentes añadidos que favorecen la penetración en la piel, son preparaciones adecuadas para administración percutánea. Las formas de preparación que pueden administrarse por vía oral o percutánea también pueden liberar el compuesto respectivo según la invención de una forma retardada.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, los componentes farmacológicos activos pueden combinarse con un portador inerte, oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para la administración oral en forma líquida, los componentes farmacológicos orales pueden combinarse con cualquier portador inerte, oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua, y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, y agentes colorantes adecuados en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábica, goma tragacanto, o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana, y similares.

Las cápsulas de gelatina contienen el principio activo y portadores en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, y similares. Pueden usarse diluyentes similares para producir comprimidos sometidos a compresión. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de medicamento a lo largo de un periodo de horas. Los comprimidos sometidos a compresión pueden estar recubiertos con azúcar o recubiertos con película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido frente a la atmósfera, o con recubrimiento entérico para la disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y aromatizantes para aumentar la aceptación del paciente.

Evidentemente, la dosificación administrada de la composición farmacéutica variará dependiendo del uso y factores conocidos tales como la edad, salud, y peso del receptor;

naturaleza y alcance de los síntomas, tratamientos simultáneos, si los hay, frecuencia de tratamiento, y el efecto deseado. El receptor puede ser cualquier tipo de mamífero, pero es preferiblemente un ser humano.

La presente invención también proporciona métodos y usos terapéuticos y profilácticos basándose en los compuestos y las composiciones proporcionados por la presente invención.

A lo largo de la presente descripción, el término “tratamiento” incluye, pero no se limita a, aliviar, reducir o eliminar uno o más síntomas del trastorno; reducir el grado de la enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado, retrasar o ralentizar la progresión, aliviar o mejorar su estado, y remitir (ya sea total o parcialmente).

Tal como se usa en la presente invención, el término “prevención” se refiere a prevenir que se produzca la aparición del dolor en un paciente que tiene predisposición, pero que aún no tiene síntomas de la enfermedad.

“Estado dependiente de estrógenos” se refiere a una enfermedad, un estado, un tumor cuyo inicio, y/o proliferación y/o crecimiento se estimula mediante estrógenos. El “estado dependiente de estrógenos puede ser un estado benigno o un estado maligno”:

Los estados que son dependientes de estrógenos pueden ser o bien benignos (proliferación local sin metástasis) o bien malignos (proliferación local asociada con metástasis). Un estado maligno es normalmente un cáncer.

En una realización, el sujeto padece una enfermedad o trastorno dependiente de estrógenos maligno, tal como cáncer. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cánceres son cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer uterino, y cáncer de ovarios, entre otros.

En otra realización el sujeto padece una enfermedad o trastorno dependiente de estrógenos benigno tal como endometriosis, mioma uterino, leiomioma uterino, adenomiosis, dismenorrea, menorragia, metrorragia, prostatodinia, hiperplasia prostática benigna, disfunción urinaria, síndrome de ovario poliquístico, síndrome de las vías urinarias bajas, esclerosis múltiple, obesidad, artritis reumatoide, cáncer de colon, heridas en tejidos, arrugas en la piel o cataratas.

En otra realización de las composiciones, métodos y usos, los compuestos de la invención se administran en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adecuados en el tratamiento de enfermedades dependientes de estrógenos.

El término “agente terapéutico” se usa para describir un agente, distinto de un compuesto según la presente invención, que se usa en combinación con los presentes compuestos como agente con actividad biológica para ayudar a realizar una terapia, inhibición y/o prevención/profilaxis pretendida para la que se usan los presentes compuestos. Los agentes bioactivos preferidos para su uso en el presente documento incluyen los agentes que tienen actividad farmacológica similar a aquella para la que se usan o administran los presentes compuestos e incluyen, por ejemplo, agentes contra el cáncer, agentes antivirales, incluyendo especialmente agentes anti-VIH y agentes anti-VHC, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, compuestos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), compuestos retinoides, inhibidores de metaloproteasa de la matriz, compuesto antiestrógeno, agonistas o antagonistas de GnRH, moduladores selectivos de receptor de progestina (SPRM), inhibidores de la angiogénesis, compuestos de tipo progestina, inhibidores de aromatasa, inhibidores de 17 β -HSD-7, inhibidores de 17 β -HSD5, o cualquier combinación de los mismos.

Un compuesto antiinflamatorio no esteroideo (AINE), según la invención, es, por ejemplo, un compuesto seleccionado de ácido acetilsalicílico, indometacina, sulindaco, fenilbutazona, diclofenaco, fentiazaco, ketorolaco, piroxicam, tenoxicam, mecoxiam, meloxicam, cinoxicam, ibufenaco, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, nabumetona, ácido niflúrmico y nimesulida, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. AINE preferidos son diclofenaco, piroxicam, tenoxicam, mecoxiam, meloxicam, ibufenaco, ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los ejemplos de compuestos retinoides según la invención incluyen, por ejemplo, Accutane; adapaleno; Allergan AGN-193174; Allergan AGN-193676; Allergan AGN-193836; Allergan AGN-193109; Aronex AR-623; BMS-181162; Galderma CD-437; Eisai ER-34617; etrinato; fenretinida; ligando LGD-1550; Ilexacalcitol; Maxia Pharmaceuticals MX-781; mofaroteno; Molecular Design MDI-101; Molecular Design MDI-301; Molecular Design MDI-403; motretinida; Eisai ácido 4-(2-[5-(4-metil-7-etilbenzofuran-2-il)pirrolil])benzoico; Johnson & Johnson N-[4-[2-til-1-(1H-imidazol-1-il)butil]fenil]-2-benzotiazolamina; Soriatane; Roche SR-11262; tocoretinato; ácido trans-retinoico de Advanced Polymer Systems; UAB Research Foundation UAB-8; Tazorac; TopiCare; Taiho TAC-101; y Vesanoid.

Los ejemplos de inhibidores de metaloproteasa de la matriz según la invención incluyen los conocidos:

monoclorhidrato de 1-ciclopropil-N-hidroxi-4-[[4-[4-(trifluorometoxi)fenoxi]fenil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

monoclorhidrato de N-hidroxi-1-(feniletil)-4-[[4-[4-(trifluorometoxi)fenoxi]-1-piperidinil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

diclorhidrato de N-hidroxi-1-(piridinilmetil)-4-[[4-[4-(trifluorometil)fenoxi]fenil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

N-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-[[4-[4-(trifluorometil)fenoxi]-1-piperidinil]sulfonil]-benzamida;

diclorhidrato de N-hidroxi-1-(4-piridinilmetil)-4-[[4-[4-(trifluorometil)fenoxi]fenil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

diclorhidrato de N-hidroxi-1-(3-piridinilmetil)-4-[[4-[4-(trifluorometil)fenoxi]fenil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

monoclorhidrato de N-hidroxi-1-(2-piridinilmetil)-4-[[4-[4-(trifluorometil)fenoxi]fenil]sulfonil]-4-piperidincarboxamida;

British Biotech BB-2516 (marimastat), N4-[2,2-dimetil-1-[(metilamino)carbonil]-propil]-N1,2-dihidroxi-3-(2-metilpropil)-, [2S-[N4(R*), 2R*, 3S*]]-);

BMS 275291 divulgado en el documento WO 97/19075;

Bayer Ag Bay-12-9566 (tanomastat), ácido 4-[(4'-cloro[1,1-difenil]-4-il)oxil-2-[(feniltio)metil]butanoico;

Agouron Pharmaceuticals AG-3340, N-hidroxi-2,2'-dimetil-4-[[4-(4-piridiniloxi)fenil]sulfonil]-3-tiomorfolincarboxamida;

CollaGenex Pharmaceuticals CMT-3 (metastat), 6-desmetil-6-desoxi-4-desdimetilaminotetraciclina, batimastat (BB-94); y

Chiroscience D-2163, 2-[1S-[(2R,S)-acetilmercapto-S-ftalimido]pentanoil-L-leucil]amino-3-metilbutil]imidazol.

Un compuesto antiestrógeno, por ejemplo un modulador selectivo de receptor de estrógenos (SERM), es preferiblemente un SERM carente de actividad uterotrónica. Ejemplos de SERM, según la invención, son tamoxifeno, toremifeno, arzoxifeno, idoxifeno, EM 800, fulvestrant y droloxifeno.

Ejemplos de agonistas de GnRH (LHRH) según la invención son, por ejemplo, leuprorelina, desloreline, triptoreline, buserelina, nafareline, goserelina, avoreline, histerelina, compuesto PTL 03001 (5-oxo-L-propil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-D-triptofil-L-leucil-L-arginil-N-etil-L-prolinamida) (Peptech), compuesto AN 207 (6-[N6-[5-[2-[1,2,3,4,6,11-hexahidro-2,5,12-trihidroxi-7-mehoxi-6,11-dioxo-4-[[2,3,6-trideoxi-3-(2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il).alpha.-L-lixo-hexopiranosil]oxi]-2-naftacenil]-1,5-dioxopentil]-D-lisina]-, (2S-cis)-) (ASTA Medica Inc.), compuesto AN 238 L-treoninamida, disulfuro de N-[5-[2-[(2S,4S)-1,2,3,4,6,11-hexahidro-

2,5,12-trihidroxi-7-metoxi-6,11-dioxo-4-[[2,3,6-trideoxi-3-(2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il).alpha.-L-lixo-hexopiranosil]oxi]-2-naftacenil]-2-oxoetoxi]-1,5-dioxopentil]-D-fenilalanil-L-cisteinil-L-tirosil-D-triptofil-L-lisil-L-valil-L-cisteinilcíclico (2.fwdarw.7) (ASTA Medica Inc.) y compuesto SPD 424 (implante de LHRH-hidrogel) (Shire Pharmaceuticals Group), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Ejemplos preferidos son triptorelina, leuprorelina y goserelina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, en particular triptorelina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, por ejemplo como pamoato de triptorelina.

Ejemplos de antagonistas de GnRH (LHRH), según la invención, son, por ejemplo, cetorelix, abarelix, ramorelix, teverelix, ganirelix, compuestos A 75998 (acetil-D-(2-naftil)alanil-D-(4-clorofenil)alanil-D-(3-piridil)alanil-seril-(N-metil)tirosil-N6-(nicotinoil)-D-lisil-leucil-N6-(isopropil)lisil-propil-D-alaninamida) y A 84861 (tetrahidrofuran-2-(S)-ilcarbonil-glicil-D-(2-naftil)alanil-D-(4-cloro)fenilalanil-D-(3-piridil)-alanil-L-(N-metil)tirosil-D-[N6-(3-piridilcarbonil)]lisil-L-leucil-L-(N6-isopropil)lisil-L-propil-D-alanilamida) (Abbot Labs.), inmunógeno de GnRH (Aphton Co.), compuesto T 98475 (clorhidrato de 3-(N-bencil-N-metilaminometil)-7-(2,6-difluorobencil)-4,7-dihidro-2-(4-isobutirilaminofenil)-4-oxotieno[2,3-b]piridin-5-carboxilato de iopropilo) (Takeda), y compuesto MI 1544 (acetil-D-triptofil-D-ciclopropil-alanil-D-triptofil-L-seril-L-tirosil-D-lisil-L-leucil-L-arginil-L-propil-D-alaninamida), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Ejemplos de moduladores selectivos de receptor de progestina (SPRM), según la invención, son, por ejemplo, dienogest o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un inhibidor de la angiogénesis es, por ejemplo, un inhibidor de integrina $\alpha\beta 3$, un inhibidor de proteína cinasa, angiostatina, factor de plaquetas 4 (endostatina), un inhibidor de VEGF o talidomida.

Los inhibidores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los inhibidores de telomerasa se conocen bien en la técnica.

Además, los inhibidores o antagonistas de VEGF conocidos son agentes que suprimen la angiogénesis reduciendo la unión de VEGF a receptores celulares, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, anticuerpos monoclonales bloqueantes contra el factor de crecimiento (por ejemplo rhuMAbVEGF, Ryan *et al.*, Toxicol Pathol 1999, 27:78-86), contra el receptor (por ejemplo DC101 y derivados, Witte *et al.*, Cancer Metastasis Rev 1998, 17:155-61), formas solubles de receptores de VEGF (por ejemplo soluble Flt, Aiello *et al.*, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92:10457-61), o compuestos que antagonizan directamente

interacciones entre VEGF y receptores de superficie celular (por ejemplo Fairbrother *et al.*, Biochemistry 1998,37:17754-64).

Un inhibidor de proteína cinasa, según la invención, es, por ejemplo, un inhibidor de tirosina cinasa, en particular los compuestos 3-[4-(2-carboxietil-3,5-dimetilpirrol-2-il)metilidenil]-2-indolinona, y 3-[(2,4-dimetilpirrol-5-il)metilidenil]-2-indolinona.

Se conocen ejemplos de inhibidores de integrina $\alpha v\beta 3$:

anticuerpo Vitaxin (Ixsys); Merck KgaA EMD-121974, ciclo[RGDF-N(Me)V-];

ácido (10S)-10,11-dihidro-3-[3-(2-piridinilamino)propoxi]-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-10-acético;

ácido (2S)-7-[[[(1H-bencimidazol-2-ilmetil)metilamino]carbonil]-2,3,4,5-tetrahidro-4-metil-3-oxo-1H-1,4-benzodiazepin-2-acético;

ácido (2S)-2,3,4,5-tetrahidro-4-metil-7-[[[(5-metil-1H-imidazo[4,5-b]piridin-2-il)metil]amino]carbonil]-3-oxo-1H-1,4-benzodiazepin-2-acético;

ácido (bR)-b-[[[(3R)-2-oxo-3-[2-(5,6,7,8-tetrahidro-[1,8]-naftiridin-2-il)etil]1-1-pirrolidinil]acetil]amino]-d-(1H-indol-3-il)pentanoico; y

(3R)-N-[3-hidroxi-5-[(1,4,5,6-tetrahidro-5-hidroxi-2-pirimidinil)amino]benzoil]-glicil-3-(3-bromo-5-cloro-2-hidroxifenil)- β -alanina.

La angiostatina, endostatina y talidomida se conocen bien en la técnica. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto mencionado en el presente documento se conocen bien en la técnica.

En una realización, el uno o más de otros agentes terapéuticos se administran de manera simultánea, consecutiva, o separada con respecto al compuesto o la composición de la invención.

Para los expertos en la técnica, resultarán evidentes otros objetivos, ventajas o características de la invención en parte a partir de la descripción o en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración o no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Síntesis química de los compuestos de la invención

I. Materiales y métodos

Se adquirieron reactivos químicos de Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canadá). Se adquirió 2-(3-bromopropoxi)-*tert*-butildimetilsilano de Combiblock (San Diego, CA, EE. UU.).

Se obtuvieron disolventes habituales de Fisher Scientific (Montréal, QC, Canadá) y se usaron tal como se recibieron. Se obtuvieron diclorometano anhidro (DCM), tetrahidrofurano (THF) y dimetilformamida (DMF) de Sigma-Aldrich.

Se realizaron cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna ultrarrápida sobre plagas F254 de gel de sílice 60 de 0,20 mm y con gel de sílice 60 de ASTM de 230-400 de malla, respectivamente (E. Merck; Darmstadt, Alemania).

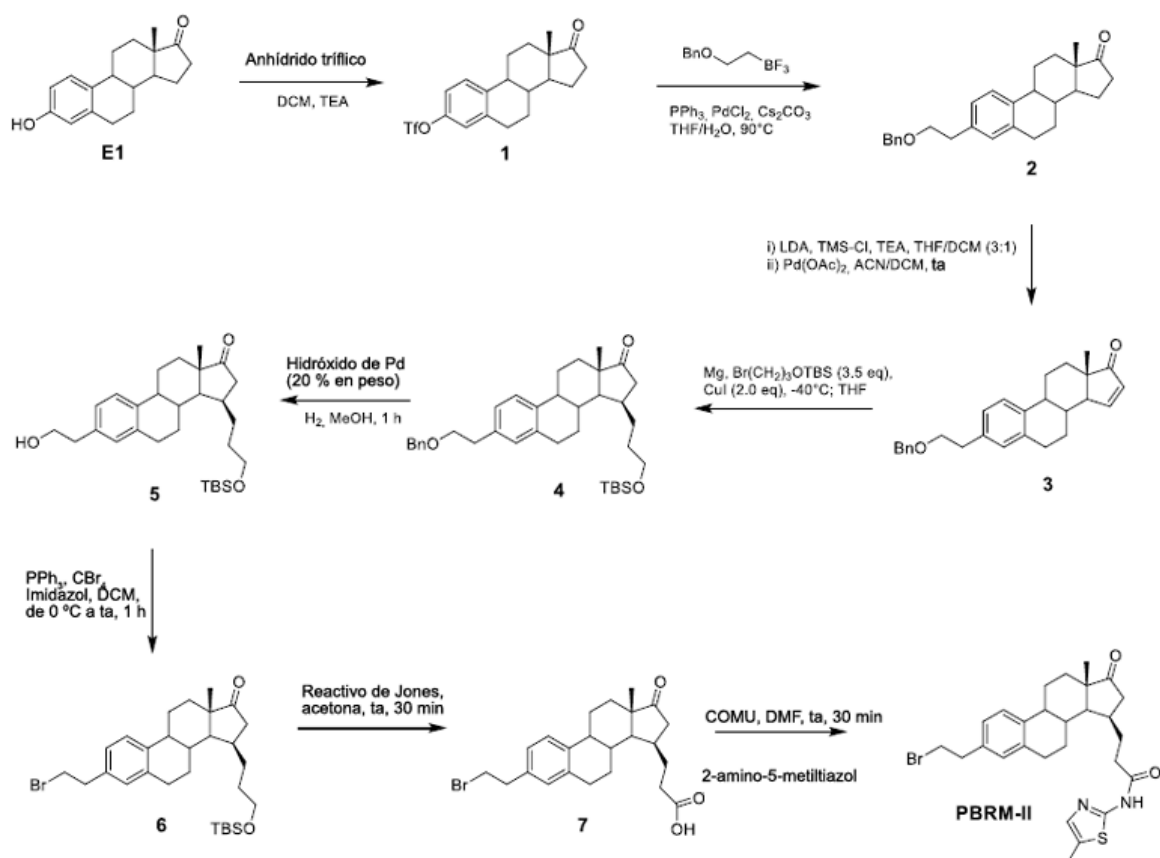
Se registraron espectros infrarrojos (IR) en un espectrómetro Horizon MB 3000 ABB FTIR (Quebec, QC, Canadá), y sólo se notifican las bandas significativas (en cm^{-1}).

Se registraron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) a 300 MHz y 400 MHz para ^1H y a 75 MHz y 100,6 MHz para ^{13}C en un espectrómetro digital Bruker Avance NEO 300 y Avance 400 (Billerica, MA, EE. UU.). Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm y con referencia a cloroformo (7,26 y 77,0 ppm), acetona (2,05 y 28,9 ppm), metanol (3,31 y 49,0 ppm) o dimetilsulfóxido (2,49 y 39,5 ppm) para ^1H y ^{13}C -RMN, respectivamente.

Se realizaron análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) para determinar purezas químicas en un instrumento Shimadzu Prominence (Kioto, Japón) usando un detector de red de diodos y una columna de fase inversa analítica Altima C18 (5 μm , 4,6 X 250 mm) aplicando las condiciones mencionadas (detección de longitud de onda y gradiente de disolvente).

Se registraron espectros de masas de baja resolución (LRMS) en un instrumento Shimadzu Prominence (Kioto, Japón) equipado con un espectrómetro de masas Shimadzu LCMS-2020 y una sonda de APCI (ionización química a presión atmosférica) y se expresaron en m/z . El departamento *Plateforme de diffraction des rayons X* (departamento de química, Universidad de Montreal, Montreal, QC, Canadá) realizó el análisis de rayos X.

II. Síntesis del compuesto de la invención 3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-II)



Esquema 3. Síntesis de PBRM-II. Reactivos y condiciones.

Trifluorometanosulfonato de 17-oxoestra-1(10),2,4-trien-3-ilo (**1**)

Este compuesto se preparó siguiendo un procedimiento de la bibliografía (*R. Maltais et al. Org. Process Res. Dev. 2019, 23, 11, 2323-2334*). Los datos de ¹H-RMN concordaban completamente con los notificados en la bibliografía.

3-[2-(benciloxi)etil]estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**2**)

Este compuesto se preparó siguiendo un procedimiento de la bibliografía (*R. Maltais et al. Org. Process Res. Dev. 2019, 23, 11, 2323-2334*). Los datos de ¹H-RMN concordaban completamente con los notificados en la bibliografía.

3-[2-(benciloxi)etil]estra-1(10),2,4,15-tetraen-17-ona (**3**)

A una disolución de compuesto **2** (2,6 g, 6,7 mmol) en THF anhidro (130 ml) se le añadió gota a gota diisopropilamida de litio (LDA) 1,5 M en THF (8,92 ml, 13,4 mmol) a -78 °C bajo una

atmósfera de argón. Se agitó la disolución durante 40 min y se añadieron secuencialmente trimetilamina (TEA) (2,74 ml, 20,1 mmol) y cloruro de trimetilsililo (TMSCl) (2,54 ml, 20,0 mmol). Después se calentó la disolución hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 min adicionales. Se vertió la disolución resultante en una disolución de bicarbonato de sodio al 10 % y se extrajo con DCM. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. Se diluyó el compuesto bruto en una mezcla de ACN/DCM (64 ml/16 ml), se añadió Pd(OAc)₂ (1,5 g, 6,7 mmol) y se agitó la disolución durante 1 h a 40 °C. Se evaporó la disolución resultante y se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (2:8) para dar 1,4 g (54 %) de compuesto **3**.

¹H-RMN (CDCl₃): 1,11 (s, 3H), 1,47-2,54 (m, 8H), 2,89 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 2,95 (m, 2H), 3,69 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 4,54 (s, 2H), 6,09 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz), 6,99 (s, 1H), 7,04 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz), 7,22 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz), 7,33 (m, 5H), 7,63 (d, 1H, *J* = 5,7 Hz). ¹³C-RMN (acetona-d₆): 20,3, 25,2, 26,5, 31,7, 35,5, 35,6, 45,3, 51,0, 55,9, 71,2, 72,2, 124,8, 126,4, 127,4 (3C), 128,2 (2C), 129,4, 131,3, 136,0, 136,6, 137,5, 139,1, 158,1, 211,2; LRMS para C₂₇H₃₁O₂ [M + H]⁺ 387,2 m/z.

3-[2-(benciloxi)etil]-15β-(3-{[*terc*-butil(dimetil)silil]oxi}propil)estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**4**)

Se depositaron polvo de magnesio (0,1-0,3 mm) (282 mg, 11,8 mmol) y un cristal de yoduro en un matraz de fondo redondo de 100 ml y se secaron con llama bajo una atmósfera de argón y seguido por adición gota a gota (a lo largo de 20 min) de una disolución de 2-(3-bromopropoxi)-*terc*-butildimetilsilano (2,29 g, 9,04 mmol) en THF anhidro (40 ml) a temperatura ambiente. Después se agitó la disolución durante 90 min a temperatura ambiente. Se dejó reposar la disolución gris turbia resultante 5 min hasta que se acumuló un depósito negro sólido en el fondo del matraz. Después se transfirió la disolución mediante una cánula a un matraz de fondo redondo secado con llama de 200 ml y sin transferir el depósito sólido negro. Se enfrió la disolución a -40 °C y después se añadió CuI (984 mg, 5,18 mmol) rápidamente de una vez. Se agitó vigorosamente la disolución durante 15 min a esta temperatura y el color de la disolución cambió gradualmente de gris pálido a color púrpura-gris pálido. Después se añadió gota a gota una disolución de compuesto **3** (1,0 g, 2,59 mmol) en THF anhidro (40 ml) a lo largo de 70 min a -40 °C (1 gota cada 4-5 segundos) y después se agitó a -40 °C durante 15 min adicionales. Después se añadió gota a gota ácido acético glacial (1,0 ml) a -40 °C y se agitó durante 30 min a esta temperatura. Se vertió la disolución resultante en una disolución de cloruro de amonio al 10 % y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 2,3 g de material bruto. Se purificó el compuesto bruto mediante

cromatografía ultrarrápida con EtOAc/hexanos (de 5:95 a 10:90) para dar 1,02 g (70 %) de compuesto **4**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 0,09 (s, 6H), 0,93 (s, 9H), 1,05 (s, 3H), 1,42-2,38 (m, 15H), 2,83-2,93 (m, 5H), 3,66-3,74 (m, 4H), 4,53 (s, 2H), 6,99 (s, 1H), 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23-7,35 (m, 5H). ^{13}C -RMN (acetona- d_6): -6,0 (2C), 17,2, 17,9, 25,3, 25,4 (3C), 26,6, 27,0, 29,1, 32,6, 33,9, 34,1, 35,6, 36,0, 42,0, 44,9, 46,7, 52,7, 62,2, 71,2, 72,3, 124,9, 125,1, 126,3, 127,2, 127,4 (2C), 128,1 (2C), 129,4, 136,1, 136,5, 137,8, 139,1, ~220,0; LRMS para $\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 562,4 m/z.

15 β -(3-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}propil)-3-(2-hidroxietil)estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**5**)

Al compuesto **4** (6,0 g, 10,7 mmol) en una mezcla de MeOH/DCM (270 ml/30 ml) a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de argón se le añadió hidróxido de paladio (20 % en peso) sobre carbón (600 mg). Se purgó el matraz de fondo redondo tres veces con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h bajo una atmósfera de hidrógeno. Se filtró la disolución resultante sobre Celite, se lavó con MeOH y se evaporó a presión reducida para dar 5,0 g de compuesto bruto **5**. Se evaporó el compuesto dos veces con DCM para eliminar las trazas residuales de MeOH. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida con EtOAc/hexanos (4:6) para dar 3,5 g (70 %) de compuesto **5**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 0,08 (s, 6H), 0,92 (s, 9H), 1,05 (s, 3H), 1,43-2,43 (m, 16H), 2,73-2,94 (m, 5H), 3,66-3,77 (m, 4H), 6,97 (s, 1H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,21 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz). ^{13}C -RMN (acetona- d_6): -6,0 (2C), 17,2, 17,9, 25,3, 25,4 (3C), 26,7, 27,0, 29,1, 32,6, 33,9, 34,1, 36,0, 39,0, 42,0, 44,9, 46,7, 52,7, 62,3, 63,1, 124,8, 126,3, 129,4, 136,1, 136,8, 137,8, ~220,0; LRMS para $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 471,3 m/z.

3-(2-bromoetil)-15 β -(3-{[*tert*-butil(dimetil)silil]oxi}propil)estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**6**)

A una disolución de compuesto bruto **5** (3,45 g, 7,32 mmol) en DCM (300 ml) a 0 °C se le añadieron imidazol (4,98 g, 73,1 mmol) y trifenilfosfina (7,8 g, 29,7 mmol). A esta última disolución se le añadió lentamente (a lo largo de 2 min) a 0 °C una disolución de tetrabromuro de carbono (9,8 g, 29,7 mmol) diluido en DCM (30 ml). Se agitó la disolución a 0 °C durante 5 min y después se dejó volver hasta temperatura ambiente y se agitó durante 45 min. Se vertió la disolución resultante en disolución de bicarbonato de sodio (10 %), se extrajo con DCM, se filtró sobre una jeringa de separador de fases y se evaporó a presión reducida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (1:9) dio 2,93 g (75 %) de compuesto bromado **6**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 0,08 (s, 6H), 0,93 (s, 9H), 1,05 (s, 3H), 1,44-2,44 (m, 16H), 2,79-2,96 (m, 2H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,64-3,74 (m, 2H), 7,03 (s, 1H), 7,06

(d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,26 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz). ^{13}C -RMN (acetona- d_6): -6,0 (2C), 17,2, 17,9, 25,2, 25,4 (3C), 26,6, 27,0, 29,1, 32,6, 33,3, 33,9, 34,1, 35,9, 38,7, 42,0, 44,9, 46,7, 52,7, 62,3, 125,1, 126,0, 129,1, 136,4, 136,5, 138,6, $\sim 220,0$; LRMS para $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{BrO}_2\text{Si}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 533,2 y 535,1 m/z.

Ácido 3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]propanoico (7)

A una disolución de compuesto **6** (2,93 g, 5,49 mmol) en acetona (300 ml) a 0 °C se le añadieron reactivos de Jones (3,0 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 30 min a esta temperatura. Se extinguió la disolución resultante con isopropanol (5 ml), se agitó durante 15 min, y después se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 2,4 g de compuesto bruto que se usó como tal para la siguiente etapa.

^1H -RMN (acetona- d_6): 1,07 (s, 3H), 1,39-2,46 (m, 17H), 2,92 (m, 2H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,03 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,26 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 10,6 (s amplio, 1H). ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 17,1, 25,2, 25,8, 26,5, 29,0, 32,8, 33,4, 33,7, 34,1, 35,8, 38,7, 41,4, 45,0, 46,6, 52,6, 125,1, 126,0, 129,1, 136,4, 136,6, 138,6, 173,7, $\sim 220,0$; LRMS para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{BrO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 433,1 y 435,1 m/z.

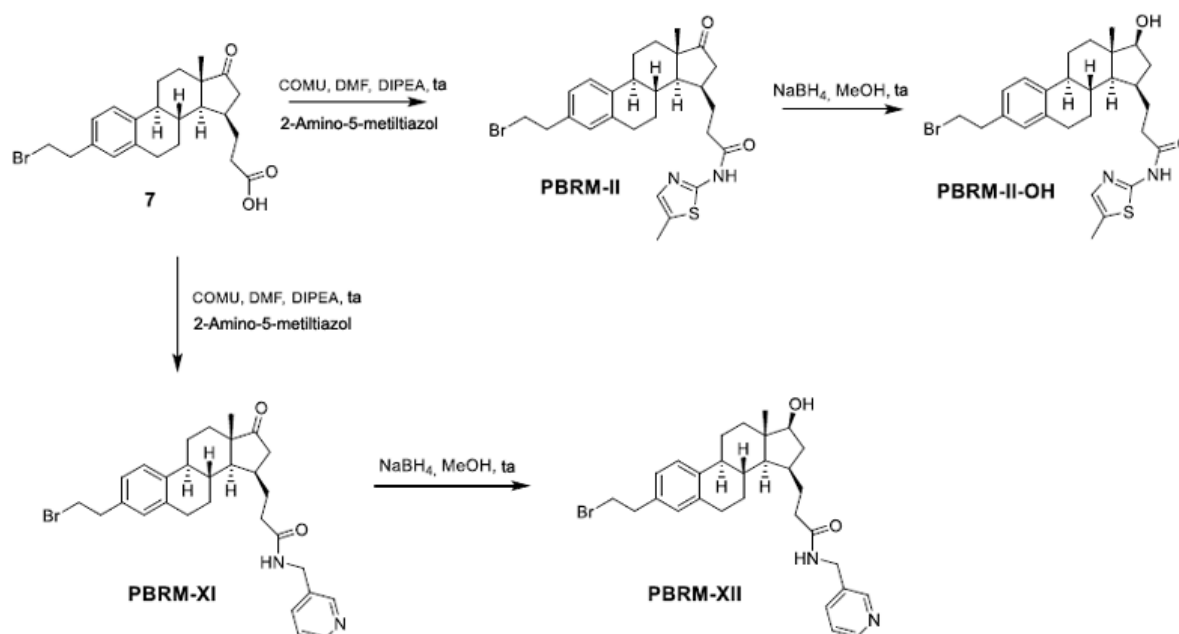
3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-II)

A una disolución de compuesto **7** (900 mg, 2,08 mmol) en DMF anhidra (5 ml) se le añadió hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU) (978 mg, 2,28 mmol) y se agitó la mezcla durante 5 min antes de la adición de 2-amino-5-metiltiazol (474 mg, 4,15 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA) (723 μl , 4,6 mmol). Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 30 min. Después se vertió la disolución en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (de 1:1 a 7:3) para dar 835 mg (76 %) de **PBRM-II**.

^1H -RMN (CDCl_3): 1,06 (s, 3H), 1,42-2,65 (m, 16H), 2,42 (s, 3H), 2,93 (m, 2H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 3,56 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 6,96 (s, 1H), 7,00 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 7,24 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 11,0 (s, 1H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 11,6, 17,8, 25,3, 26,1, 26,7, 29,2, 33,0, 33,8, 33,9, 35,5, 35,7, 39,0, 42,0, 45,0, 47,1, 52,8, 125,3, 126,0, 127,8, 129,2, 133,0, 136,5, 136,7, 138,5, 158,2, 170,1, 220,2; LRMS para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 529,2 y 531,2 m/z. Pureza mediante HPLC = 98,7 %.

III. Síntesis de otros compuestos de la invención

Síntesis química de **PBRM-II-OH**, **PBRM-XI** y **PBRM-XII**



Esquema 4. Síntesis de **PBRM-II-OH**, **PBRM-XI** y **PBRM-XII**. Reactivos y condiciones

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (**PBRM-II-OH**)

A una disolución de **PBRM-II** (50 mg, 0,094 mmol) en MeOH (3 ml) se le añadió borohidruro de sodio (11 mg, 0,028 mmol). Se agitó la disolución resultante a 0 °C durante 1 h antes de verterse en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (de 8:2 a 10:0) para dar 40 mg (80 %) de **PBRM-II-OH**.

¹H-RMN (CDCl₃): 0,90 (s, 3H), 1,20-2,62 (m, 17H), 2,85 m, 2H), 3,10 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz), 3,55 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz), 3,73 (t, 1H, *J* = 8,6 Hz), 6,93 (s, 1H), 6,98 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,05 (d, 1H, *J* = 0,8 Hz), 7,23 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 12,1 (s, 1H); ¹³C-RMN (CDCl₃): 11,6, 14,6, 25,4, 27,6, 27,7, 29,3, 33,0, 35,0, 35,1, 35,7, 38,0, 38,6, 39,0, 43,0, 45,0, 52,0, 81,7, 125,2, 125,9, 127,4, 129,1, 133,0, 136,3, 137,1, 139,2, 158,3, 170,8; LRMS para C₂₇H₃₆BrN₂O₂S [M + H]⁺ 531,0 y 533,0 m/z. Pureza mediante HPLC = 99,4 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida

(PBRM-XI)

A una disolución de compuesto **7** (50 mg, 0,094 mmol) en DMF anhidra (2 ml) se le añadió hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU) (45 mg, 0,105 mmol) y se agitó la mezcla durante 5 min antes de la adición de 1-(piridin-3-il)metanamina (474 mg, 4,15 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA) (55 μ l, 0,32 mmol). Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 30 min. Después se vertió la disolución en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando DCM/MeOH (de 95:5 a 9:1) para dar 55 mg (95 %) de **PBRM-XI**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 1,04 (s, 3H), 1,30-2,48 (m, 18H), 2,89 (m, 2H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 4,44 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz), 7,02 (s, 1H), 7,05 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,25 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,30 (m, 1H), 7,72 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz), 8,46 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz), 8,55 (s, 1H); ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 17,2, 25,2, 26,4, 26,6, 29,0, 33,4, 33,8, 34,1, 35,2, 35,8, 38,7, 40,3, 41,6, 44,9, 46,7, 52,7, 123,3, 125,1, 126,0, 129,2, 135,0 (2C), 136,4, 136,6, 138,6, 148,3, 149,2, 172,1, $\sim 220,0$; LRMS para $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 523,2 y 525,2 m/z. Pureza mediante HPLC = 99,2 %.

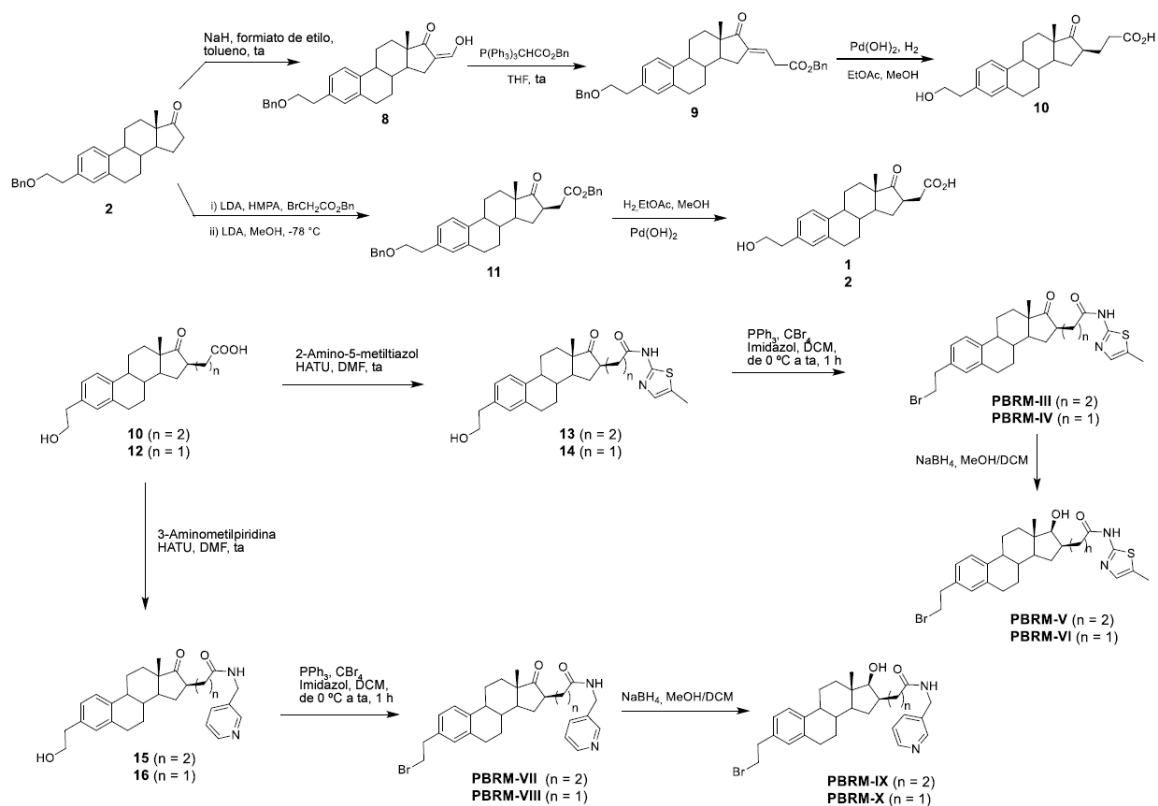
3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida

(PBRM-XII)

A una disolución de **PBRM-XI** (20 mg, 0,032 mmol) en MeOH (1 ml) se le añadió borohidruro de sodio (4 mg, 0,105 mmol). Se agitó la disolución resultante a 0 $^\circ\text{C}$ durante 1 h antes de verterse en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando DCM/MeOH (94:6) para dar 8 mg (40 %) de **PBRM-XII**.

^1H -RMN (MeOH- d_4): 0,88 (s, 3H), 1,23-2,33 (m, 18H), 2,83 (m, 2H), 3,06 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,56 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,64 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz), 4,40 (s, 1H), 4,60 (s.a., 1H), 6,93 (s, 1H), 6,96 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,20 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,41 (dd, 1H, $J_1 = 4,9$ Hz, $J_2 = 7,8$ Hz), 7,79 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 8,43 (s.a., 1H), 8,49 (s.a., 1H); ^{13}C -RMN (MeOH- d_4): 15,3, 26,7, 28,8, 30,0, 30,3, 33,9, 36,1 (2C), 37,2, 38,5, 40,0, 40,1, 41,6, 44,1, 46,3, 53,2, 82,5, 125,3, 126,1, 126,9, 130,1, 136,9, 137,6, 137,7, 138,0, 140,4, 148,8, 149,5, 176,2; LRMS para $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 525,1 y 527,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 98,2 %.

Síntesis química de PBRM-III a PBRM-X



Esquema 5. Síntesis de PBRM-III a PBRM-X a partir del compuesto intermedio **2**. Reactivos y condiciones. PBRM-VI no se obtuvo a partir de PBRM-IV.

3-[2-(benciloxi)etil]-16-(hidroximetilene)-estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**8**)

A una disolución enfriada con hielo de compuesto **2** (500 mg, 1,29 mmol) en tolueno (7 ml) se le añadió NaH (al 60 % en aceite mineral, 731 mg, 12,9 mmol). Se añadió formiato de etilo (1 ml, 12,9 mmol) a la suspensión y se continuó agitando durante la noche a temperatura ambiente. Se extinguió la disolución con una disolución de HCl al 10 % y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el residuo aceitoso mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (1:4) para dar 424 mg (79 %) de compuesto **8** como un jarabe.

1H -RMN (DMSO- d_6): 0,79 (s, 3H), 1,33-2,60 (m, 11H), 2,73-2,80 (m, 4H), 3,58 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz), 4,45 (s, 2H), 6,91 (s, 1H), 6,96 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,16 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,25-7,34 (m, 5H), 7,38 (s, 1H), 10,59 (s.a., 1H); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6): 14,3, 24,0, 25,4, 26,2, 28,8, 31,4, 35,0, 37,2, 43,8, 47,7, 48,4, 70,6, 71,7, 113,2, 124,9, 126,1, 127,2, 127,3, 127,4, 128,2 (2C), 129,1, 135,9, 136,0, 137,4, 138,5, 150,1, 208,6.

(E)-3-[3-(2-(benciloxi)etil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16-iliden]propanoato de bencilo (9)

A una disolución de compuesto **8** (540 mg, 1,3 mmol) en THF (5 ml) se le añadió (trifenilfosforaniliden)acetato de bencilo (640 mg, 1,56 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Tras la evaporación, se purificó el material bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (1:9) para dar éster bencilico **9** (570 mg, 80 %) como un jarabe y una mezcla de isómeros E (83 %) y Z (17 %).

^1H -RMN (CDCl_3): 0,96 (s, 3H), 1,40-2,55 (m, 11H), 2,62-2,75 (m, 1H), 2,92-2,97 (m, 4H), 3,32 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz), 3,75 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 4,59 (s, 2H), 5,22 (s, 2H), 6,84 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,04 (s, 1H), 7,09 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,28 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,34-7,42 (m, 10H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 14,2, 25,6, 26,3, 26,6, 29,2, 31,4, 35,0, 35,7, 37,6, 44,1, 47,6, 48,3, 66,7, 71,1, 72,8, 125,2, 126,3, 127,2, 127,3, 127,4, 127,5, 128,0, 128,1, 128,2, 128,3, 128,4, 129,4, 135,4, 136,1, 136,2, 136,3, 137,1, 137,4, 138,3, 139,9, 169,7, 207,6; LRMS para $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 549,3 m/z.

Ácido 3-[3-(2-hidroxietil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]propanoico (10)

A una disolución de compuesto **9** (300 mg, 0,53 mmol) en una mezcla de EtOAc/MeOH 1:1 (10 ml) bajo una atmósfera de argón se le añadió hidróxido de paladio sobre carbono (carga del 20 % en peso, 60 mg). Se purgó el matraz tres veces con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se filtró la suspensión sobre Celite, se lavó con MeOH y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando MeOH/DCM (de 1:99 a 7:93) para dar 161 mg (82 %) de ácido **10**.

^1H -RMN (CDCl_3): 0,87 (s, 3H), 1,37-2,48 (m, 14H), 2,51 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 2,81 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz), 2,88-2,91 (m, 2H), 3,85 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz), 5,88 (s.a., 1H), 6,97 (s, 1H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 14,0, 25,5, 26,6, 27,3, 28,4, 29,3, 31,8, 32,3 (2C), 37,6, 44,3, 48,1, 48,4, 48,8, 63,5, 125,4, 126,4, 129,6, 135,8, 136,5, 137,8, 178,2, ~219,0; LRMS para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 371,2 m/z.

3-[3-(2-(benciloxi)etil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]acetato de bencilo (11)

A una disolución enfriada con hielo de compuesto **2** (1,5 g, 3,86 mmol) en THF anhidro (20 ml) se le añadió, bajo argón, LDA (1,8 M en THF, 2,8 ml, 5 mmol). Se agitó la disolución de color amarillo oscuro resultante durante 1 h, después se sustituyó el baño de enfriamiento en hielo por un baño de hielo seco-acetona. Después de 10 min, se añadió una disolución de HMPA anhidra (0,77 ml, 5 mmol) y bromoacetato de bencilo (0,79 ml, 5 mmol) en THF anhidro (5 ml) a la mezcla. Después se retiró el baño de enfriamiento y se agitó la mezcla durante 3 h antes de extinguirse con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . Después de extracciones con EtOAc, se lavó la fase orgánica combinada con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de

sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc/hexanos 5:95) para proporcionar 0,77 g de cetona recuperada (30 %) seguido por 1,4 g (42 %) de producto alquilado en la posición 16 como una mezcla de dos diastereoisómeros 16 α /16 β en proporciones 90:10. Sólo se notifican datos para el diastereoisómero 16 α principal. ^1H -RMN (CDCl_3): 0,97 (s, 3H), 1,43-2,43 (m, 13H), 2,85-2,90 (m, 4H), 2,93-3,03 (m, 1H), 3,71 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz), 4,54 (s, 2H), 5,15 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,20 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,28-7,38 (m, 10H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 14,5, 25,5, 26,3, 27,7, 29,3, 31,5, 35,5, 35,7, 38,1, 40,9, 44,2, 47,7, 48,2, 66,5, 71,2, 72,9, 125,3, 126,3, 127,5, 127,6 (2C), 128,2 (2C), 128,3 (3C), 128,5 (2C), 129,5, 135,7, 136,3 (2C), 137,5, 138,4, 172,2, $\sim 219,0$. A una disolución enfriada con hielo del esteroide alquilado en la posición 16 anterior (769 mg, 1,4 mmol) en THF anhidro (20 ml) se le añadió lentamente, bajo argón, LDA comercial (1,8 M en THF, 0,6 ml, 14 mmol). Después de 1 h de agitación, se enfrió la disolución amarillenta, que se volvió marrón gradualmente, a -78°C . Se añadió lentamente MeOH anhidro (0,6 ml, 14 mmol) en THF (5 ml) y se agitó la mezcla resultante a -78°C durante 1 h antes de extinguirse con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl . Después de extracciones con EtOAc, se lavó la fase orgánica combinada con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (5:95) para proporcionar (301 mg, 39 %) de compuesto alquilado en la posición 16 β **11** que contiene el 12 % del diastereoisómero 16 α .

^1H -RMN (CDCl_3): 0,86 (s, 3H), 1,16-2,67 (m, 13H), 2,86-2,93 (m, 4H), 2,96 (dd, 1H, $J_1 = 4,0$ y $J_2 = 16,0$ Hz), 3,69 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz), 4,54 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,25-7,38 (m, 10H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 14,2, 25,5, 26,6, 28,7, 29,2, 31,8, 35,7, 36,4, 37,6, 44,3, 45,6, 48,3, 49,1, 66,5, 71,2, 72,8, 125,2, 126,3, 127,5, 127,6 (2C), 128,2 (3C), 128,3 (2C), 128,5 (2C), 129,5, 135,7, 136,3 (2C), 137,5, 138,4, 172,0, $\sim 219,0$. LRMS para $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 537,2 m/z.

Ácido 3-[3-(2-hidroxietil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]acético (**12**)

A una disolución de compuesto **11** (301 mg, 0,56 mmol) en una mezcla de EtOAc/MeOH 1:1 (10 ml) bajo una atmósfera de argón se le añadió hidróxido de paladio sobre carbono (carga del 20 % en peso, 30 mg). Se purgó el matraz tres veces con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se filtró la suspensión sobre Celite, se lavó con MeOH y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando MeOH/DCM (de 1:99 a 4:96) para dar 108 mg (54 %) de ácido **12**.

^1H -RMN (CDCl_3): 0,89 (s, 3H), 1,40-2,65 (m, 13H), 2,82 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 2,88-2,99 (m, 3H), 3,86 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 6,98 (s, 1H), 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,24 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); ^{13}C -

RMN (CDCl_3): 14,3, 25,6, 26,7, 28,8, 29,3, 31,9, 36,1, 37,6, 38,6, 44,4, 45,5, 48,5, 49,2, 63,7, 125,5, 126,5, 129,7, 135,9, 136,7, 137,8, 176,8, $\sim 219,0$; LRMS para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 357,2 m/z.

3-[3-(2-hidroxiletil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (13)

A una disolución de compuesto **10** (255 mg, 0,7 mmol) en DMF anhidra (1 ml) se le añadió HATU (364 mg, 0,96 mmol). Después de 10 min de agitación a temperatura ambiente, se añadió 5-metil-1,3-tiazol (111 mg, 0,96 mmol) seguido por DIPEA (366 μl , 2,1 mmol). Se agitó la mezcla resultante amarilla durante la noche a temperatura ambiente. Tras la dilución con agua y extracción con EtOAc, se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida usando acetona/hexanos (3:7) para dar 195 mg (60 %) de amida **13** como una espuma.

^1H -RMN (CDCl_3): 0,90 (s, 3H), 1,38-2,38 (m, 14H), 2,41 (d, 3H, $J = 1,1$ Hz), 2,71 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 2,82 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 2,87-2,92 (m, 2H), 3,86 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 6,97 (s, 1H), 7,00 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,12 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); ^{13}C -RMN (MeOD): 11,3, 14,5, 26,9, 27,9, 28,8, 29,4, 30,4, 32,1, 34,8, 39,3, 39,8, 45,7, 49,7, 49,8, 50,1, 64,4, 126,2, 127,4, 128,6, 130,5, 135,4, 137,4 (2C), 138,8, 158,4, 172,8, $\sim 219,0$; LRMS para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 467,2 m/z.

3-[3-(2-hidroxiletil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (14)

Se preparó amida **14** tal como se describió para la preparación de compuesto **13**. Por tanto, empezando a partir de ácido **12** (61 mg, 0,17 mmol), se obtuvieron 55 mg (71 %) de amida **14** como espuma tras la cromatografía usando MeOH/DCM (0,5:99,5).

^1H -RMN (CDCl_3) (57:43 mezcla de 2 confórmeros): 0,62 y 0,90 (2s, 3H), 1,39-2,53 (m, 12H), 2,40 y 2,41 (2d, 3H, $J = 1,0$ Hz), 2,63-2,73 (m, 1H), 2,68-2,93 (m, 4H), 3,01-3,19 (m, 1H), 3,81-3,87 (m, 2H), 6,95 y 6,96 (2s, 1H), 6,98-7,03 (m, 1H), 7,09 y 7,14 (2d, 1H, $J = 1,1$ Hz), 7,22 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); ^{13}C -RMN (CDCl_3) (57:43 mezcla de 2 confórmeros): 11,5, 11,6, 14,4, 14,6, 25,6, 26,4, 26,7, 27,4, 28,9, 29,3, 29,4, 31,9, 33,4, 33,6, 37,6, 38,2, 38,6, 38,7, 42,7, 43,5, 44,4, 45,9, 48,5, 49,2, 49,3, 50,7, 63,6, 125,5, 125,6, 126,3, 126,4, 127,5, 127,9, 129,6, 129,7, 133,6, 133,8, 135,8, 136,0, 136,6, 136,7, 137,8, 138,1, 156,1, 157,8, 169,2, 172,5, $\sim 219,0$; LRMS para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 453,2 m/z.

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)propanamida (PBRM-III)

Se preparó **PBRM-III** tal como se describió para la preparación de compuesto **6**. Por tanto, la bromación de amida **13** (195 mg, 0,42 mmol) dio 57 mg (26 %) de **PBRM-III** como un sólido tras la cromatografía usando acetona/DCM (5:95).

^1H -RMN (acetona- d_6): 0,91 (s, 3H), 1,39-2,45 (m, 14H), 2,38 (s, 3H), 2,69 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 2,80-2,92 (m, 2H), 3,10 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 7,00 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,07 (s, 1H), 7,26 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 10,4, 13,5, 25,5, 26,6, 27,7, 28,2, 29,2, 32,0, 33,3, 33,7, 37,8, 38,7, 44,4, 48,1, 48,2, 48,7, 125,4, 126,0, 126,5, 129,2, 134,6, 136,3, 136,5, 138,3, 156,4, 170,2, ~219,0; LRMS para $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 529,1 y 531,5 m/z. Pureza mediante HPLC = 94,8 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida
(**PBRM-IV**)

Se preparó **PBRM-IV** tal como se describió para la preparación de compuesto **6**. Por tanto, la bromación de amida **14** (50 mg, 0,11 mmol) dio 25 mg (32 %) de **PBRM-IV** como un sólido blanco tras la cromatografía usando acetona/DCM (5:95).

^1H -RMN (CDCl_3): 0,63 (s, 3H), 1,12-2,46 (m, 11H), 2,42 (s, 3H), 2,63-2,73 (m, 1H), 2,83-2,93 (m, 2H), 3,04-3,16 (m, 3H), 3,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 5,93 (s.a., 1H), 6,93 (s, 1H), 6,99 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz), 7,09 (s, 1H), 7,23 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 11,5, 14,6, 26,4, 27,4, 29,4, 33,0, 33,4, 33,6, 38,6, 38,7, 39,0, 42,7, 43,6, 49,3, 50,7, 125,6, 126,0, 128,0, 129,2, 133,8, 136,3, 136,8, 138,6, 156,1, 172,5, ~219,0; LRMS para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 515,1 y 517,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 99,9 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida
(**PBRM-V**)

Se preparó **PBRM-V** tal como se describió para la preparación de **PBRM-XII**. Por tanto, la reducción de **PBRM-III** (50 mg, 0,09 mmol) con NaBH_4 dio 10,3 mg (20 %) de **PBRM-V** como un sólido blanco tras la recristalización (MeOH).

^1H -RMN (CDCl_3): 0,80 (s, 3H), 1,02-2,38 (m, 12H), 2,41 (s, 3H), 2,53-2,63 (m, 2H), 2,83-2,87 (m, 2H), 3,10 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz), 3,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,81 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz), 6,93 (s, 1H), 6,99 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,08 (s, 1H), 7,25 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 11,6, 12,4, 26,0, 27,4 (2C), 29,5, 32,6, 33,0, 35,6, 37,6, 38,0, 39,0, 39,5, 44,2, 44,3, 48,7, 82,0, 125,6, 125,9, 126,6, 129,2, 133,6, 136,2, 136,9, 138,9, 157,4, 170,9. LRMS para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 531,1 y 533,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 96,3 %.

3-[3-(2-hidroxietil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (**15**)

A una disolución de compuesto **10** (74 mg, 0,2 mmol) en DMF anhidra (0,2 ml) se le añadió HATU (114 mg, 0,3 mmol). Después de 10 min de agitación a temperatura ambiente, se añadió 1-(piridin-3-il)metanamina (32 mg, 0,3 mmol) seguido por DIPEA (103 µl, 0,4 mmol). Se agitó la mezcla resultante amarilla durante la noche a temperatura ambiente. Tras la dilución con agua y extracción con EtOAc, se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía usando MeOH/DCM (4:96) para dar 70 mg (70 %) de amida **13** como una espuma.

¹H-RMN (acetona-d₆): 0,85 (s, 3H), 1,32-2,30 (m, 13H), 2,35-2,42 (m, 3H), 2,75 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 2,83-2,86 (m, 2H), 3,74 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 4,43 (d, 2H, *J* = 5,9 Hz), 6,95 (s, 1H), 6,99 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,19 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz), 7,29-7,33 (m, 1H), 7,71 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 7,82 (t.a., 1H), 8,46 (s.a., 1H), 8,56 (s.a., 1H). ¹³C-RMN (acetona-d₆): 13,6, 25,6, 26,6, 28,2, 28,3, 29,2, 32,0, 34,2, 37,8, 39,0, 40,3, 44,4, 48,1, 48,4, 48,8, 63,1, 123,4, 125,1, 126,3, 129,5, 135,1, 135,4, 136,1, 136,7, 137,4, 148,2, 149,2, 172,1, ~219,0; LRMS para C₂₉H₃₇N₂O₃ [M + H]⁺ 461,2 m/z.

3-[3-(2-hidroxietil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16β-il]-N-[(piridin-3-il)metil]acetamida (**16**)

Se preparó amida **16** tal como se describió para la preparación de compuesto **15**. Por tanto, empezando a partir de ácido **12** (45 mg, 0,13 mmol), se obtuvieron 35 mg (57 %) de amida **15** como una espuma tras la cromatografía usando MeOH/DCM (4:96).

¹H-RMN (CDCl₃): 0,82 (s, 3H), 1,35-2,46 (m, 12H), 2,52-2,65 (m, 1H), 2,71 (dd, 1H, *J*₁ = 5,6 y *J*₂ = 14,6 Hz), 2,80 (t, 1H, *J* = 6,6 Hz), 2,84-2,92 (m, 2H), 3,83 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz), 4,43 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz), 6,95-7,02 (m, 3H), 7,20 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,26 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 7,64 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 8,46-8,50 (m, 2H); ¹³C-RMN (CDCl₃): 14,2, 25,5, 26,6, 29,0, 29,2, 31,8, 37,5, 38,3, 38,6, 41,0, 44,2, 46,1, 48,5, 48,9, 63,5, 123,5, 125,3, 126,3, 129,6, 134,0, 135,6, 136,0, 136,5, 137,6, 148,6, 149,0, 171,3, ~219,0; LRMS para C₂₈H₃₅N₂O₃ [M + H]⁺ 447,2 m/z.

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16β-il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (**PBRM-VII**)

Se preparó **PBRM-VII** tal como se describió para la preparación de compuesto **6**. Por tanto, la bromación de amida **15** (63 mg, 0,12 mmol) dio 24 mg (34 %) de **PBRM-VII** como un sólido amarillo tras la cromatografía usando acetona/dietil éter/DCM (4:20:80).

¹H-RMN (acetona-d₆): 0,88 (s, 3H), 1,30-2,35 (m, 12H), 2,39 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 2,83-2,90 (m, 3H), 3,10 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,66 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 4,43 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 7,01 (s, 1H), 7,05 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz), 7,25 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,31 (dd, 1H, *J* = 4,5 y 7,7 Hz), 7,71 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz), 8,46 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz), 8,55 (s.a., 1H); ¹³C-RMN (acetona-d₆): 13,5, 25,5, 26,5,

28,2, 28,4, 29,1, 32,0, 33,3, 34,1, 37,7, 38,7, 40,2, 44,4, 48,1, 48,3, 48,8, 123,2, 125,4, 126,0, 129,2, 135,0, 135,3, 136,3, 136,5, 138,3, 148,3, 149,2, 171,9, ~219,0; LRMS para $C_{29}H_{36}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 523,2 y 525,2 m/z. Pureza mediante HPLC = 71,1 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]acetamida (**PBRM-VIII**)

Se preparó **PBRM-VIII** tal como se describió para la preparación de compuesto **6**. Por tanto, la bromación de amida **16** (34 mg, 0,07 mmol) dio 19 mg (50 %) de **PBRM-VIII** como un sólido amarillo tras la cromatografía (acetona/éter/DCM (3:20:80)).

1H -RMN ($CDCl_3$): 0,84 (s, 3H), 1,38-2,42 (m, 12H), 2,56-2,65 (m, 1H), 2,72 (dd, 1H, $J = 5,8$ y 14,6 Hz), 2,88-2,92 (m, 2H), 3,10 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 4,45 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz), 6,73 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz), 6,94 (s, 1H), 6,99 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz), 7,65 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 8,53 (s.a., 2H); ^{13}C -RMN ($CDCl_3$): 14,3, 25,6, 26,7, 29,3, 31,9, 32,9 (2C), 37,6, 38,4, 39,0, 41,1, 44,4, 46,2, 48,6, 49,1, 123,6, 125,5, 126,0, 129,3, 135,0, 135,6, 136,4, 136,7, 138,3, 148,8, 149,2, 171,3, ~219,0; LRMS para $C_{28}H_{34}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 509,2 y 511,2 m/z. Pureza mediante HPLC = 92,2 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]propanamida (**PBRM-IX**)

Se preparó **PBRM-IX** tal como se describió para la preparación de **PBRM-XII**. Por tanto, la reducción de **PBRM-VII** (17 mg, 0,03 mmol) con $NaBH_4$ dio 13 mg (76 %) de **PBRM-IX** como una espuma blanca la cromatografía usando MeOH/DCM (8:92).

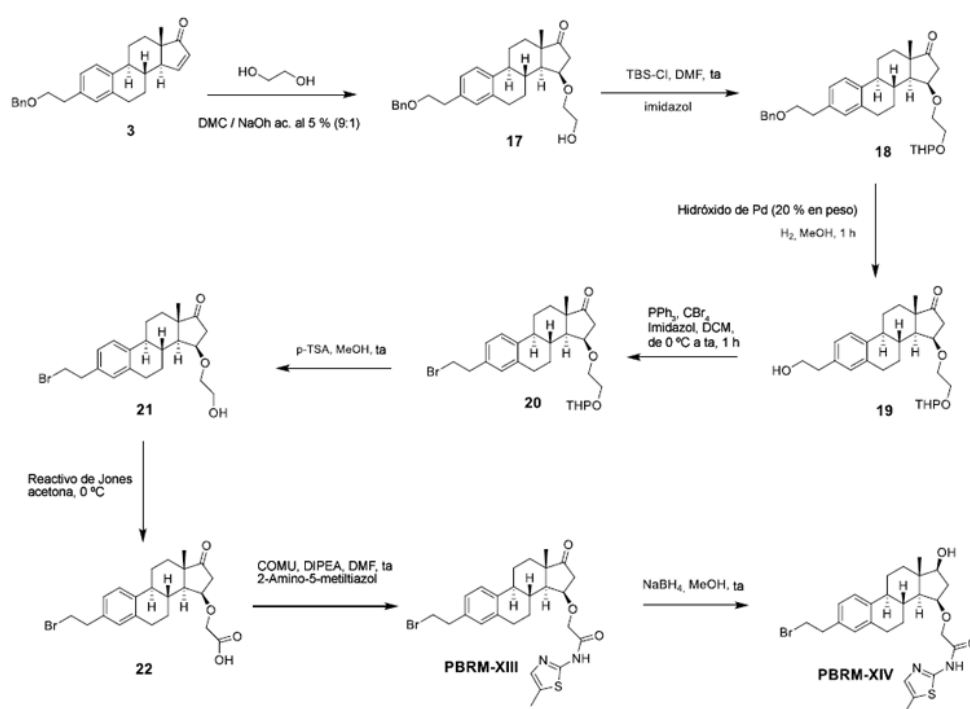
1H -RMN (acetona- d_6): 0,81 (s, 3H), 1,01-2,41 (m, 14H), 2,80-2,90 (4H enmascarados), 3,10 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 3,65 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,74 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz), 4,43 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz), 6,98 (s, 1H), 7,04 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz), 7,22-7,33 (m, 2H), 7,60 (s.a., 1H), 7,71 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 8,47 (s, 1H), 8,55 (s, 1H); ^{13}C -RMN ($DMSO-d_6$): 12,6, 25,7, 27,0, 28,1, 29,0, 31,8, 34,5, 34,9, 37,4, 37,8 (2C), 38,0, 43,6 (2C), 43,8, 48,2, 80,3, 123,4, 125,2, 125,9, 128,9, 135,0, 135,3, 135,8, 136,1, 138,5, 147,9, 148,7, 172,7; LRMS para $C_{29}H_{38}BrN_2O_2$ $[M + H]^+$ 525,1 y 527,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 91,4 %.

3-[3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-16 β -il]-N-[(piridin-3-il)metil]acetamida (**PBRM-X**)

Se preparó **PBRM-X** tal como se describió para la preparación de **PBRM-XII**. Por tanto, la reducción de **PBRM-VIII** (10 mg, 0,07 mmol) con $NaBH_4$ dio 3,3 mg (33 %) de **PBRM-X** como una espuma blanca tras la cromatografía usando MeOH/DCM (8:92).

^1H -RMN (CDCl_3): 0,79 (s, 3H), 1,08-2,38 (m, 12H), 2,56-2,66 (m, 1H), 2,77 (dd, 1H, $J_1 = 10,6$ y $J_2 = 14,7$ Hz), 2,83-2,88 (m, 2H), 3,10 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 3,55 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,88 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz), 4,46 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz), 6,22 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz), 6,92 (s, 1H), 7,01 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23-7,32 (m, 2H), 7,64 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 8,54 (s.a., 2H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 12,7, 26,0, 27,5, 29,5, 29,7, 32,8, 33,0, 37,8, 37,9, 38,6, 39,0, 41,2, 44,2, 44,3, 49,2, 80,8, 123,7, 125,6, 125,9, 129,2, 135,6 (2C), 136,1, 136,9, 139,0, 148,9, 149,1, 174,5; LRMS para $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 511,1 y 513,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 94,8 %.

Síntesis química de PBRM-XIII y PBRM-XIV



Esquema 6. Síntesis de PBRM-XIII y PBRM-XIV a partir de compuesto intermedio **3**. Reactivos y condiciones.

3-[2-(benciloxi)etil]-15 β -(2-hidroxietoxi)estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**17**)

A una disolución de compuesto **3** (700 mg, 1,81 mmol) en DCM (15 ml) se le añadieron etilenglicol (15 ml) y 1 ml de una disolución acuosa de NaOH (5 %). Se agitó vigorosamente la disolución a temperatura ambiente durante 72 h. Se diluyó la disolución resultante con DCM y se lavó con agua. Se secó la fase orgánica sobre un lecho de algodón y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (de 2:8 a 10:0) para dar 580 mg (72 %) de compuesto **17**.

^1H -RMN (CDCl_3): 1,19 (s, 3H), 1,40-2,47 (m, 12H), 2,91 (m, 4H), 3,45 (m, 1H), 3,70 (m, 5H), 4,26 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,56 (s, 2H), 7,00 (s, 1H), 7,04 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J =$

8,0 Hz), 7,29-7,39 (m, 5H); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 17,6, 25,6, 26,3, 29,2, 32,7, 34,8, 35,8, 43,2, 44,5, 47,3, 54,6, 62,0, 70,8, 71,3, 73,0, 75,3, 125,2, 126,4, 127,6, 127,7 (2C), 128,4 (2C), 129,6, 136,4 (2C), 137,7, 138,5, 219,3; LRMS para $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 449,2 m/z.

3-[2-(benciloxi)etil]-15 β -{2-[(oxan-2-il)oxi]etoxi}estra-1(10),2,4-trien-17-ona (18)

A una disolución de compuesto **17** (580 mg, 1,29 mmol) a 0 °C en DCM (15 ml) se le añadió 3,4-dihidro-2H-pirano (544 mg, 6,46 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (*p*-TSA) (3 mg, 0,015 mmol). Se agitó la disolución a 0 °C durante 10 min y después se dejó volver a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Después se vertió la disolución en una disolución saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (3:7 con TEA al 1 %) para dar 580 mg (84 %) de compuesto **18**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 1,17 y 1,18 (2s, 3H), 1,38-2,50 (m, 16H), 2,70-2,98 (m, 5H), 3,44 (m, 1H), 3,55 (m, 2H), 3,68 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 3,82 (m, 3H), 4,32 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,53 (s, 2H), 4,67 (m, 1H), 6,99 (s, 1H), 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,22 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,33 (m, 5H); ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 17,0, 19,0, 25,4, 25,6, 26,0, 29,1, 30,5, 32,8, 35,0, 35,6, 42,7, 44,5, 46,9, 54,2, 61,0, 66,3, 68,9, 71,2, 72,3, 75,0, 98,1, 125,0, 126,2, 127,2, 127,4 (2C), 128,1 (2C), 129,4, 136,2, 136,5, 137,7, 139,1, 217,9.

3-(2-hidroxietil)-15 β -{2-[(oxan-2-il)oxi]etoxi}estra-1(10),2,4-trien-17-ona (19)

A una disolución de compuesto **18** (500 mg, 0,94 mmol) en MeOH (30 ml) bajo una atmósfera de argón se le añadió hidróxido de paladio sobre carbono (carga del 20 % en peso) (50 mg). Se purgó el matraz tres veces con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después se filtró la suspensión sobre Celite, se lavó con MeOH y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (de 1:1 a 7:3; con TEA al 1 %) para dar 180 mg (45 %) de compuesto **19**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 1,17 y 1,18 (2s, 3H), 1,40-2,46 (m, 18H), 2,68-2,90 (m, 5H), 3,46 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 3,73 (m, 3H), 3,82 (m, 2H), 4,33 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz), 4,67 (m, 1H), 6,97 (s, 1H), 7,00 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,21 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); ^{13}C -RMN ($\text{DMSO}-\text{d}_6$): 17,2, 18,8, 25,0, 25,3, 28,8, 30,2, 32,3, 34,6, 42,1, 44,0, 46,5, 53,3, 56,5, 60,7, 62,2, 65,8, 68,0, 74,5, 76,0, 97,6, 124,9, 126,2, 129,2, 135,7, 136,5, 137,0, 219,0; LRMS para $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$ 461,2 m/z.

3-(2-bromoetil)-15 β -{2-[(oxan-2-il)oxi]etoxi}estra-1(10),2,4-trien-17-ona (20)

A una disolución de compuesto **19** (170 mg, 0,41 mmol) en DCM (20 ml) a 0 °C se le añadieron trifenilfosfina (202 mg, 0,77 mmol) e imidazol (212 mg, 3,11 mmol) seguido por la adición gota a gota de tetrabromuro de carbono (256 mg, 0,77 mmol) en DCM (5 ml) a lo largo de 2 min. Después se agitó la disolución durante 1 h. Se diluyó la disolución resultante con DCM (25 ml) y se lavó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Se filtró la fase orgánica sobre un lecho de algodón y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (1:9; con TEA al 1 %) para dar 69 mg (36 %) de compuesto **20**.

¹H-RMN (acetona-d₆): 1,17 y 1,18 (2s, 3H), 1,40-2,45 (m, 16H), 2,68-2,92 (m, 3H), 3,11 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,46 (m, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,66 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,82 (m, 3H), 4,32 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz), 4,66 (m, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz), 7,27 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); ¹³C-RMN (acetona-d₆): 17,0, 19,0, 25,4, 25,5, 25,9, 30,5, 32,8, 33,3, 34,9, 38,7, 42,7, 44,5, 46,9, 54,2, 60,9, 66,3, 68,7, 68,9, 75,0, 98,1, 125,2, 126,0, 129,2, 136,4, 136,5, 138,5, 217,9; LRMS para C₂₇H₃₈BrO₄ [M + H + 2 H₂O]⁺ 536,1 y 538,1 m/z.

3-(2-bromoetil)-15β-(2-hidroxietoxi)estra-1(10),2,4-trien-17-ona (**21**)

A una disolución de compuesto **20** (65 mg, 0,13 mmol) en 3 ml de una mezcla de DCM/MeOH (9:1) a 0 °C se le añadió *p*-TSA (2 mg, 0,01 mmol). Se agitó la disolución a esta temperatura durante 30 min. Se diluyó la disolución resultante con DCM y después se lavó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Se filtró la fase orgánica sobre un lecho de algodón y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (de 1:1 a 1:0) para dar 35 mg (65 %) de compuesto **21**.

¹H-RMN (acetona-d₆): 1,16 (s, 3H), 1,40-2,46 (m, 10H), 2,67-2,95 (m, 3H), 3,11 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,47 (m, 1H), 3,51-3,70 (m, 6H), 4,31 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz), 7,02 (s, 1H), 7,06 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,26 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); ¹³C-RMN (acetona-d₆): 17,1, 25,5, 26,0, 29,2, 32,8, 33,4, 34,7, 38,7, 42,9, 44,4, 46,8, 54,3, 61,3, 71,3, 75,0, 125,2, 126,0, 129,2, 136,3, 136,6, 138,6, 217,9; LRMS para C₂₂H₃₀BrO₃ [M + H]⁺ 421,1 y 423,1 m/z.

Ácido {[3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15β-il]oxi}acético (**22**)

A una disolución de compuesto **21** (33 mg, 0,08 mmol) en acetona (3 ml) a 0 °C se le añadió gota a gota reactivo de Jones (100 µl) y se agitó la disolución durante 2 h a esta temperatura. Después se añadió 2-propanol y se agitó durante 10 min adicionales a 0 °C. Se vertió la disolución resultante en agua, se extrajo con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 35 mg de ácido carboxílico

22 como producto individual. Se usó el compuesto para la siguiente etapa sin purificación adicional.

^1H -RMN (CDCl_3): 1,20 (s, 3H), 1,36-2,46 (m, 11H), 2,70-2,99 (m, 3H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz), 3,55 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz), 4,15 (q de sistema AB, 2H, $J_A = 7,0$ Hz, $J_B = 16,7$ Hz), 4,37 (t, 1H, $J = 5,1$ Hz), 6,96 (s, 1H), 7,00 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,25 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); ^{13}C -RMN (CDCl_3): 17,4, 25,4, 26,1, 29,1, 32,7, 33,0, 34,6, 39,0, 42,9, 44,6, 47,3, 54,6, 66,4, 76,2, 125,4, 126,0, 129,2, 136,4, 136,8, 138,4, 174,4, $\sim 218,0$; LRMS para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{BrO}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 435,1 y 437,1 m/z.

2-([3-(2-bromoetil)-17-oxoestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]oxi)-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-XIII)

A una disolución de compuesto **21** (32 mg, 0,073 mmol) en DMF anhidra (2 ml) se le añadió hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU) (35 mg, 0,08 mmol) y se agitó la mezcla durante 5 min antes de la adición de 2-amino-5-metiltiazol (17 mg, 0,15 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA) (26 μl , 0,15 mmol). Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 2 h. Después se vertió la disolución en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se purificó el compuesto bruto mediante cromatografía ultrarrápida usando EtOAc/hexanos (1:1) para dar 25 mg (65 %) de **PBRM-XIII**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 1,25 (s, 3H), 1,30-2,53 (m, 13H), 2,39 (d, 3H, $J = 1,2$ Hz), 2,81-3,06 (m, 3H), 3,11 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 4,34 (q de sistema AB, 2H, $J_A = 22,5$ Hz, $J_B = 7,3$ Hz), 4,56 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz), 7,02 (s, 1H), 7,07 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,09 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 7,28 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 10,0 (s, 1H); ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 10,5, 17,1, 25,4, 26,1, 29,0, 32,9, 33,4, 34,8, 38,7, 42,4, 44,6, 46,8, 54,0, 68,2, 76,4, 125,3, 126,0, 127,3, 129,2, 134,9, 136,4, 136,6, 138,4, 155,2, 167,2, 217,0; LRMS para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 531,1 y 533,1 y m/z. Pureza mediante HPLC = 99,0 %.

2-([3-(2-bromoetil)-17 β -hidroxiestra-1(10),2,4-trien-15 β -il]oxi)-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)acetamida (PBRM-XIV)

A una disolución de **PBRM-XIII** (15 mg, 0,028 mmol) en MeOH/DCM (9:1) (2 ml) se le añadió borohidruro de sodio (3,2 mg, 0,08 mmol). Se agitó la disolución resultante a 0 °C durante 1 h antes de verterse en agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida para dar 13 mg (87 %) de **PBRM-XIV**.

^1H -RMN (acetona- d_6): 0,90 (m, 1H), 1,10 (s, 3H), 1,20-2,543 (m, 11H), 2,39 (d, 3H, $J = 1,2$ Hz), 2,80-3,04 (m, 3H), 3,10 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,72 (t, 1H, $J = 8,5$ Hz),

4,15 (m, 1H), 4,18 (q de sistema AB, 2H, $J_A = 57,0$ Hz, $J_B = 15,4$ Hz), 7,00 (s, 1H), 7,05 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,08 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz), 7,28 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 9,72 (s, 1H); ^{13}C -RMN (acetona- d_6): 10,5, 13,4, 25,9, 26,7, 29,5, 33,3, 35,0, 38,0, 38,7, 39,0, 42,7, 44,6, 54,4, 67,4, 78,2, 80,4, 125,3, 125,9, 127,3, 129,2, 134,9, 136,3, 136,7, 138,9, 155,0, 167,3; LRMS para $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 533,1 y 535,1 m/z. Pureza mediante HPLC = 99,8 %.

Pruebas biológicas

I. Potencia de inhibición

Ensayo de inhibición de 17 β -HSD1 (método A):

Se hicieron crecer células de cáncer de mama T-47D (adquiridas de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA, EE. UU.)) en medio RPMI complementado con suero bovino fetal (FBS) al 5 % (v/v) tratado con carbón recubierto con dextrano, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) e insulina (50 ng/ml).

Se sembraron las células en una placa de 24 pocillos (8000-25000 células/pocillo). Anteriormente se preparó una disolución madre de cada compuesto que iba a someterse a prueba en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó con medio de cultivo para alcanzar las concentraciones apropiadas antes de su uso. Después de 24 h de incubación, se añadió una disolución diluida de cada compuesto a las células para obtener la concentración final apropiada de desde 0,5 nM hasta 1 μ M para la determinación del valor de CI_{50} . Se ajustó la concentración final de DMSO en el pocillo al 0,1 %.

Después se incubaron previamente estos tratamientos durante 1 h a 37 °C. Adicionalmente, se añadió una disolución que contenía [3 H]-E1 (7 nM) y E1 frío (53 nM) para obtener una concentración total de E1 de 60 nM.

Después se incubaron las células durante 24 h, y se evaluó cada inhibidor por triplicado. Tras la incubación, se retiró el medio de cultivo y se extrajeron esteroides con dietil éter. Se evaporó la fase orgánica hasta sequedad con nitrógeno. Se disolvieron los residuos en DCM, se añadieron en gotas sobre placas de cromatografía de capa fina de gel de sílice (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, EE. UU.), y se eluyeron con tolueno/acetona (4:1) como sistema de disolventes. Se identificaron sustrato [3 H]-E1/E1 y metabolito [3 H]-E2/E2 mediante comparación con esteroides de referencia (E1 y E2) y se aislaron. Se cuantificaron los esteroides marcados con un contador de centelleo. Se calcularon el porcentaje de transformación y el porcentaje de inhibición de la siguiente manera: % de transformación = $100[3H]-E2 / ([3H]-E1 + [3H]-E2)$ y % de inhibición = $100(\% \text{ de transformación sin inhibidor} - \% \text{ de transformación con inhibidor}) / \% \text{ de transformación sin inhibidor}$. Se determinó la concentración que inhibe el 50 % de la transformación de E1 en E2 (CI_{50}) usando el software GraphPad Prism 6.

Tabla 1. Concentración que inhibe el 50 % de la transformación de E1 en E2 mediante 17 β -HSD1 en células T-47D

Compuesto	CI ₅₀ (nM) (media)
PBRM	138
PBRM-II	5,25

Conclusión: el compuesto de la invención, PBRM-II, que incorpora el resto amida particular en C15, es 26 veces más activo que el compuesto de la técnica anterior PBRM (2 experimentos).

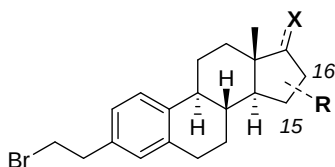
Ensayo de inhibición de 17 β -HSD1 (método B):

Se hicieron crecer células T-47D en un medio complementado con insulina (50 ng/ml) y FBS tratado con carbón recubierto con dextrano al 5 %, que se usó en lugar de FBS al 10 % sin tratar, para retirar las hormonas esteroideas restantes. Anteriormente se preparó una disolución madre de cada compuesto que iba a someterse a prueba en DMSO y se diluyó con un medio de cultivo para alcanzar las concentraciones apropiadas, antes de su uso. Para el ensayo, se sembraron las células (3000 células/pocillo) y, después de 24 h de incubación, se añadió una disolución diluida de cada inhibidor a las células para obtener una concentración final apropiada (0,01, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 nM). Se ajustó la concentración final de DMSO en el pocillo al 0,1 %. Se incubaron previamente el inhibidor y las células durante 2 h a 37 °C y se añadió una disolución que contenía [14C]-E1 (10 nM) y E1 frío (50 nM) para obtener una concentración final de 60 nM. Se incubaron las células durante 24 h y se evaluó cada inhibidor por triplicado. Tras la incubación, se retiró el medio de cultivo, y se extrajeron los esteroides (E1 y E2 marcados y sin marcar) con dietil éter. Se evaporó la fase orgánica hasta sequedad con nitrógeno. Se disolvieron los residuos en DCM, se colocaron sobre placas de CCF de gel de sílice (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, EE. UU.) y se eluyeron con tolueno/acetona (4:1) como sistema de disolventes. Se identificaron sustrato [14C]-E1/E1 y metabolito [14C]-E2/E2 mediante comparación con esteroides de referencia (E1 y E2) y se aislaron. Se cuantificó la radiactividad asociada con cada esteroide usando un sistema Storm 860 Molecular Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se calcularon el porcentaje de transformación y de inhibición de la siguiente manera: % de transformación = $100 \text{ [14C]-E2} / ([\text{14C]-E1} + [\text{14C]-E2})$ y % de inhibición = $100 (\% \text{ de transformación sin inhibidor} - \% \text{ de transformación con inhibidor}) / \%$

de transformación sin inhibidor. Se determinó la concentración que inhibía el 50 % de la transformación de E1 en E2 (CI_{50}) usando el software GraphPad Prism 6.

Tabla 2. Concentración que inhibe el 50 % de la transformación de E1 en E2 mediante 17 β -HSD1 en células T-47D

Compuesto	CI_{50} (nM) (media)
PBRM	47
PBRM-II	2,05



#	R (posición)	R (cadena lateral)	X	CI_{50} (nM) ¹	Eficacia frente a PBRM ²
PBRM	16 β	-CH ₂ -Fenil- <i>m</i> -CONH ₂	β -OH	47,2 $\pm$ 2,7	--
PBRM-II	15 β	-CH ₂ CH ₂ CONH-	O	3,8 $\pm$ 0,8	13,3
PBRM-II-OH	15 β	-CH ₂ CH ₂ CONH-	β -OH	7,4 $\pm$ 0,2	6,8
PBRM-VIII	16 β	-CH ₂ CONHCH ₂ -	O	39 $\pm$ 24	1,3
PBRM-X	16 β	-CH ₂ CONHCH ₂ -	β -OH	11,4 $\pm$ 0,3	4,4
PBRM-XI	15 β	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -	O	16,9 $\pm$ 1,4	3,0
PBRM-XII	15 β	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -	β -OH	9,6 $\pm$ 0,5	5,3
CC-156	16 β	----	β -OH	48,7 $\pm$ 16,7	1,0

¹ Para la transformación de estrona (60 nM) en estradiol mediante 17 β -HSD1 en células T47D (n = 2);

² CI₅₀ (PBRM) / CI₅₀ (compuesto).

Conclusión: el compuesto de la invención, PBRM-II, que incorpora el resto amida particular en C15, es 23 veces más activo que el compuesto de la técnica anterior PBRM (2 experimentos). Además, PBRM-II (CI₅₀ = 3,8 nM) es el inhibidor de 17 β -HSD1 más activo de la serie de análogos de PBRM sometidos a prueba, seguido por PBRM-II-OH, PBRM-XII, PBRM-X y PBRM-XI (CI₅₀ = 7,4, 9,6, 11,4 y 16,9 nM, respectivamente). Se encontró que todos los análogos de PBRM sometidos a prueba eran más activos que PBRM. Se encontró que el compuesto CC-156 tenía una actividad similar a PBRM.

Irreversibilidad de inhibidores

Se cultivaron células T47-D tal como se mencionó anteriormente. Se incubaron previamente células con los inhibidores durante 2 h a 37 °C, se retiró lentamente el medio y se lavaron cuidadosamente las células 3 veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se sometió a ensayo la actividad de 17 β -HSD1 restante tal como se describió anteriormente incubando las células con [14C]-E1 (10 nM) y E1 frío (50 nM) durante 24 h a 37 °C. Después, la cuantificación posterior de los esteroides en el sobrenadante usando el procedimiento descrito anteriormente. Se calcularon el porcentaje de transformación y después el porcentaje de inhibición tal como se notificó anteriormente.

Conclusión: se confirmó la irreversibilidad de PBRM-2 dado que la actividad de inhibición se mantuvo después de tres etapas de lavado (figura 3).

Adicionalmente, se determinaron los valores de CI₅₀ sin lavado y con lavado. Se determinó la concentración que inhibía el 50 % de la transformación de E1 en E2 (CI₅₀) usando el software GraphPad Prism 6. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Irreversibilidad de los inhibidores de 17 β -HSD1 PBRM y PBRM-II (transformación de E1 en E2)

Inhibidor de 17 β -HSD1	Tipo de inhibición	CI ₅₀ (nM) sin lavado	CI ₅₀ (nM) con lavado	Eficacia perdida tras el lavado ¹
PBRM	Irreversible ²	47,2 $\pm$ 6,1	353 $\pm$ 117 ³	7,5
PBRM-II	Irreversible	3,2 $\pm$ 1,7	13,2 $\pm$ 10,7 ³	4,1
CC-156	Reversible ⁴	48,7 $\pm$ 16,7	8834	181

¹ CI₅₀ (con lavado) / CI₅₀ (sin lavado); ² La irreversibilidad de PBRM se confirmó mediante análisis de rayos X de un complejo de 17 β -HSD1/PBRM que muestra una fuerte unión covalente entre la enzima y el inhibidor (Li *et al.* J. Phys. Chem. Lett. 2018, 9, 5275); ³ Datos no significativamente diferentes de la condición sin lavado. ⁴ La reversibilidad de CC-156 se confirmó anteriormente mediante análisis de rayos X de un complejo de 17 β -HSD1/CC-156 que no muestra ninguna unión covalente fuerte entre la enzima y el inhibidor (Mazumdar *et al.* Biochem. J. 2009, 424, 357).

Tal como se observa a partir de la tabla 3 anterior, la actividad de inhibición de PBRM-II se mantuvo después de tres etapas de lavado, confirmando por tanto que actúa como inhibidor irreversible.

II. Actividad antiproliferativa de PBRM-II en células T-47D

La línea celular de cáncer de mama ER⁺, T-47D, se eligió porque expresa el ER, predominantemente el ER α , y prolifera en presencia de compuestos estrogénicos.

Se mantuvo la línea celular en matraces de cultivo (área de crecimiento de 175 cm², BD Falcon) a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Se hicieron crecer las células T-47D en medio RPMI 1640 libre de rojo de fenol complementado con suero bovino fetal al 10 % (FB, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), L-glutamina (2 mM) y 17 β -estradiol (1 nM).

Para el protocolo, se suspendieron células T-47D en RPMI complementado con insulina (50 ng/ml), en lugar de 17 β -estradiol, y FBS separado con carbón al 5 % para privar los medios de estrógenos. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 3000 células/pocillo y se dejaron unirse durante 48 h.

Después de esta incubación previa, se añadieron los inhibidores y los compuestos de referencia diluidos en medios de cultivo recientes a los pocillos y se sustituyeron cada 2 días durante 7 días de tratamiento.

Se usó el ensayo de proliferación celular en disolución CellTitter 96® Aqueous One como medición colorimétrica indirecta de la proliferación celular según las instrucciones del fabricante. En resumen, después de los tratamientos, se añadieron 20 µl de disolución de MTS a cada pocillo (100 µl) de las placas y se incubaron a 37 °C durante 4 h.

Después se midió la absorbancia a 490 nm con un lector de microplacas Thermo max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El control (medios de cultivo + DMSO) se estableció al 100 % de proliferación celular. Los resultados se proporcionan en la figura 1.

Conclusión: PBRM-II no es estrogénico y es más eficiente que PBRM para reducir la proliferación celular de células T-47D dependientes de estrógenos.

III. Estabilidad de PBRM-II en microsomas hepáticos humanos

El estudio de los compuestos en microsomas hepáticos humanos es una herramienta predictiva útil para evaluar su estabilidad, así como los posibles metabolitos.

Se realizaron ensayos de estabilidad durante 1 h a 37 °C, con o sin NADPH 10 mM en presencia de 40 µg de fracción S9 hepática humana de Corning (Melrose, MA, EE. UU.) y 10 µM de sustrato en un volumen final de 100 µl de tampón Tris 50 mM complementado con MgCl₂ 10 mM.

Se terminaron los ensayos añadiendo 100 µl de metanol (MeOH), se centrifugaron a 13.000g durante 10 min para obtener un sedimento de proteínas.

Se combinó el sobrenadante de dos experimentos independientes y se presentó a análisis mediante HPLC-MS (Shimadzu LCMS-2020 APCI, columna Altima HP C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)).

Se realizó la serie de HPLC-MS de 40 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un gradiente de elución empezando desde 70:30 (MeOH/H₂O) hasta el 100 % de MeOH durante los primeros 15 min, seguido por 10 min con MeOH al 100 % y una fase de reequilibrado de 15 min con 70:30 (MeOH/H₂O). Se detectaron compuestos usando el modo de ionización APCI⁺ usando una ionización de barrido completo entre 100 y 1000 m/z. Se calculó el compuesto restante (expresado en %) dividiendo el área bajo la curva del sustrato para los ensayos con NADPH entre aquella sin NADPH y multiplicando por 100. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes (figura 2).

Conclusión: PBRM-II es notablemente más estable que PBRM y CC-156.

IV. Biodisponibilidad de PBRM-II en comparación con PBRM

Animales:

Se obtuvieron ratones Balb/c hembra de seis a siete semanas de edad que pesaban aproximadamente 19 g de Charles-River, Inc (St-Constant, Qc., Canadá). Se aclimataron los animales a condiciones del entorno (temperatura: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humedad: $50 \pm 20\%$; ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, encendiéndose las luces a las 07:15 h) durante al menos 5 días antes de empezar el experimento. Se alojaron los animales a tres por jaula y se les permitió acceso libre a agua y se proporcionaron un alimento para roedores comercial certificado (Rodent diet #T.2018,15, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EE. UU.) y agua a voluntad. Los experimentos con animales se llevaron a cabo en una instalación para animales aprobada por el Canadian Council on Animal Care (CCAC, consejo de Canadá sobre el cuidado de animales) y la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (asociación para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio). El estudio se realizó según la guía del CCAC para el cuidado y uso de animales de experimentación. Se obtuvo una aprobación institucional.

Ensayo:

Se llevó a cabo el estudio tras la administración oral de PBRM y PBRM-II a las siguientes concentraciones: 5, 15, 30 y 60 mg/kg de peso corporal en 0,1 ml de dimetilsulfóxido y aceite de girasol (8:92). En primer lugar se disolvió el compuesto en DMSO y después se añadió aceite de girasol para obtener una concentración final de DMSO del 8 %. Durante este experimento, se sometieron los ratones a ayunas desde 8 h antes de la administración de compuestos. Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de la concentración de compuesto en plasma mediante punción cardiaca a las 2 h tras la dosis de 3 ratones por dosis. Se extrajeron muestras de sangre en tubo recubierto con potasio-EDTA (ácido etilendiamina-tetra-acético) Microvette (Sarstedt, Aktiegesellschaft & Co, Alemania) y se centrifugaron a 3200 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se recogió el plasma y se almacenó a -80°C hasta que se analizó mediante análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (CL-EM/EM).

Medición de PBRM y PBRM-II en plasma:

Se determinó la concentración de inhibidores mediante CL/EM/EM usando un procedimiento desarrollado en el centro de investigación de CHUQ (CHUL) (servicio bioanalítico). Para la extracción a partir de plasma, se transfieren 100 μl de muestra de plasma a tubos individuales y se añaden 600 μl de acetato de amonio (1 mM). Después se añade una disolución metanólica (50 μl) que contiene el patrón interno de esteroide deuterado a cada tubo. Se

transfieren muestras en columnas Strata-X SPE (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) y se lava cada columna con agua y metanol:agua (10:90, v/v). Después se eluye el inhibidor con 5 ml de metanol que contiene acetato de amonio 1 mM. Se evapora el metanol a 45 °C bajo atmósfera inerte y se reconstituye el residuo secado en 100 µl de metanol:agua (85:15, v/v). Para el análisis de inhibidor, el sistema de HPLC usa una columna de fenil-hexilo, de fase inversa, de 75 x 4,6-mm (Phenomenex, Torrance, EE. UU.) a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Se detecta el inhibidor usando un espectrómetro de masas API 4000, equipado con TurbolonSpray (Applied Biosystems, Canadá). Se usó ESI en modo de iones positivos.

Tabla 4. Inhibición de 17β-HSD1 (CI_{50}) y concentración en plasma de inhibidor (IPC) obtenida 2 h después de una única administración oral (sonda nasogástrica) en ratones a cuatro dosis

Inhibidor de 17β-HSD1	CI_{50}¹ (nM)	IPC-5 mg/kg² (ng/ml)	IPC-15 mg/kg (ng/ml)	IPC-30 mg/kg (ng/ml)	IPC-60 mg/kg (ng/ml)
PBRM	47,2 ± 2,7	--	898 ± 89	1814 ± 130	3897 ± 468
PBRM-II	3,8 ± 0,8	231 ± 30	897 ± 55	2178 ± 125	3853 ± 205

¹ Para la transformación de estrona (60 nM) en estradiol mediante 17β-HSD1 en células T47D.

Tal como puede observarse a partir de los datos en la tabla 4 anterior, PBRM-II tiene una biodisponibilidad oral muy similar (concentración en plasma) a PBRM.

V. Biodistribución de PBRM-II en seis tejidos cuando se inyecta por vía oral (sonda nasogástrica) en ratones

Para este experimento, se sometieron los ratones a ayunas durante 10 h antes de la administración de inhibidores. Se administró una única dosis de PBRM-II (30 mg/kg) a ratones Balb/c hembra (3 animales/punto de tiempo por dosis) mediante sonda nasogástrica (v.o.) usando aceite de girasol:DMSO (dimetilsulfóxido) (92:8) como vehículo. En primer lugar se disolvió PBRM-II en DMSO y, después de eso, se añadió el codisolvente apropiado (SO) para obtener una concentración final del 8 % de DMSO cuando se inyectaron 100 µl. Se sacrificaron los animales mediante sangrado con isoflurano 2, 6, 12 y 24 tras la administración

de PBRM-II. Después se extrajeron tejidos (hígado, riñón, útero, ovario y cerebro) y el contenido del colon y se almacenaron a -80°C hasta que se determinó la concentración de PBRM-II mediante análisis de CL-EM/EM usando un procedimiento desarrollado en el centro de investigación del CHU de Quebec para derivados de esteroides. Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación y en la figura 4.

Tabla 5. Concentración de PBRM-II (ng) por g de seis tejidos

Tiempo	Hígado	±	Riñón	±	Útero	±
2 h	19776,1	9938,7	17714,7	9441,7	11860,1	15755,8
6 h	16438,0	8662,9	10216,1	4206,0	26604,7	20771,1
12 h	5722,7	2638,1	2525,2	891,8	6451,5	2210,3
24 h	211,0	264,2	248,2	248,3	1459,6	573,0

Tiempo	Ovario	±	Cerebro	±	Contenido de colon	±
2 h	17434,4	14743,0	73,6	86,8	212942,4	187554,1
6 h	81051,7	53759,0	0,0	0,0	63818,0	19241,7
12 h	20325,1	9423,8	9,1	15,8	79615,2	4627,6
24 h	5349,7	5392,3	23,5	40,7	1757,4	1736,5

A partir de los resultados de la biodistribución de PBRM-II en seis tejidos, puede observarse que no se detectó PBRM-II significativamente en tejido cerebral. Esto sugiere que no puede atravesar la barrera hematoencefálica. PBRM-II estaba presente en cinco de los tejidos analizados (hígado, riñón, útero, ovario y en el contenido del colon), pero no se acumuló, y su concentración disminuyó a lo largo del tiempo. Adicionalmente, hubo un bajo nivel de PBRM-II detectado a las 24 h, lo que sugiere un completo aclaramiento del compuesto después de 48 h. Se observó una mayor acumulación en los tejidos de ovarios y uterino en comparación con algunos de los otros tejidos.

VI. Semivida ($T_{1/2}$) de PBRM-II y PBRM en microsomas hepáticos humanos (HLM)

Se realizaron incubaciones en placa de pocillos profundos. Se incubó previamente tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH 7,4, + MgCl_2 2 mM, 600 μl) que contenía microsomas hepáticos humanos (0,53 mg de proteína/ml) con PBRM-II (4 μM) o control positivo (loperamida, 1 μM) en un baño de agua a una temperatura establecida a 37 °C durante 10 min (N=1). Se obtuvo el T0 transfiriendo 47,5 μl de los microsomas previamente incubados que contenían el compuesto a una nueva placa de 96 pocillos mantenida en hielo y extinguiendo con 100 μl de (1:1) metanol/acetonitrilo. Después de eso, se añadieron 2,5 μl de disolución de NADPH a 20 mM a la muestra de T0 extinguida para mantener las mismas razones que en las incubaciones. Se iniciaron las reacciones transfiriendo 380 μl de los microsomas previamente incubados que contenían el compuesto a una nueva fila de la placa de 96 pocillos y añadiendo 20 μl de NADPH (concentración final de 1 mM). Usando el volumen restante de los microsomas previamente incubados que contenían el compuesto, se incubaron reacciones sin NADPH para descartar metabolismo distinto de NADPH o inestabilidad química en el tampón de incubación. También se incubaron reacciones sin compuesto para control de blanco. Se terminaron las reacciones en cada punto de tiempo (15, 60, 120, 180 y 240 min) tomando 50 μl de disolución de incubación y extinguiendo con 100 μl de (1:1) metanol/acetonitrilo. Se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min, y se transfirió el sobrenadante a una microplaca de 96 pocillos antes del análisis mediante UPLC-QToF-MS. El porcentaje de PBRM-II restante frente al tiempo se muestra en la figura 5A. La figura 5B muestra el Ln del porcentaje de PBRM-II restante frente al tiempo. A partir de este gráfico, se calculó que la semivida ($T_{1/2}$) de PBRM-II a 4 μM en microsomas hepáticos humanos (HLM) era de 210 minutos.

Se usó el mismo protocolo que para PBRM-II para determinar la semivida de PBRM en microsomas hepáticos humanos (figuras 5C y 5D). Se calculó que la semivida de PBRM en microsomas hepáticos humanos era de 103 min. Por tanto, PBRM-II es más estable que PBRM en microsomas hepáticos humanos.

Aunque anteriormente en el presente documento se han descrito en detalle realización/realizaciones ilustrativa(s) y actualmente preferida(s) de la invención, debe entenderse que los conceptos inventivos pueden realizarse y emplearse de diversas maneras y que se pretende que se interprete que las reivindicaciones adjuntas incluyen tales variaciones, salvo en la medida en que lo limite la técnica anterior.