



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE DERIVADOS ESTEROIDALES Y
SUS CONJUGADOS A ALBUMINA SERICA BOVINA

SUSTENTANTE:

JOSE ANTONIO BADILLO HERNANDEZ

CARRERA: Q. F. B. (BIOQUIMICO MICROBIOLOGO)

1 9 8 0

M-21629



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

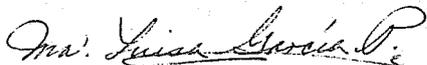
PRESIDENTE: Prof. MA. LUISA GARCIA PADILLA
VOCAL: Prof. OFELIA ESPEJO DE OCHOA
SECRETARIO: Prof. MA. DEL SOCORRO SALAS TAVARES
1er. SUPLENTE: Prof. IGNACIO HUERTA BERDEJA
2o. SUPLENTE: Prof. ARTURO PEREZ ALONSO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

SECCION DE QUIMICA ORGANICA DE LA DIVISION DE BIOLOGIA DE
LA REPRODUCCION DE LA SUBJEFATURA DE INVESTIGACION DEL --
CENTRO MEDICO NACIONAL.

SUSTENTANTE

ASESOR


JOSE ANTONIO BADILLO HERNANDEZ Q.F.B. MA. LUISA GARCIA PADILLA


SUPERVISOR TECNICO


DOCTOR ANTONIO HIJARES HIJARES

CON AMOR A MI ESPOSA BLANCA,
POR SU AYUDA Y COMPRESION,
POR TODO LO QUE ES PARA MI.

PARA MI HIJA ROSA ANGELA
CON TODO MI AMOR.

A MIS PADRES CON CARIÑO Y AGRADE
CIMIENTO POR DARME SIEMPRE TODO-
LO MEJOR DE ELLOS, ESTE SENCILLO
RECONOCIMIENTO.

A MIS HERMANOS CON CARIÑO

CON AGRADECIMIENTO RESPETO Y ADMIRACION
AL DR. ANTONIO MIJARES, MI ASESOR TECNI
CO, JEFE DE LA SECCION DE QUIMICA ORGA-
NICA.

AL PRESIDENTE Y AL JURADO MI GRATITUD
Y RECONOCIMIENTO.

AL EQUIPO DEL LABORATORIO DE QUIMICA ORGANICA
MI RECONOCIMIENTO POR EL APOYO Y COMPAÑERISMO
QUE ME BRINDARON.

C O N T E N I D O

- I TITULO
- II INTRODUCCION Y OBJETIVO
- III ANTECEDENTES
- IV CONSIDERACIONES TEORICAS
- V DESARROLLO EXPERIMENTAL

- VI RESULTADOS Y COMENTARIOS
- VII BIBLIOGRAFIA

I. T I T U L O

PREPARACION DE DERIVADOS ESTEROIDALES Y -
SUS CONJUGADOS A ALBUMINA SERICA BOVINA.

II. I N T R O D U C C I O N .

Desde que Yalow y Berson reportaron un método de gran sensibilidad para determinación de insulina en plasma, llamado radioinmunoanálisis, éste se ha aplicado a casi todas las hormonas proteicas conocidas (1) y hormonas esteroideas (2), (3).

Debido a las aplicaciones tan importantes que el radioinmunoanálisis encuentra en diversos campos tanto médicos como bioquímicos, existe gran interés en la obtención de anticuerpos específicos a fin de poder determinar con mayor precisión y rapidez tanto las hormonas como sus precursores y metabolitos.

Los anticuerpos se obtienen mediante la inmunización de animales de laboratorio, utilizando, como antígeno la sustancia contra la cual se quieren producir anticuerpos. Un antígeno es una sustancia orgánica de peso molecular elevado, como por ejemplo las proteínas y los polisacáridos. Landsteiner estableció que moléculas orgánicas de bajo peso molecular que por sí solas no son antigénicas, si se unen mediante enlaces covalentes a una macromolécula, el conjugado resultante es capaz de inducir la producción de anticuerpos especí

ficos contra el compuesto orgánico de bajo peso molecular (hapteno).

S. Liberman y colaboradores prepararon derivados esteroïdales para conjugarlos a albúmina sérica bovina; induciendo con estos antígenos la producción de anticuerpos relativamente específicos. Esperaba que tanto los antígenos como los anticuerpos presentaran propiedades antihormonales, para utilizarlos con fines terapéuticos en el campo de la Endocrinología.

Años más tarde Abraham (4) en base a investigaciones de Yalow y Berson, S. Liberman y de la doctora Murphy, desarrolla el radioinmunoanálisis de esteroides, método capaz de medir niveles hasta de picogramos (10^{-12} g), pero que requiere de anticuerpos de especificidad, afinidad y títulos altos.

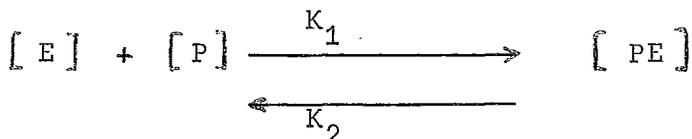
En el trabajo presentado en ésta tesis se prepararon derivados de esteroides de interés en la QUIMICA CLINICA; y sus conjugados a albúmina sérica bovina; para ser empleados como antígenos en procesos de inmunización activa.

O B J E T I V O.

El objetivo en este tipo de trabajos es el de preparar derivados esteroidales para conjugarlos a una proteína acarreadora por medio de enlaces covalentes para producir conjugados estables. Reportándose en ésta tesis la preparación de los 4-hemisuccinatos de la 4-hidroxi-testosterona y del 17 β -tetrahidropiranyl - oxi - 4 - hidroxitestosterona y las 3-0-carboximetiloximas de la 17 α -hidroxiprogesterona y del 20 etilencetal de la 17 α -hidroxiprogesterona además sus conjugados a albúmina sérica bovina, con el fin de emplearlos como antígenos para que al administrarse a conejos, se obtengan antisueros que contengan anticuerpos de alta especificidad, afinidad y títulos, contra testosterona y 17 α -hidroxiprogesterona, contribuyendo a los métodos de radioinmunoanálisis que se llevan a cabo en instituciones como el I.N.N., el C.M.M., etc.

III.- A N T E C E D E N T E S.

La necesidad de determinaciones rápidas de niveles hormonales en la detección de alteraciones de diversa índole, empleando volúmenes pequeños de suero o plasma, ha apresurado la investigación de métodos relativamente simples como es el radioinmunoanálisis "R.I.A." desarrollado por Yalow y Berson para la cuantificación de insulina (1), cuyo principio es el mismo de los métodos de "análisis por saturación" de Ekins (5) y de "análisis por desplazamiento" (6) "C.P.B." (competitive protein binding) desarrollado por Murphy (7), que nos permiten medir en forma confiable las pequeñas cantidades endógenas de hormonas. Estos métodos aunque son de gran sensibilidad ya que miden niveles de nanogramos y aún de picogramos, no se han aplicado a la rutina en todos los casos, debido a que requieren anticuerpos de alta especificidad. El principio en que se basan estos métodos, es la ley de acción de masas; así, si tenemos una sustancia P en una concentración determinada, que se hace reaccionar con otra sustancia E en otra concentración dada, se establece una velocidad de reacción K_1 para la formación del complejo PE y otra velocidad K_2 para disociación de éste en P y E:



Cuando se establece el equilibrio se tiene:

$$k_1 [E] [P] = k_2 [PE]$$

Por lo tanto la concentración del complejo PE en relación inversa a las concentraciones de P y E nos dará una constante de equilibrio que se expresa:

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[PE]}{[P][E]}$$

E corresponde a dos poblaciones de moléculas del mismo tipo, una de las cuales está marcada radioactivamente E^* , P es una sustancia que reacciona con E específicamente. En el "análisis por saturación" P puede ser una proteína y E una sustancia cualquiera, por ejemplo una hormona; en el "análisis por desplazamiento" P es una proteína plasmática transportadora específica o tisular receptora específica y E es una hormona; finalmente en el "radioinmunoanálisis" P es un anticuerpo específico y E es una hormona.

La experiencia obtenida de los trabajos de muchos investigadores en la caracterización de "C.P.B." y de "R.I.A." para polipéptidos y hormonas proteicas, ha dejado al descubierto las propiedades requeridas por tales sistemas (8).

Murphy, en una discusión del método "C.P.B." (9) indica los tres requerimientos principales para la aplicación de sus principios.

1o.) Una proteína de enlace específica para la sustancia que se va a medir.

2o.) Una forma marcada de tal sustancia.

3o.) Un método de separación del material unido a la proteína del no unido.

Las categorías generales para las técnicas de separación incluyen medios físicos, químicos e inmunológicos como son (10):

DIALISIS DE EQUILIBRIO

PRECIPITACION SALINA

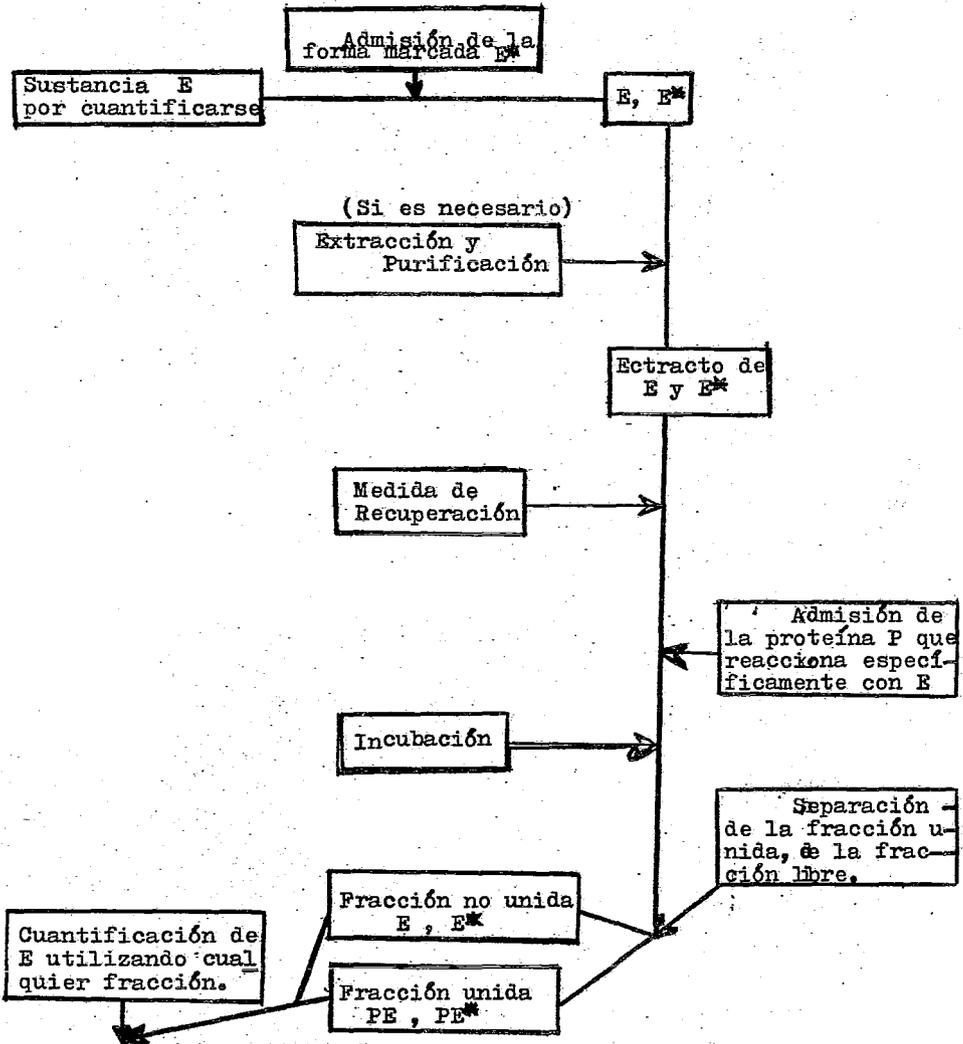
DOBLE ANTICUERPO

CARBON DEXTRAN

ANTICUERPOS INSOLUBLES

Una secuencia general para la determinación de una sustancia E, digamos una hormona, utilizando éstos métodos de análisis, se indica en el esquema número 1.

ESQUEMA I.



Así, para determinar la concentración de una hormona E en un fluido biológico (plasma, etc.), se toman uno o dos mililitros, se adiciona una cantidad conocida medida en desintegraciones por minuto de la forma radioactiva E^{*} de alta actividad específica a fin de que la masa que se adiciona sea despreciable respecto a E y a la sensibilidad del método. Si es necesario se hacen purificaciones y extracciones para eliminar sustancias interferentes, tomando en cuenta la medida de recuperación de estos procesos, en función de la radioactividad presente en la muestra y en el extracto. Se adiciona el anticuerpo que reacciona específicamente con la sustancia por determinarse, se incuba y se separan las fracciones libre y unida. La distribución de radiactividad será proporcional a la cantidad de sustancia E por medir en las fracciones libre y unida, pudiendo medirse cualquier fracción. En general se corren curvas patrón simultáneamente, con lo cual se determinan los valores de muestras problema por interpolación.

Al ser evidente la aplicabilidad general de los principios del radioinmunoanálisis, ya que los procedimientos pueden ser adaptados para cuantificar cualquier sustancia hormonal, se han preparado antisueros contra hormonas progresivamente más pequeñas, aunque las llamadas determinantes antigé -

nicas, se cree son aproximadamente equivalentes a sustancias de peso molecular de 600 a 800, sustancias hapténicas más pequeñas, han mostrado su capacidad de ser antigénicas cuando se conjugan a macro moléculas orgánicas. Así desde hace algunos años se han preparado conjugados proteína-esteroide. La posibilidad de hacer que los esteroides, que por sí solos no son antigénicos, adquieran antigenicidad al acoplarse a proteínas, viene de los estudios clásicos de Landsteiner (11).

En resumen, Landsteiner encontró que si un número suficiente de moléculas orgánicas de bajo peso molecular se unían por medio de enlaces covalentes a una molécula proteica, el conjugado resultante sería capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos contra la proteína acarreadora y contra el compuesto de bajo peso molecular al que llamó hapteno (12).

Clutton (13), utilizó este principio y tuvo éxito al preparar derivados de tiroxilo y conjugarlos a proteínas, obteniendo anticuerpos que eran capaces de inhibir la acción fisiológica de la tiroxina (12) (13), obtuvo anticuerpos también contra sulfas, aminoácidos, etc.

Von Mooser y Griliches (14) prepararon conjugados proteína-esteroide a partir de derivados dia

zados, pero fallaron en sus intentos para obtener anticuerpos. Sprunt y Dulaney (15) reportaron en forma abstracta la obtención de anticuerpos contra 17β - estradiol, los datos insuficientes que se tienen nos impiden evaluar su trabajo.

En 1957 Sehon y colaboradores (16) reportaron la preparación de un conjugado proteína-estróna capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos (17).

Erlanger y Lieberman (18), (19), reportaron en 1957 y 1959 sus trabajos sobre la preparación de conjugados de esteroides con albúmina sérica bovina, unidos covalentemente. En sus estudios originales, fueron atraídos por las posibilidades terapéuticas de inmunización con esteroides, por ejemplo esperaban evitar la castración quirúrgica por medio de inmunización activa contra testosterona y estrógenos de los pacientes con cáncer prostático, o la ovariectomía en la mujer que sufriera cáncer mamario, con la ventaja de que el procedimiento inmunológico sería más efectivo porque neutralizaría el esteroide endógeno circulante, ya que la producción de hormonas esteroides no es exclusiva de una sola glándula, sino que existen otras vías alternantes de producción (20) (21).

Inicialmente los esteroides se conjugaron al acarreador proteico por medio de los grupos funcionales localizados concretamente en la posición 3 - del anillo A y la 17 o 21 del anillo D, es decir- en los grupos llamados determinantes, produciendo anticuerpos relativamente inespecíficos con considerable reactividad cruzada con esteroides estructuralmente similares (22).

Midgley y Niswender (23) indican las ventajas de elegir una posición estructuralmente única y conjugar lo más alejado posible de los grupos de terminantes, para lo cual se han probado diversas posiciones como son: 6, 7, 11, 19 entre otras.

Los anticuerpos contra esteroides varían en especificidad según el sitio de acoplamiento del esteroide con la proteína acarreadora, los conjugados en la posición 3 han mostrado mayor especificidad que cuando se acoplan a través de 17, esto permite suponer que en el reconocimiento inmunológico son más importantes los cambios de polaridad en 17 que los pequeños cambios estereoquímicos en el anillo A. Así también los conjugados en 4 han confirmado ésta hipótesis, al obtenerse anticuerpos de alta especificidad, teniendo poca o insignificante reactividad cruzada con otros esteroides probados.

Para preparar un conjugado se emplean derivados esteroidales como son los hemisuccinatos, las O-carboximetil oximas y clorocarbonatos, utilizan-

do grupos oxhidrilo o cetónicos en la molécula del esteroide como puntos de anclaje para formar derivados estables que proporcionen enlaces covalentes fuertes entre el esteroide y la proteína, previniéndose la lisis "in vivo" durante la inmunización, se utilizan los grupos ϵ -amino de residuos de lisina de la albúmina sérica bovina para la formación del enlace covalente (21).

Para la elección de los componentes adecuados de un conjugado se debe considerar:

I).- La proteína empleada debe conseguirse en una forma relativamente pura, su contenido de aminoácidos debe ser razonablemente bien conocido y debe tener un número suficiente de sitios de unión para el enlace con el hapteno.

II).- La estructura del derivado esterooidal debe diferir lo menos posible de la hormona biológicamente activa de que trata.

III).- El enlace entre el hapteno y la proteína debe ser de tipo covalente.

El contenido de aminoácidos de la A.S.B. es bien conocido (24) y ésta se puede adquirir en forma relativamente pura. Los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, representan los sitios de acoplamiento más abundantes, ⁽²¹⁾ se tienen 59 y uno α -amino terminal, 21 oxhidrilos fenólicos de residuos de tirosina, 6 grupos sulfhidrilo de residuos de

cisteína y 17 grupos imidazol de residuos de histi
dina por molécula de A.S.B.

En la preparación de sus conjugados Erlanger utilizó la A.S.B. por la abundancia de grupos ε-
-amino en la molécula, y por el desarrollo de téc
nicas para la formación de enlaces peptídicos, aun
que en ese tiempo dominaban los métodos de acopla-
miento mediante derivados diazoados utilizados des
de Landsteiner.

Han sido utilizadas diversas macromoléculas-
en la elaboración de conjugados como son fraccio-
nes globulínicas, albúminas séricas, hemocianina,
-ovoalbúmina, fibrinógeno, celulosa, etc. (24).

Los conjugados con albúminas son en general-
más solubles que los de globulinas y ovoalbúmina,
siendo utilizados más los primeros, ya que aunque
los insolubles sean funcionales en inmunización,
no se pueden caracterizar.

Los métodos que se han empleado para conju-
gar haptenos esteroïdales a proteïnas, con forma-
ción de enlaces peptídicos son:

- a) El método del anhídrido mixto....(18)(19)
- b) La reacción de Schotten-Baumann..(18)(19)
- c) El método de la carbodiimida..... (25).

Las condiciones experimentales en las reac-
ciones de acoplamiento entre los derivados esteroï
dales y la A.S.B. se escogieron para favorecer la-

formación de enlaces peptídicos con los grupos amino libres y el derivado hapténico apropiado. La -- reacción se lleva a cabo a pH alcalino en mezclas de disolventes miscibles con agua (dioxano, tetrahidrofurano, etc) y siempre se usa un exceso de la sustancia hormonal.

Lieberman caracterizó sus conjugados y determinó el número de haptenos esteroídales conjugados por molécula de A.S.B. utilizando varios criterios; movilidad electroforética, hidrólisis del conjugado, dinitrofenilación y análisis de absorción de luz ultravioleta, éste último es el procedimiento que se sigue principalmente para determinar el número de haptenos por molécula de A.S.B., por lo general los grupos hapténicos presentan absorción de energía en las regiones del espectro electromagnético del ultravioleta y del visible, propiedad que se aprovecha como se indica.

Abraham ha utilizado un procedimiento simple que consiste en incorporar un poco de hapteno radioactivo en la conjugación, pudiendo hacer una estimación directa, al contar el material radioactivo no dializable.

Se han realizado estudios relacionados a la utilidad de anticuerpos contra esteroides, el grupo de Lieberman, pudo estudiar el papel que tienen varias hormonas en procesos fisiológicos y patológicos (10), en virtud de que los anticuerpos pue

den neutralizar la actividad biológica de las hormonas endógenas circulantes, así como las administradas exógenamente, llegando a clarificar mecanismos que controlan procesos reproductivos tales como el papel de estrógenos en el surgimiento de la-LH ovulatoria y el juego de estrógenos y progesterona en la implantación y embarazo, etc.

I M P O R T A N C I A

En 1940 Marker (26) obtuvo progesterona a partir de la diosgenina, presente en el barbasco mexicano. Después de esa fecha, se han obtenido por medio de transformaciones químicas todas las hormonas esteroïdes, sus precursores y metabolitos, desarrollándose amplias investigaciones farmacológicas con los productos elaborados. Antes de todo este desarrollo de la industria de los esteroïdes, estos no se podían obtener más que en cantidades bajísimas, Butenandt (27), aisló 15 mg, de androsterona a partir de 15000 litros de orina de hombres normales y para aislar unos miligramos de progesterona necesitó casi 100 kilos de cuerpo luteo de cerdos hembra embarazadas. Asimismo los métodos para la determinación de niveles hormonales hasta el año de 1961 eran poco precisos y daban una imagen confusa e imperfecta del estado funcional de las glándulas endócrinas ya que muchos de los metabolitos encontrados en orina provienen de diferentes glándulas, además de haber presentes metabolitos en orina que pueden estar asociados a factores como son funcionamiento renal, hepático, etc. Los niveles extremadamente bajos en que normalmente se encuentran las hormonas esteroïdes, han hecho que las técnicas de determinación de éstas fueran empleado los métodos analíticos desarrollados en la química, y así se utilizaron técnicas polarográficas

cas, de fluorescencia y de infrarrojo, etc. que requerían además complicadas correcciones matemáticas a fin de minimizar la influencia que sobre los resultados ejercían las llamadas impurezas parásitos, que casi siempre resultaban imposibles de eliminar a pesar de las purificaciones exhaustivas a que se sometía la orina por analizar. (29). Pasando a técnicas microanalíticas que emplean métodos basados en el uso de isótopos radioactivos, de doble dilución isotópica y de cromatografía de gases (30) pero estos métodos resultaban además de costosos no muy precisos y sumamente laboriosos (28). Finalmente se desarrollan las técnicas de análisis por desplazamiento por Murphy y el radioinmunoanálisis de esteroides por Abraham, métodos con que se han logrado avances inusitados e importantes ya que al fin se lograron conocer los niveles reales en fluidos biológicos de las principales hormonas esteroides tanto en individuos sanos como enfermos, siendo métodos que han logrado aplicarse a los análisis clínicos rutinarios, que ayudan al diagnóstico rápido de múltiples padecimientos endocrinos.

IV.- CONSIDERACIONES TEORICAS.

En los antecedentes se hace ver la necesidad de optimizar los métodos inmunoquímicos como es el radioinmunoanálisis para la determinación de niveles hormonales que ayuden al diagnóstico rápido y apropiado de padecimientos endócrinos como es la producción excesiva o disminuída de hormonas esteroideas, con el fin de dar el tratamiento más adecuado a padecimientos tan delicados.

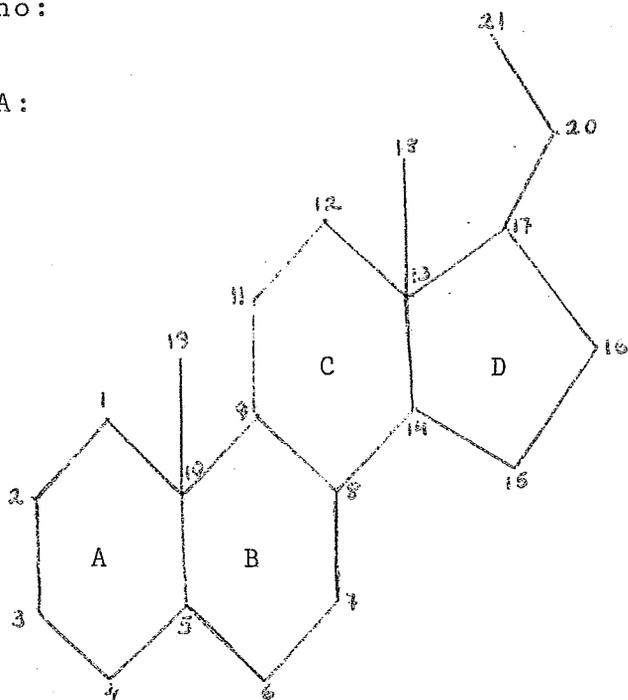
Una hormona se define como toda sustancia producida normalmente en algún lugar del cuerpo por células especializadas y llevada por la corriente sanguínea a otro lugar desde el cual afecta al cuerpo como conjunto.

Las hormonas varían entre amplios límites en cuanto a su composición química, desde aminas (tiroxina, adrenalina, etc.), pasando por las estructuras complejas cíclicas de esteroideas (corticosteroides, andrógenos, estrógenos, etc.) hasta proteínas (gonadotropina coriónica humana, tirocalcitonina, etc.). Las hormonas poseen un alto grado de especificidad estructural. Toda alteración en la composición molecular de una hormona lleva consigo cambios espectaculares en su actividad fisiológica. Así aunque la diferencia estructural entre hormonas sexuales femeninas estradiol y estriol es solo

un grupo oxhidrilo más en la posición 16, el estra
diol es más potente, mientras el estriol es casi -
 inerte en cuanto se refiere a su efecto sobre órgan
 os sexuales accesorios. A nosotros nos interesan-
 en particular las hormonas esteroidales, así como-
 sus precursores, metabolitos y derivados.

Todos los conjuntos esteroides contienen como
 esqueleto fundamental el ciclo pentano perhidrofe-
 nantreno:

FORMULA:



Los anillos A, B, y C están constituidos por 6 átomos de carbono, que forman el núcleo de fenantreno y va unido a un anillo de 5 miembros D, ciclopentano. El prefijo perhidro indica saturación total del núcleo (32).

En esta clase de compuestos están comprendidos productos naturales como esteroides (colesterol), ácidos biliares (ácido colánico), hormonas sexuales (estrógenos, andrógenos), corticosteroides, glicósidos cardiacos (digitoxigenina), sapogeninas (tigogenina) y algunos alcaloides (solasodina).

En la relación a su estereoquímica, son tridimensionales, y así los átomos constituyentes yacen en diferentes planos, dando origen a isómeros. La orientación de los átomos de hidrógeno de los sustituyentes y de la cadena lateral desempeñan un papel muy importante en la distinción de los isómeros. En la mayoría de los casos se tiene un metilo unido a los carbonos 10 y 13, que se encuentran por encima del plano de la molécula y son los puntos de referencia para describir la orientación espacial de otros sustituyentes. Los sustituyentes que están del lado de los grupos metilo, tienen una configuración β , los que están del lado opuesto tienen configuración α .

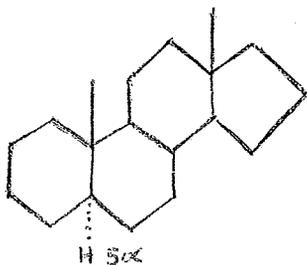
Las uniones entre los anillos son:

- | | |
|-------|-----------------------|
| A y B | Puede ser cis o trans |
| B y C | siempre trans |
| C y D | siempre trans |

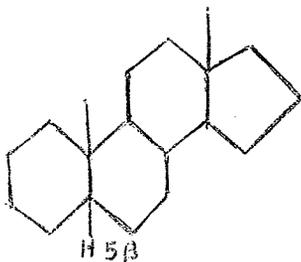
En todas las hormonas naturales.

Además el tipo de unión entre los anillos A- y B da origen a dos divisiones, según si el átomo de hidrógeno en 5 y el metilo en 10 están del mismo lado o en lados opuestos del plano del núcleo, - con la unión A/B trans se tiene la serie 5α dihidro, con la unión A/B cis se tiene la serie 5β dihidro.

ESQUEMAS:



Unión A/B -
serie 5α dihi-
dro



Unión A/B -
cis serie 5β
dihidro

Van unidos al núcleo fundamental, en diversas posiciones, los grupos funcionales que le confieren actividad hormonal al esteroide siendo los principales los siguientes: 3, 11, 17, 20 y 21. Además el anillo A puede ser aromático, o poseer un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 o 5 y 6.

En base a estas estructuras fundamentales los esteroides se clasifican como derivados de ciertos hidrocarburos progenitores: estrano (en estrógenos), androstano (en andrógenos) y pregnano (en corticosteroides y progestinas).

Para describir un compuesto esteroide por nomenclatura química se usan varios sufijos y prefijos que indican el tipo de sustituyente, posición de dobles enlaces, letras referentes a la relación espacial y números que indican posición en el núcleo de los mencionados hidrocarburos progenitores (34).

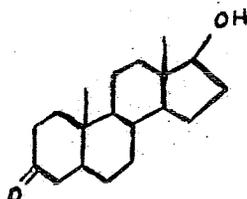
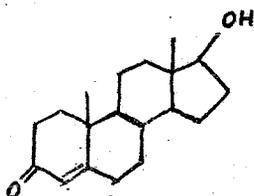
Además existen nombres triviales, que son de uso común.

Como ejemplo de hormonas esteroides tenemos:

A N D R O G E N O S

TESTOSTERONA

5 α -dihidrottestosterona

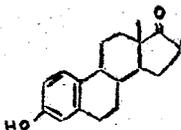


17 β -hidroxi-androst-
-4-en-3-ona

17 β -hidroxi-5 α --
androstan-3-ona

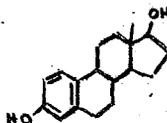
E S T R O G E N O S

ESTRON



3hidroxi-estra-1,3,5(10)
trien-17-ona.

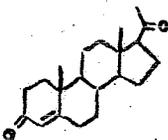
ESTRADIOL



3,17 β-dihidroxi-estra-
1,3,5(10)trieno.

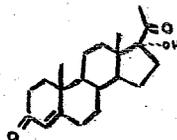
P R O G E S T A G E N O S

PROGESTERONA



Preg-4-en-3,20-diona

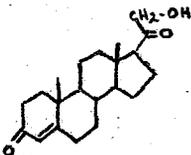
17α-hidroxiprogesterona



17 α-hidroxi-preg-4-en-3,
20-diona.

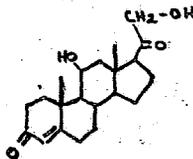
H O R M O N A S C O S T I C O S T E R O I D E S

DESOXICORTICOSTERONA



21hidroxi-preg-4-en-3,
20-diona

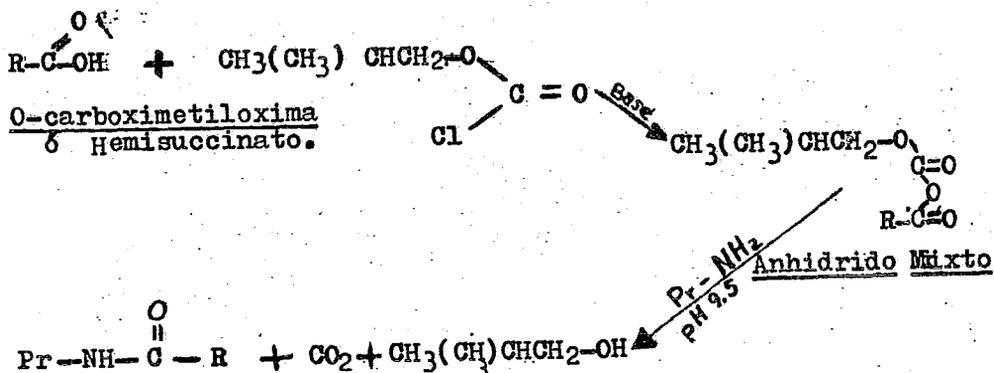
CORTICOSTERONA



11 β,21-dihidroxi-preg-4-en
-3,20-diona.

Como ya se indicó los esteroides por sí solos no son antigénicos, pero por medio de su conjugación a proteínas, en base a la teoría del hapteno de Landsteiner, pueden hacerse antigénicos. En la obtención de los derivados esteroidales y sus conjugados aquí reportados, se utilizaron las reacciones de los esquemas II y III. Siendo de interés el método del anhídrido mixto, reacción que involucra el tratamiento de un ácido carboxílico con un clorocarbonato (clorocarbonato de isobutilo) en presencia de una base, el producto es un anhídrido mixto, formado entre el ácido carboxílico y un éster de ácido carbónico. Tales anhídridos mixtos son moléculas especialmente reactivas, que al tratarse con aminas en condiciones suaves, producen amidas.

METODO DEL ANHIDRIDO MIXTO:



Pr - Residuo de proteína.

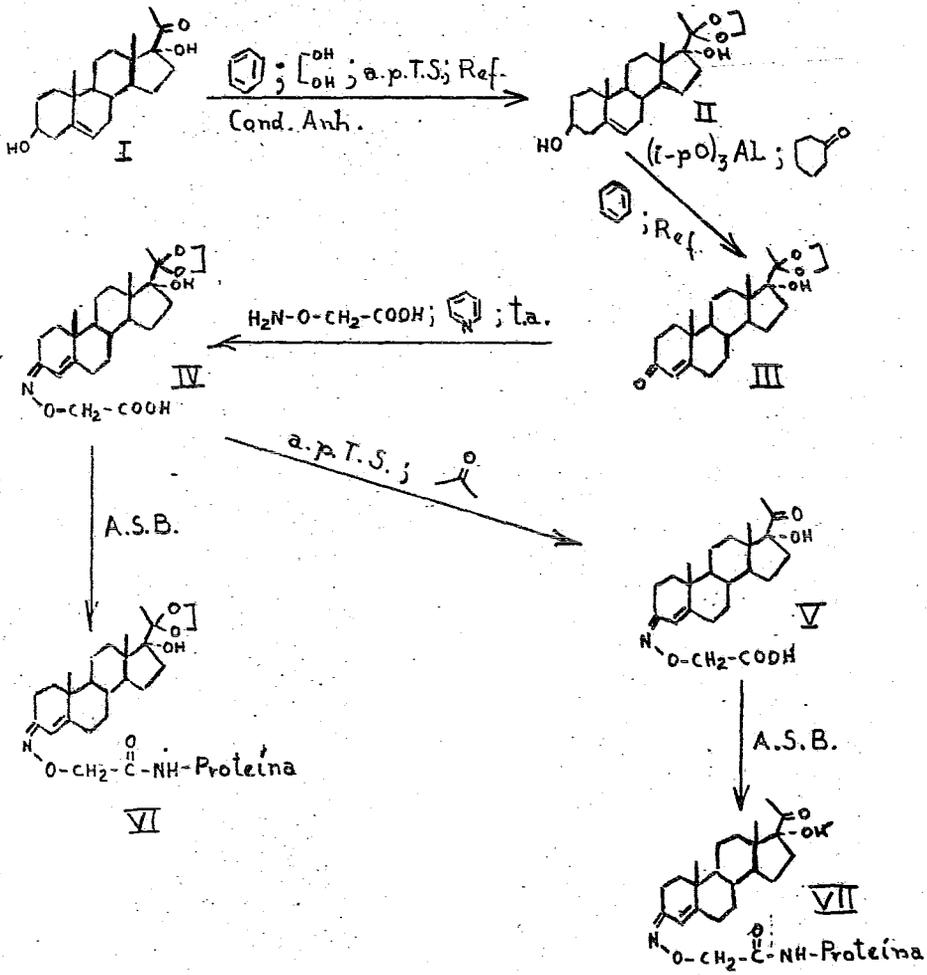
R - Residuo esteroidal.

V.- PARTE EXPERIMENTAL.

Para la determinación de los puntos de fusión (p.f.) se utilizó un aparato Mettler FP-2. Los espectros de ultravioleta (U.V.) se obtuvieron en un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer Coleman 124, empleando como disolvente metanol. Los espectros de infrarrojo (I.R.) se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer 421, en fase sólida (pastilla de KBr). (31)(33).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (R.M.N.) fueron obtenidos en un espectrómetro Hitachi Perkin Elmer R-24B y en un Varian A-60, usando deuterocloroformo como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna, expresando el desplazamiento químico en partes por millón (ppm) se utilizó la escala δ (33).

ESQUEMA II



PREPARACION DE LOS CONJUGADOS DE:

- I) 17 α hidroxiprogesteron-20 etilencetal, 3-(O-carboximetil) oxima. (20,20 etilenedioxi-17 α -hidroxiprogesteron-3-ona-3-(O-carboximetil) oxima).....VI.
- II) 17 α hidroxiprogesteron-3-(O-carboximetil) oxima.
(17 α hidroxiprogesteron-3,20 diona-3-(O-carboximetil) oxima).....VII.

PREPARACION DE 17 α -HIDROXI-PREGNENOLONA-20 ETILEN-
CETAL

(20,20-etilenedioxi-5-pregnen-3 β , 17 α diol)...II

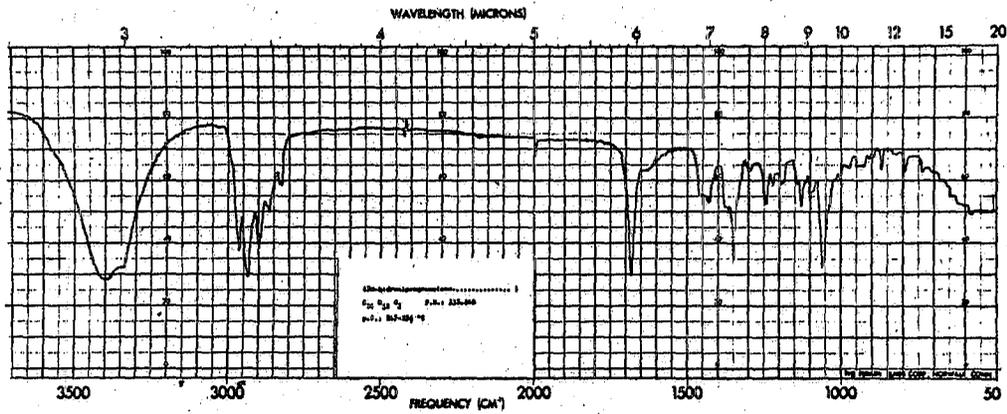
Se hicieron reaccionar 3 gramos de 17 α OH - pregnenolona con 24 ml. de etilen glicol en 180ml. de benceno y ácido paratoluén sulfónico como catalizador en condiciones anhidras (35), durante 20 horas a reflujo y con agitación. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (C.C.F.) se suspendió enfriando el sistema en baño de agua con hielo y adicionando solución saturada de bicarbonato de sodio. El producto fué insoluble en el medio por lo que se filtró y lavó con agua destilada a neutralidad. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, se lavó a neutralidad con agua destilada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en el rotavapor. Se obtuvieron 3.25 gramos de producto, 95% del rendimiento teórico, y se recristalizó de cloroformo-hexano p.f. 180-181°C.

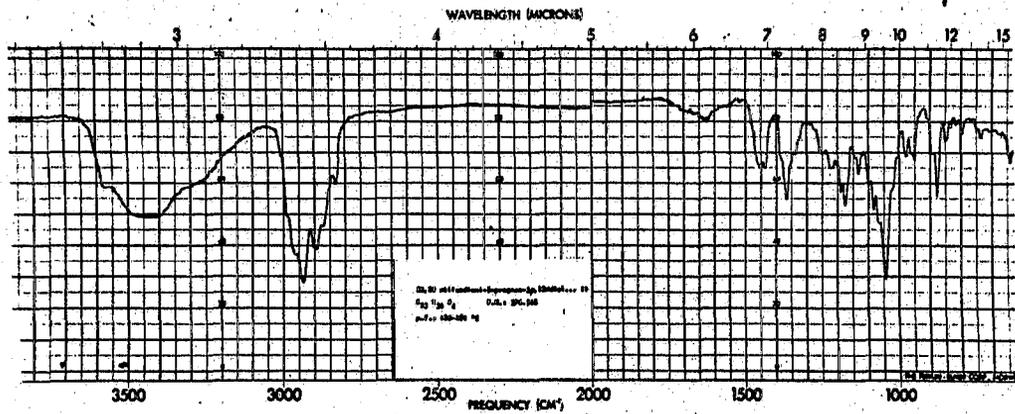
CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS:

I.R. ν máx: 3450cm⁻¹. banda ancha de oxhidrilos; -
1100-1050 cm⁻¹. bandas características de un cetal.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.85 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₈; singulete a 1.02 ppm que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₉; singulete a 1.35 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₂₁; señal múltiple centrada a 3.95 ppm. que integra para 4 protones asignada al cetal en 20; singulete ancho a 5.3 ppm. que integra para 1 protón vinílico de C₆.





PREPARACION DE 17 α -HIDROXIPROGESTERONA-20ETILEN -
CETAL

(20,20-etilen-dioxi-17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona)-
III.

Se hicieron reaccionar 1.4 gramos de 17 α OH-pregnenolona-20-etilén cetal con 32ml. de ciclohexanona en 32ml. de benceno y 1.316g. de iso-propóxido de aluminio como catalizador (36), en condiciones anhidras a reflujo por 3.5 horas. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina (C.C.F.). Se detuvo agregando gota a gota 4ml. de agua. Se filtró para eliminar un producto insoluble, se extrajo con cloroformo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró al rotavapor y con bomba de vacío, quedando una solución con ciclohexanona, ciclohexanol y el producto de la reacción, que fué purificado por cromatografía en columna de sílica gel, obteniéndose 1 gramo de un producto cristalino blanco, 72% del rendimiento teórico. Se recrystalizó de cloroformo-hexano, p.f. 230-231. 2°C.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

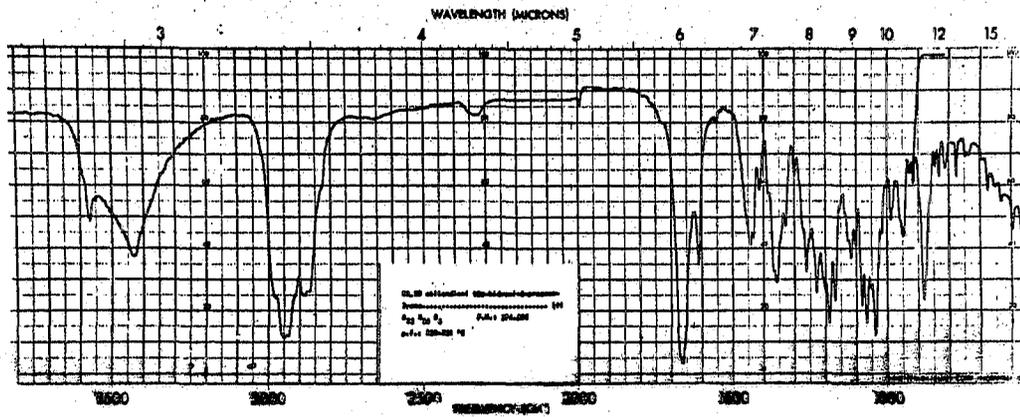
U.V. (Metanol) λ máx.=242nm ϵ =16800 $\log.\epsilon$ = 4.22

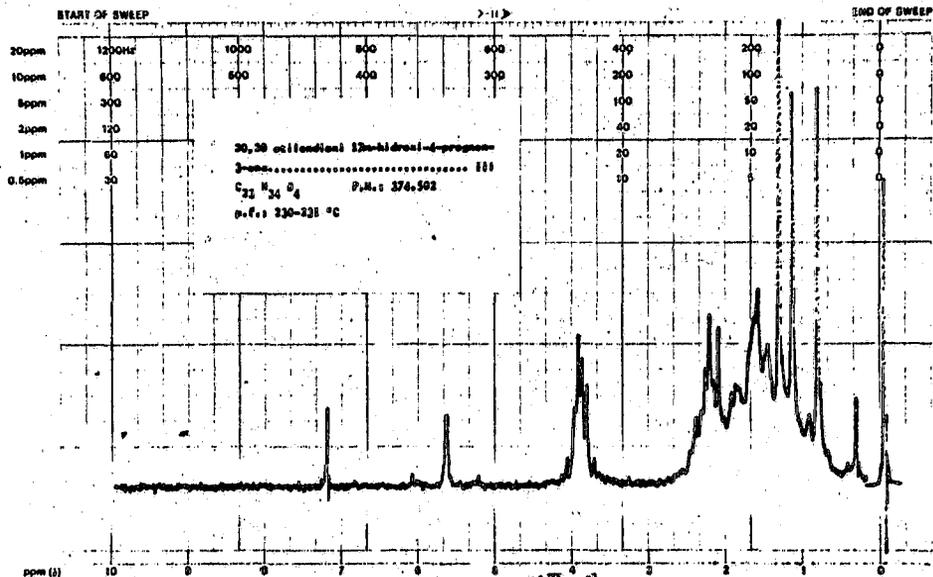
I.R. ν máx: 3440 cm^{-1} banda ancha de oxhidrilo asociado, 3570 cm^{-1} banda aguda de oxhidrilo-

libre; 1670 cm^{-1} banda intensa de cetona conjugada; 1615 cm^{-1} banda mediana de doble enlace conjugado a cetona; $1100-1050\text{ cm}^{-1}$ bandas características de cetal.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.86 ppm que integra para 3 protones asignado al metilo C_{18} ; singuleta a 1.19 ppm que integra para 3 protones asignado al metilo C_{19} ; singulete a 1.34 ppm que integra para 3 protones asignado al metilo C_{21} ; señal simple a 2.13 ppm asignada al protón del grupo $17\alpha\text{OH}$ que desaparece al agregar óxido de deuterio; multiplete centrado a 3.94 ppm que integra para 4 protones asignado al cetal en 20; singulete a 5.7 ppm que integra para 1 protón vinílico de C_4 .





EM-360 60 MHz NMR SPECTROMETER

SPECTRUM AMPL. 1000 SWEEP TIME 5 min SAMPLE: JALSW
 FILTER -05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm or Hz REMARKS: 60°C x 20
 OPERATOR: Paul Englund
 DATE: 10/15/70
 C12 2 31-0.8C 11-
 C12 2 31-1.49 11-

PREPARACION DE 17 α -HIDROXIPROGESTERONA-20-ETILEN
CETAL, 3-(O-CARBOXIMETIL) OXIMA.

(20,20-etilen-dioxi-17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona--
3-(O-carboximetil) oxima.....IV.

0.55 gramos de 17 α -hidroxiprogesterona-20 -
etilen cetal disueltos en 44ml. de piridina se hi-
cieron reaccionar con 0.275 gramos de O-carboxime-
tilhidroxilamina disueltos en 1.2ml. de agua, a -
temperatura ambiente por 16 horas. La reacción se -
detuvo extrayendo y lavando con agua destilada; se
secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó -
a sequedad, obteniéndose un producto cristalino -
blanco que se recrystalizó de cloroformo-hexano, -
P.f. 219-222°C. Rendimiento 50% del teórico, 330mg.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS:

U.V. (metanol) λ máx= 250 nm ϵ = 23244 $\log \epsilon$ = 4.36

I.R. ν máx= 3450 cm^{-1} ancha intensa de OH
de ácido carboxílico; 1740 cm^{-1} banda intensa de -
carbonilo de ácido; 1620 cm^{-1} banda intensa de do-
ble enlace conjugado y de oxima en C₃; 1100-1050 -
 cm^{-1} bandas características de cetal.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.84 ppm. que integra para 3 pro-
tones asignado al metilo C₁₈; singulete a 1.07 que
integra para 3 protones asignado al metilo C₁₉; -
singulete a 1.34 ppm que integra para 3 protones.

asignado al metilo C_{21} ; multiplete centrado a 3.95 ppm. que integra para 4 protones asignado al cetil en 20; singulete a 4.5 ppm que integra para 2 protones asignado al metileno de la cadena en C_3 ; señal ancha centrada a 5 ppm asignada al protón del ácido carboxílico de la cadena en C_3 , que desaparece al agregar óxido de deuterio; singulete a 5.7 ppm. que integra para 1 protón asignado al protón vinílico de C_4 .

PREPARACION DE 17 α -HIDROXIPROGESTERONA-3-(O-CARBO-
XIMETIL) OXIMA.

(17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona 3-(O-carboxime-
 til) oxima.....V.

Se hicieron reaccionar 200 mg. de 17 α -hidro-
 xiprogesterona-20 etilén cetal, 3-(O-carboximetil)
 oxima, disueltos en acetona con una solución de α -
 ácido paratoluensulfónico en benceno, a reflujo -
 por 3 horas. La reacción se siguió por cromatogra-
 fía en capa fina y se detuvo evaporando a sequedad.
 El residuo se disolvió en cloroformo, se lavó con
 agua destilada, se secó sobre sulfato de sodio -
 anhidro y se evaporó a sequedad. Se obtuvo un sólido
 que se recrystalizó de cloroformo-hexano, dando
 cristales blancos, 105 mg 58% del rendimiento teó-
 rico, P.f. 180-184 °C.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS:

U.V. (metanol) λ máx = 251 nm ϵ = 22680 $\log \epsilon$ = 4.35

I.R. ν máx: = 3450 cm^{-1} banda intensa y ancha
 de OH de ácido carboxílico; 1740 cm^{-1} Banda intensa
 de carbonilo de ácido; 1700 cm^{-1} Banda intensa de--
 cetona de cadena alifática (en C₂₀); 1630 cm^{-1} Banda
 de intensidad media de doble enlace conjugado y α -
 de oxima en C₃; no hay bandas de cetal de 1100 a -
 1050 cm^{-1} .

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.67 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₈; señales simples a 1.08 y 1.10 ppm. que integran para 3 protones asignada al metilo C₁₉; isómeros anti y syn de la oxima respectivamente; singulete a 2.2 ppm. que integra para 3 protones asignado a metil cetona; singulete a 4.51 ppm. que integra para 2 protones asignado al metileno de la cadena C₃; señales simples a 5.7 y 6.42 ppm. que integran para 1 protón asignadas al protón vinílico de C₄; correspondientes a los isómeros anti y syn respectivamente, señal ancha centrada a 6.8 ppm. asignada al protón del ácido carboxílico de la cadena en C₃ que desaparece al agregar óxido de deuterio.

PREPARACION DEL CONJUGADO DE LA 17 α -HIDROXIPROGESTERONA-20-ETILEN CETAL, 3-(O-CARBOXIMETIL) OXIMA.

(20,20-etilen dioxi-17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona - 3(O-carboximetil) oxima.....VI.

Se disolvieron 100mg. de 17 α -hidroxiprogesterona-20 etilen cetal, 3-(O-carboximetil) oxima en 2ml. de una solución 2.88% V/V de tri-n-butilamina en dioxano y se hicieron reaccionar con 0.5ml. de una solución 3.2% y V/V de clorocarbonato de isobutilo en dioxano, con agitación a 5°C por 30 minutos, para verterla en una solución alcalina de albúmina sérica bovina (418mg. de A.S.B. en 20ml. de dioxano agua 1:1, más 0.420ml. de solución de hidróxido de sodio 1N (19). Manteniendo agitación, temperatura y pH por 4 horas. La solución se dializó contra agua destilada por 24 horas en refrigeración, el dializado se acidificó con solución de ácido clorhídrico 1N; precipitando el conjugado, que se colectó centrifugando a 2500 rpm por 30 minutos el conjugado se suspendió en agua y se agregó solución saturada de bicarbonato de sodio hasta disolverlo. Se dializó nuevamente y se liofilizó. Por espectroscopía U.V. se calcularon 14 residuos promedio de esteroide por molécula de albúmina sérica bovina.

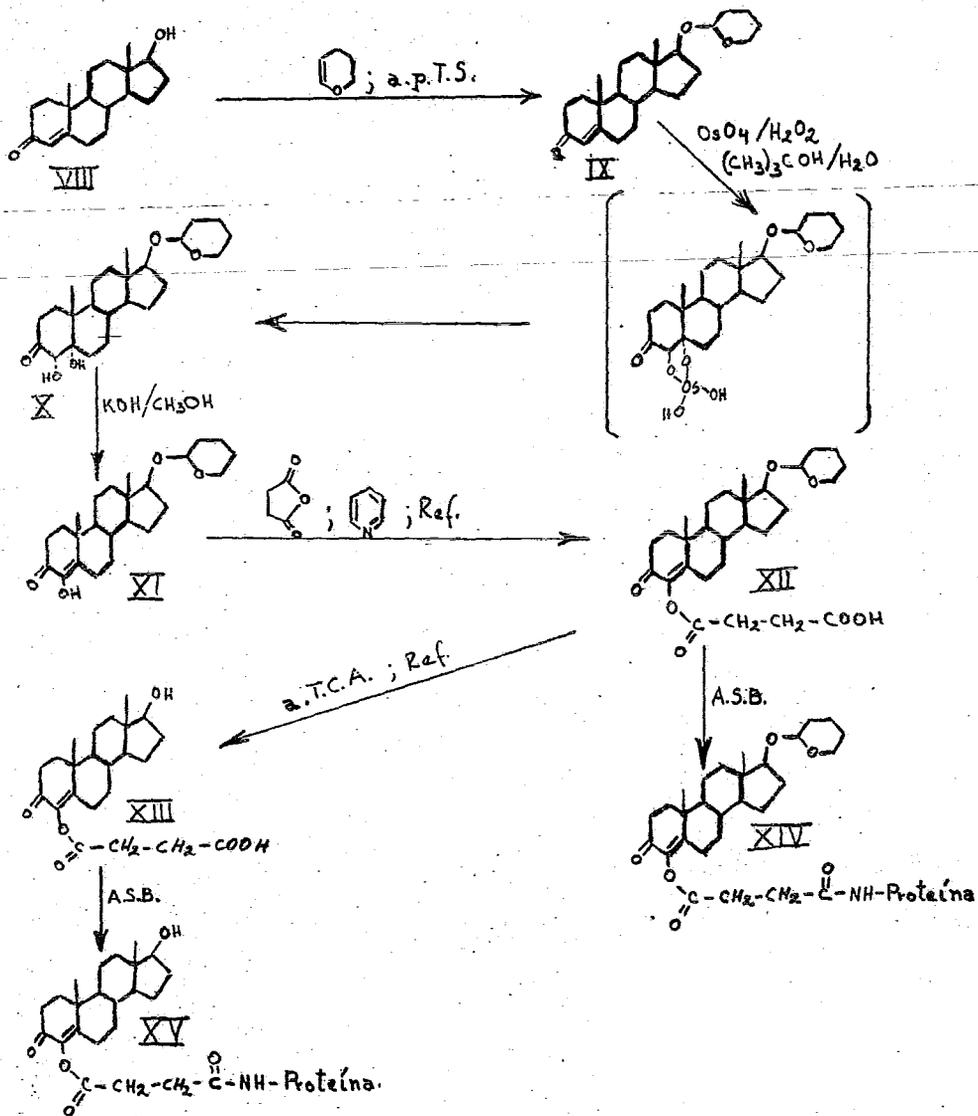
PREPARACION DEL CONJUGADO DE LA 17 α - HIDROXIPROGES
TERONA 3-(O-CARBOXIMETIL) OXIMA.

(17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona 3-(O-carboxime--
til) oxima.....VII.

Se hicieron reaccionar 90mg. de 17 α -hidroxi-
progesterona 3-(O-carboximetil) oxima disueltos en
2ml. de una solución 2.88% V/V de tri-n-butilamina
en dioxano, con 0.5ml. de una solución 3.2% V/V de
clorocarbonato de isobutilo en dioxano, a 5°C con-
agitación por 30 minutos, para verterse a una solu-
ción alcalina de albúmina sérica bovina en dioxano
agua (19), manteniendo agitación, temperatura y
pH por 4 horas. La solución se dializó contra agua
destilada por 24 horas en refrigeración, el diali-
zado se acidificó con solución de ácido clorhídrico
1N, precipitando el conjugado que se colectó cen-
trifugando a 2500 rpm por 30 minutos, se suspendió
en agua y se agregó solución saturada de bicarbona-
to de sodio hasta disolverlo, se volvió a dializar
y se liofilizó.

Por espectroscopía U.V. se calcularon 14 re-
siduos promedio de esteroide por molécula de albú-
mina sérica bovina.

ESQUEMA III



PREPARACION DE LOS CONJUGADOS DE:

III) 4-hemisuccinato de 4-hidroxitestosterona
17 β -tetrahidropiranieter.

(4.- hemisuccionato de 4-androsten -4,17 β -
diol 17-(2'-tetrahidropiranieter)...XIV.

IV) 4-hemisuccinato de testosterona.

(4-hemisuccinato de 4,17 β - dihidroxi-4-an-
drosten-3-ona).....XV.

PREPARACION DE 17 β -TETRAHIDROPIRANIL ÉTER DE TESTOSTERONA.

(17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona 17-tetrahidropirani-
nil éter).....IX.

Se hicieron reaccionar 7 gramos de testoste-
rona con 11.65ml. de dihidropirano en 450ml. de -
éter etílico anhidro, con agitación y ácido para--
toluén sulfónico como catalizador (37). La reac--
ción fué seguida por cromatografía en capa fina, -
terminando en 20 horas. Se agregó una solución al-
5% de bicarbonato de sodio hasta pH básico, se la-
vó con agua destilada a neutralidad, se secó sobre
sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó -
a sequedad, obteniéndose un sólido blanco que se -
repulpó con hexano frío, dando 7 gramos de crista-
les blancos, 77.4% del rendimiento teórico. P.f. -
97-98.1°C.

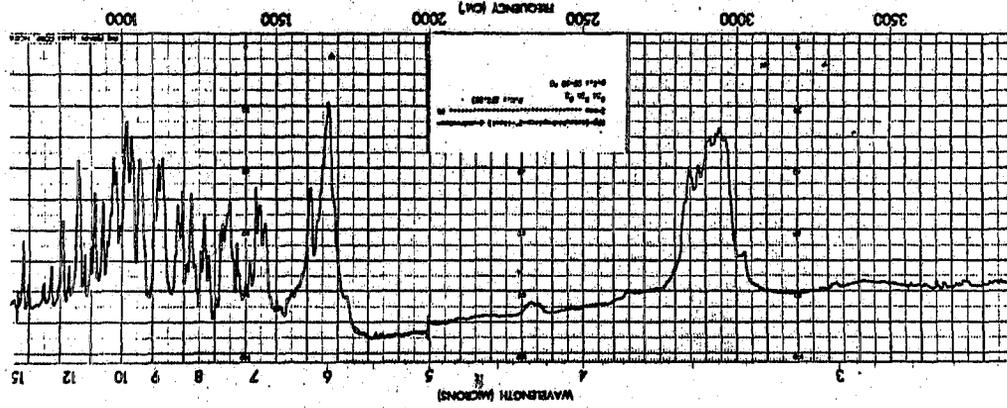
CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

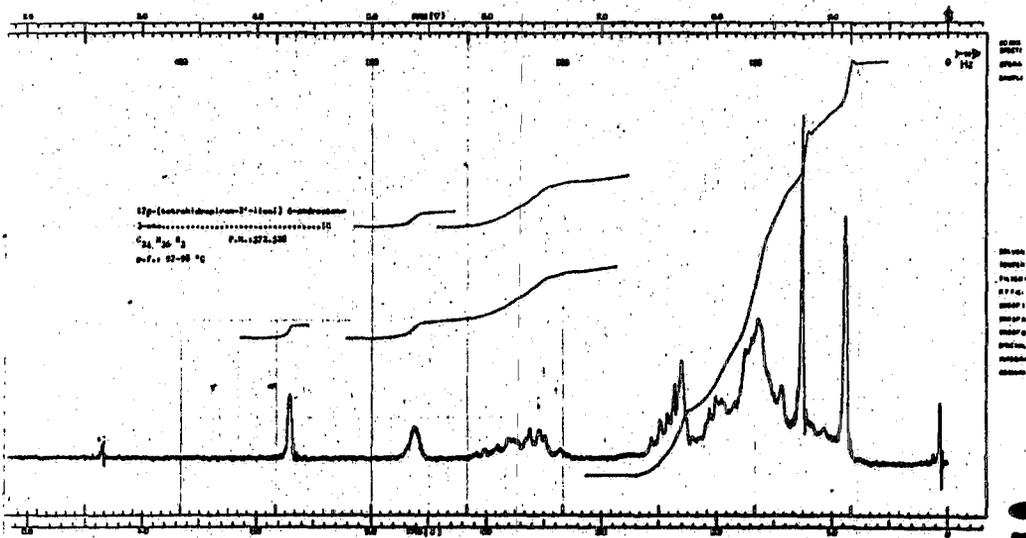
U.V. (metanol) $\lambda_{\text{máx}} = 242.5 \text{ nm}$ $\epsilon = 1200$ $\log \epsilon = 4.0795$

I.R. $\nu_{\text{máx}}: 1679 \text{ cm}^{-1}$ banda intensa de ceto
na conjugada en anillo de 6 miembros; 1610 cm^{-1} -
banda de intensidad media de doble enlace conjuga-
do, $1100 \text{ a } 1000 \text{ cm}^{-1}$ bandas del dieter del tetrahi-
dropiraniilo.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales

Singuleta a 0.82 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C_{18} ; singulete a 1.18 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C_{19} ; multiplete entre 3.25 y 4.1 ppm. asignado al protón H_{17} ; señal simple ancha que integra para 1 protón asignado al protón H_2 ; singulete a 5.64 ppm. que integra para 1 protón asignado al protón vinílico H_4 .





PREPARACION DE (4,5)-CIS-17 β -TRIHIDROXI-ANDROSTAN
3-ONA 17 β -TETRAHIDROPIRANIL ETER.

(17 β - tetrahidropiran-2'-iloxi) 4,5-dihidroxi-an-
drostan-3-ona).....X.

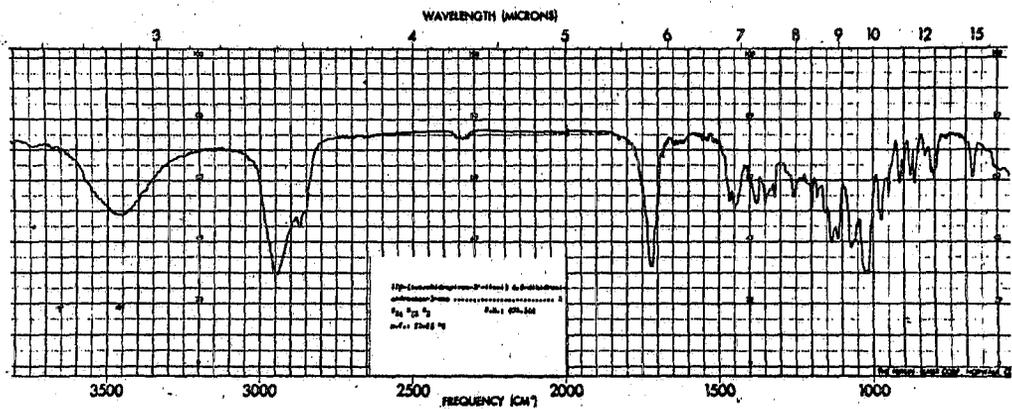
Se preparó una solución de 7 gramos de 17 β -te-
trahidropiranil éter de de testosterona en 340ml --
de terbútanol con 4ml de agua y 29ml de peróxido de
hidrógeno al 30%, haciendose reaccionar con una so-
lución de tetróxido de osmio en terbutanol (320mg -
/56ml.). (38). La reacción se efectúo a temperatura
ambiente y controló por cromatografía en capa fina-
El tiempo de reacción fué de 72 horas al cabo de -
las cuales se agregó solución saturada de cloruro -
sodio y se extrajo con acetato de etilo, se lavó --
con solución de bisulfito de sodio para reducir el-
tetróxido de osmio, se neutralizó con solución de -
bicarbonato de sodio, se lavó con agua destilada, se
evaporó a sequedad. Se obtuvieron 7.3 gramos de un-
sólido blanco, 95% del rendimiento teórico. P.f. 72
-73.3°C.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS:

I.R. \downarrow máx: 3460 cm^{-1} banda ancha de oxhidrilos; -
1720 cm^{-1} banda intensa de cetona; 1100 cm^{-1} bandas
del dieter del tetrahidropiraniilo.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.8 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₈; singulete a 1.05 ppm. - que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₉ singulete a 3.1 ppm que integra para 2 protones - asignado a los protones de los alcoholes en 4 y 5- que desaparece al agregar óxido de deuterio; multi- plete entre 3.2 y 4.1 ppm. asignado al protón H₁₇; singulete ancho a 4.61 ppm asignado al protón H₂.



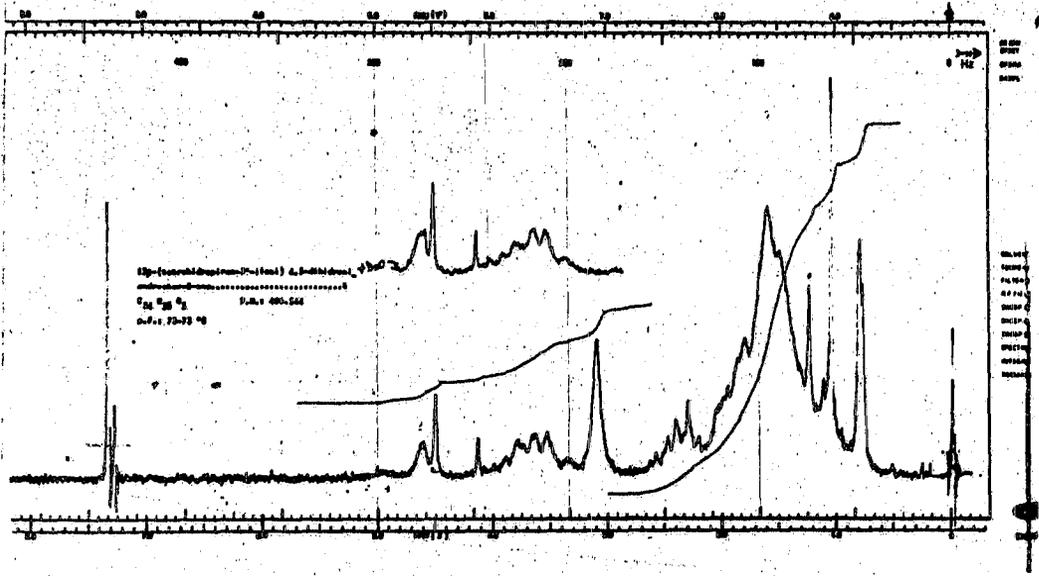
PREPARACION DE 4-HIDROXI-17 β (TETRAHIDROPIRAN-2'-ILOXI)-ANDROST-4-EN-3-ONA.

(4-hidroxitestosterona-17 β -tetrahidropiraniil éter)
XI

Una solución de 7 gramos de (17 β tetrahidropiran-2'-iloxi) 4,5-dihidroxiandrostan-3-ona en 100ml. de metanol se hizo reaccionar con una solución de 3.35 gramos de hidróxido de potasio en 8.5 ml. de agua y 20 ml. de metanol, a 60°C por 5 minutos. Para verse sobre una solución de ácido acético con hielo, se saturó con cloruro de sodio, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose un sólido que se cristalizó de metanol-éter etílico. P.f. 162.3-163.6°C.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

U.V. (metanol) λ máx = 277nm. $\epsilon = 13000$ $\lg \epsilon = 4.1142$
I.R. ν máx : 3410 cm^{-1} . banda intensa de hidroxilo; 1670 cm^{-1} . banda intensa de cetona conjugada; 1630 cm^{-1} . banda de intensidad media de doble enlace conjugado; 1100 a 1000 cm^{-1} . banda del dieter del tetrahidropiraniilo.



PREPARACION DE 4-HIDROXI-17 β (TETRAHIDROPIRAN-2'-ILOXI)-ANDROST-4-EN-3-ONA.

(4-hidroxitestosterona-17 β -tetrahidropiranił éter)
XI

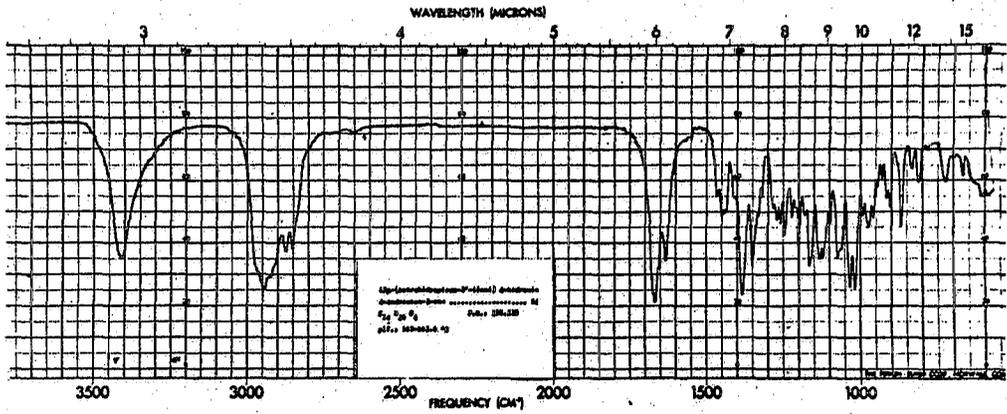
Una solución de 7 gramos de (17 β tetrahidropiran-2'-iloxi) 4,5-dihidroxiandrostan-3-ona en 100ml. de metanol se hizo reaccionar con una solución de 3.35 gramos de hidróxido de potasio en 8.5 ml. de agua y 20 ml. de metanol, a 60°C por 5-minutos. Para verse sobre una solución de ácido acético con hielo, se saturó con cloruro de sodio, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose un sólido que se cristalizó de metanol-éter etílico. P.f. 162.3-163,6°C.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

U.V. (metanol) $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 277nm. $\epsilon=13000$ $\lg \epsilon = 4.1142$
I.R. $\nu_{m\acute{a}x}$: 3410 cm^{-1} . banda intensa de hidroxilo; 1670 cm^{-1} . banda intensa de cetona conjugada; 1630 cm^{-1} . banda de intensidad media de doble enlace conjugado; 1100 a 1000 cm^{-1} . Banda del dieter del tetrahidropiranił.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.8 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₈; singulete a 1.05 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C₁₉; multiplete entre 3.2 y 4.1 ppm. asignado al protón H₁₇; singulete a 4.62 ppm. que integra para 1 protón, asignado al protón H₂; singulete a 6.12 ppm. que integra 1 protón, asignado al protón del alcohol vinílico en 4, que desaparece al agregar óxido de deuterio.



PREPARACION DE 4-HIDROXITESTOSTERONA-17 β -TETRAHI-
DROPIRANIL ETER 4-HEMISUCCINATO.

(4-hidroxi-17 β -(tetrahidropiran-2'-iloxi)-androst
4-en-3-ona 4-hemisuccinato).....XII

Se hizo reaccionar 1 gramo de 4-hidroxites-
terona 17 β -tetrahidropiraniil éter con 2 gramos de
anhidrido succínico en 20ml. de piridina, a refluj
o durante 4 días. La reacción se siguió por crom
atografía en capa fina, se terminó vertiéndola so-
bre agua con hielo, se extrajo con cloroformo, se
eliminó la piridina agregando ácido clorhídrico -
diluido, se lavó con agua destilada, se secó sobre
sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad.
Se obtuvo un producto de aspecto aceitoso que no
cristalizó de varios sistemas de disolventes. Fue
purificado por cromatografía en columna de sílica-
gel, obteniéndose 0.88 g. de un producto resinoso-
que da una sola mancha en cromatografía en capa
fina.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

U.V. (metanol) λ máx = 245 nm ϵ = 14700 $\log \epsilon$ = 4.1673

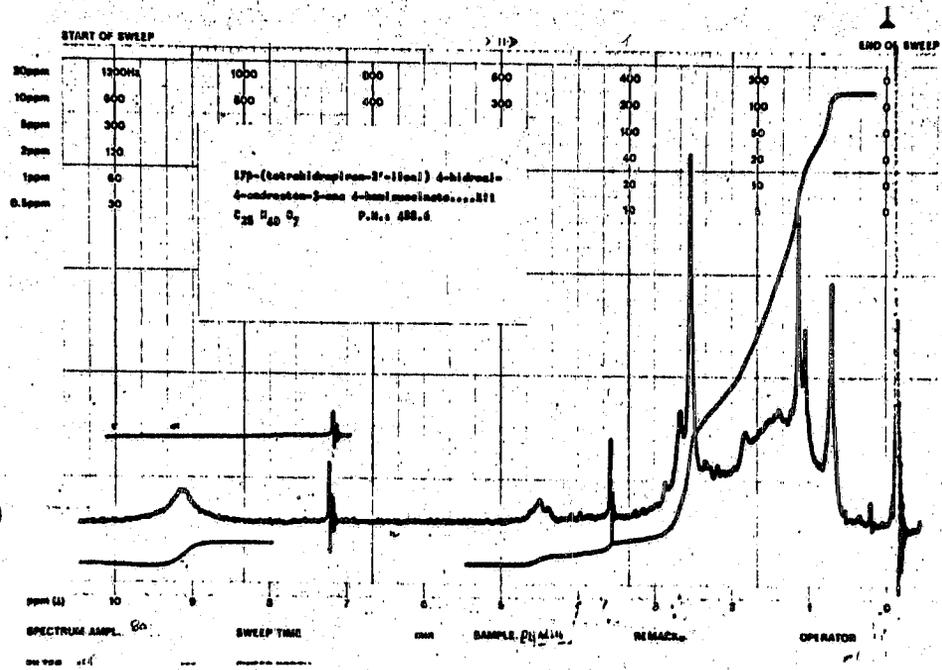
I.R. ν máx: 3500 cm^{-1} banda característica
de OH de ácido carboxílico; 1740 cm^{-1} banda intensa
de carbonilo de éster; 1710 cm^{-1} banda intensa de
carbonilo de ácido; 1670 cm^{-1} banda intensa de ceto-

na conjugada; 1640 cm^{-1} banda de intensidad media de doble enlace conjugado; 1100 a 1000 cm^{-1} bandas del dieter del tetrahidropiraniolo.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.8 ppm que integra para 3 protones, asignando al metilo C_{18} ; singulete a 1.22 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C_{19} ; multiplete entre 2.5 y 2.9 ppm. asignado a los metilenos de la cadena en C_4 ; multiplete entre 3.14 y 4.1 ppm. que integra para 1 protón, asignado al protón H_{17} ; singulete ancho a 4.7 ppm. que integra para 1 protón, asignado al protón H_2 ; señal ancha a partir de 9 ppm. característica de protón de ácido carboxílico.


 varian instruments
 Palo Alto, California



PREPARACION DEL 4-HEMISUCCINATO DE TESTOSTERONA.

(4,17 β -dihidroxi-4-androsten-3-ona-4-hemisuccinato).....XIII.

Se disolvieron 0.5 gramos de 4-hidroxitestosterona-17- β -tetrahidropiranyl éter-4 hemisuccinato en 15 ml. de acetona y se hicieron reaccionar con ácido tricloroacético a reflujo por 15 minutos. La mezcla de reacción se vertió en agua, se saturó con cloruro de sodio, se extrajo con acetato de etilo, se lavó a neutralidad con agua destilada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose un producto de aspecto aceitoso que no cristalizó de varios sistemas de disolventes.

CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS

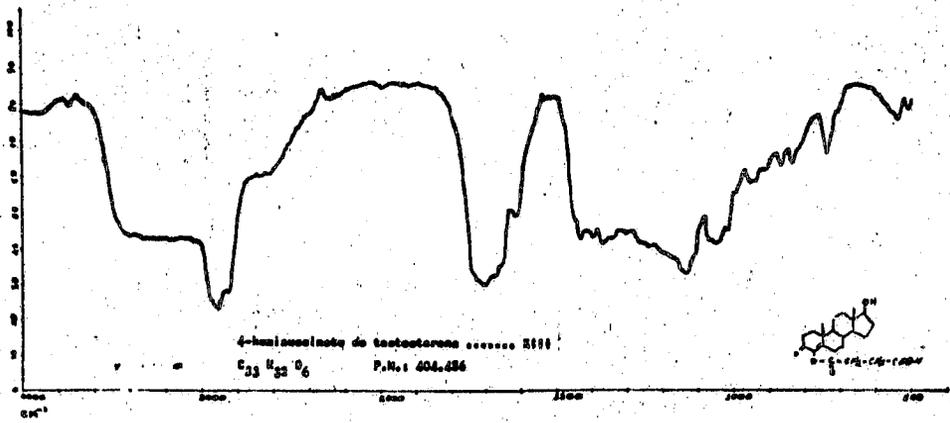
U.V. (metanol) $\lambda_{\text{máx}} = 247\text{nm}$ $\epsilon = 8100$ $\log \epsilon = 3.9085$

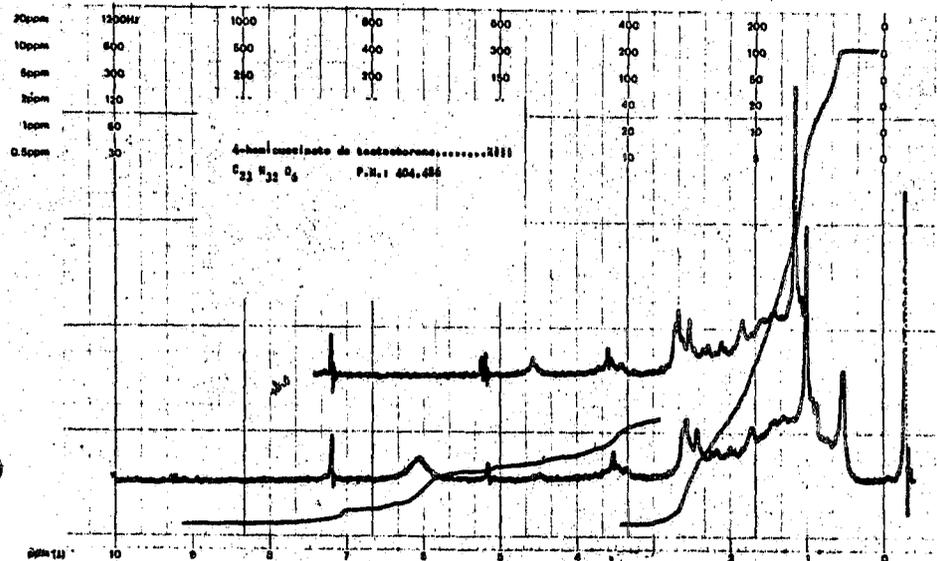
I.R. $\nu_{\text{máx}}: 3400 \text{ cm}^{-1}$ banda característica de OH de ácido carboxílico; 1710 cm^{-1} banda intensa de carbonilo de éster; 1680 cm^{-1} banda intensa de carbonilo de ácido; 1665 cm^{-1} banda intensa de cetona conjugada; 1610 cm^{-1} banda de intensidad media de doble ligadura conjugada.

R.M.N. A 60 Mhz presenta las siguientes señales:

Singulete a 0.83 ppm. que integra para 3 protones asignado al metilo C_{18} ; singulete a 1.29 ppm

que integra para 3 protones, asignado al metilo C_{19} ; multiplete entre 2.6 y 3 ppm que integra para 4 protones, asignado a los metilenos de la cadena en C_4 ; multiplete de 3.7 a 4.1 ppm asignado al protón H_{17} ; señal ancha a 6.34 ppm que desaparece al agregar óxido de deuterio, asignada al protón del ácido carboxílico de la cadena en C_4 .





EM-360 60 MHz NMR SPECTROMETER

SPECTRUM AMPL. 4000 SWEEP TIME 5 min SAMPLE: O=C1CCCC(O)C1 REMARKS: OPERATOR
 FILTER .05 SWEEP WIDTH 10 name of Hz. DATE 8/31/57

PREPARACION DEL CONJUGADO DE 4-HIDROXITESTOSTERONA
17 β -TETRAHIDROPIRANIL ÉTER 4-HEMISUCCINATO...XIV.

Se hicieron reaccionar 100 mg. de 4-hidroxi-testosterona 17 β -tetrahidropiránil éter 4-hemisuccinato, disueltos en 2ml. de una solución 2.88% V/V de tri-n-butilamina en dioxano, con 0.5ml. de una solución 3.2% V/V de clorocarbonato de isobutilo en dioxano, a 5°C por 30 minutos, para verter la a una solución alcalina de albúmina sérica bovina en dioxano-agua, manteniendo la reacción con agitación, pH y temperatura constantes por 4 horas (19). La solución se dializa contra agua destilada en refrigeración durante 24 horas. El dializado se precipitó por adición de solución de ácido clorhídrico 1N y se colectó por centrifugación 30 minutos a 2500 rpm. El precipitado se suspendió en agua y se agregó solución saturada de bicarbonato de sodio hasta disolverlo, se dializó nuevamente y se liofilizó.

Por espectroscopía U.V. se calcularon 14 residuos promedio de esteroide por molécula de albúmina sérica bovina.

PREPARACION DEL CONJUGADO DEL 4-HEMISUCCINATO DE -
TESTOSTERONA.....,XV.

Se disolvieron 100mg. del 4-hemisuccinato de testosterona en 2ml. de una solución 2.88% V/V de tri-n-butilamina en dioxano para hacerse reaccionar con 0.5ml. de una solución 3.2% V/V de clorocarbonato de isobutilo en dioxano, por 30 minutos en refrigeración con agitación, para verse a una solución alcalina de albúmina sérica bovina en dioxano-agua, manteniendo agitación y condiciones constantes por 4 horas (19). La solución se dializó contra agua destilada, en refrigeración por 24 horas. El producto dializado se precipitó agregando solución de ácido clorhídrico 1N, el conjugado fué colectado por centrifugación 30 minutos a 2500 rpm, se suspendió en agua destilada y se agregó solución saturada de bicarbonato de sodio hasta di solución. Se dializó nuevamente y se liofilizó.

Por espectroscopía U.V. se calcularon 28 residuos promedio de hapteno por molécula de albúmina sérica bovina.

VI. RESULTADOS Y COMENTARIOS.

RESULTADOS:

Se prepararon los 4-hemisuccinatos de la 4-hidroxitestosterona y del (17 β -tetrahidropiranyl oxi) 4-hidroxitestosterona, las 3(0-carboximetil) oximas de la 17 α -hidroxiprogesterona y del 20 etilen cetal de la 17 α -hidroxiprogesterona y se conjugaron a albúmina sérica bovina como se indica en los esquemas II y III.

Los derivados esteroidales así como los intermediarios en su preparación, fueron caracterizados por medio de espectroscopía ultravioleta y de infrarrojo y por espectrometría de resonancia magnética nuclear, se determinó además punto de fusión y análisis por cromatografía en capa fina de sílica gel, de cada uno de los productos. El número de haptenos unidos por molécula de albúmina sérica bovina en los conjugados preparados, se obtuvo mediante espectrofotometría ultravioleta.

COMENTARIOS:

Los conjugados liofilizados han sido empleados en dosis de 1mg/ml en solución salina isotónica con 1ml de adyuvante completo de Freund, como antígenos en procesos de inmunización activa en conejos.-

Se obtuvieron resultados positivos en la detección de anticuerpos para la testosterona, en los animales de experimentación. Se harán sangrías de prueba en los conejos tratados con los otros antígenos para comprobar la respuesta al tratamiento y para determinar si los conjugados preparados con los grupos protectores 20 etilen cetil y 17 β tetrahidropiranyl éter, para la 17α -hidroxiprogesterona y testosterona respectivamente, quedan inalterados al entrar al organismo de los animales de experimentación en los procesos de inmunización o si sufren lisis, con lo que se obtendrían anticuerpos específicos contra los esteroides con sus grupos protectores si no hay lisis, o contra las hormonas 17α -hidroxiprogesterona y testosterona si hubiera lisis.

Finalmente, se utilizó el anillo A del núcleo de los esteroides para preparar los derivados y sus conjugados a albúmina sérica bovina, en el caso de la 17α -hidroxiprogesterona con el objetivo particular de que por el reconocimiento inmunológico dirigido hacia la parte superior de la molécula (anillo D y sustituyentes), los anticuerpos producidos puedan diferenciar 17α -hidroxiprogesterona de progesterona mediante su utilización en el radioinmunoanálisis, debido a que los procedimientos para determinar los niveles de la primera no son -

eficientes, pues interfiere la progesterona. En el caso de la testosterona la posición utilizada ha -
mostrado para otros esteroides inducir la produc-
ción de anticuerpos altamente específicos.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Yalow, R.S. and S.A. Berson, *J. Clin. Invest.* 39: 1157 (1960)
- (2) Felber, J.P. *Helv. Med. Acta.* 33:367, (1967).
- (3) Mikhail, G., C. Hsiu-Wu, M. Ferin, and R.L. Vande Wiele, en: Peron, F.G., and B.V. Caldwell (Eds.), *Immunologic Methods in Steroid-Determination*, Appleton-Century-Crofts, New-York, (1970), p. 43.
- (4) Abraham, G.E., *J. Clin. Endocr.* 29:866,(1969)
- (5) Ekins, R.P., G.B. Newman and J.L.M. Riordan, en: Hayes R.L., Goswitz, F.A., and Murphy B.E.P. (Eds.) *Radio isotopes in Medicine, "In vitro" Studies, U.S.A.*, Ed. Oakridge, (1968), p. 59.
- (6) Murphy, B.E.P., *J. Clin. Endocr.* 27:973, (1967).
- (7) Murphy, B.E.P., *Recent. Progr. Hormone Res.* 25:563, (1969).
- (8) Odell, W.D., en: Peron, F.G. and B.V. Caldwell (Eds.) *Immunologic Methods in Steroid-Determination*, Appleton-Century-Crofts, New-York, (1970), p. 225.

- (9) Murphy, B.E.P., Nature London. 201:679, (1964)
- (10) Ferin, M., S.M. Beiser and R. Vande Wiele, -
Vitamins and Hormones, 31:175, (1973).
- (11) Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions. Dover Publications, Inc. N.Y. (1962).
- (12) Barret, J., Inmunología, Ed. Ineramericana, -
México,. (1972).
- (13) Clutton, R.F., C.R. Harrington and M.E. Yuill., Biochem. J. 32:1119, (1938).
- (14) Mooser, H. and R.K. Grilichess., Schweiz Z.-
Allg. Pat. u. Bakt, 4:375, (1941).
- (15) Sprunt, D.H., A.D. Dulaney and R. Conger., -
Cancer Research., 11:282, (1951).
- (16) Goodfriend, L. and A.H. Schon., Nature London, 185: 764, (1960).
- (17) Goodfriend, L. and A.H. Schon., Can. J. Biochem. Physiol., 36:1177, (1958).
- (18) Erlanger, B.F., F. Borek, S.M. Beiser and S. Lieberman., J. Biol. Chem., 228:713, (1957).
- (19) Erlanger, B.F., F. Borek., S.M. Beiser and -
S. Lieberman., J. Biol. Chem., 234:1090, -
(1959).

- (20) Lieberman S., B.F. Erlanger, S.M. Beiser and F.J. Agate., Recent. Progr. Hormone Res., - 15:165, (1959).
- (21) Erlanger, B.F., S.M. Beiser, F. Borek, F. - Edel and S. Lieberman, en: C.A. Curtis and - M.N. Chase (Eds.) Methods in Immulogy and - Immunochemistry. Academic Press, New York. - Vol. I, (1966) p. 144.
- (22) Midgley, A.R. and G.D. Niswender, en: E. Di- cafalusy (ED.) Steroid Assay By Protein Bin- ding. Karolinska Stukhuset Stockholm. (1970) p. 320.
- (23) Midgley, A.R., G.D., Niswender and S.S. Rain Steroids, 13:731, (1970).
- (24) Erlanger, B.F., Pharmacological Reviews 25 - No. 2: 271, (1972).
- (25) Abraham, E.G. and P.K. Grover, en: Odell D.- W. and W. Daghaday (Eds.) Principles Of Pro- tein Binding Analysis. Cambridge University- Press, Cambridge Mass. (1972) p. 146.
- (26) Marker Et. Al., J. Am. Chem. Soc. 62:648, - (1940).
- (27) Butenandt, A.Z., Nature London. 130:238, - (1932).

- (28) Jayle, M.F., Analyse Des Steroides Hormoneux Masson Et. Cie. Editeurs, Vol. I, (1961).
- (29) Dorfman, R.I., Methods in Hormone Research.- Academic Press, New York (1962).
- (30) Wotiz H.H. and S.J. Clark. Gas Chromatogra--
phy in the Analysis of Steroid Hormones. Ple
nums Press. New York. (1966)..
- (31) Nakanishi K. Infrared Absorttion Spectrosco-
py., Holden day, Inc. San Francisco. (1962).
- (32) Klyne W., Química de los Esteroides., Comp.-
Ed. Continental S.A., España. (1970).
- (33) Silverstein R.M., C.G. Bassley and T.C. Mo--
rill. Spectrometric Identification of Orga--
nic Compounds, 3rd. Ed., John Wiley & Sons -
Inc. Ed., New York. (1974).
- (34) IUPAC. Commission on the Nomenclature of Or-
ganic Chemistry and IUPAC-IUB. Commission on
Biochemical Nomenclature Steroids. 13:277, -
(1967).
- (35) Fried J. and J.A. Edwards. Organic Reactions
in Steroids Chemistry. Van Nostrand Reinhold
Company. N.Y. Vol. I, (1972). p. 406.
- (36) Hartung Y. and Cressly., J. Am. Chem. Soc. -
58:101, (1936).

- (37) Ott, A.C., M.F. Murray and R.L. Pederson. J. AM. Chem. Soc. 74:1239, (1952).
- (38) Eastham, J.F., G.B., Miles and Ch. A. Krauth J. Am. Chem. Soc. 81:3114, (1959).

