

00502  
23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

SINTESIS DE 17ALFA-ACILOILOXI DERIVADOS  
DEL PREGNANO CON UN SUSTITUYENTE EN  
C-16-BETA COMO ANTIANDROGENOS.

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. ELENA GUADALUPE RAMIREZ LOPEZ



MEXICO. D. F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo  
Primer vocal: Dr. Alfredo Ortega Hernández  
Segundo vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
Tercer vocal: Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas  
Secretario: Dr. Benjamin Ortíz Mendoza  
Primer suplente: Dra. Marisa Cabeza Salinas  
Segundo suplente: Dr. Bernardo Frontana Uribe

## **SITIOS EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Farmacia. Edificio E. Lab-125. DEPg, Facultad de Química, U.N.A.M.

Departamento de Sistemas Biológicos. Lab-006. UAM-Xochimilco. Bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza Salinas.

## **ASESOR:**

Dr. Eugene Bratoeff Tittf



## **SUSTENTANTE:**

M. en C. Elena Guadalupe Ramírez López



## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que a través del:

-Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico (PASPA) me proporcionó el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado.

-Proyecto IN200301 que otorgó el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Con gran respeto y admiración Al Dr. Eugene Bratoeff que me brindó su apoyo académico y personal para la realización de éste proyecto de investigación. Muchas gracias.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por su invaluable aportación en la determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

A los integrantes del jurado por los comentarios y sugerencias hechos a éste trabajo.

Al M. en C. Alfonso Lira Rocha por la asesoría para utilizar el programa SPARTAN para el análisis y construcción de las moléculas por modelaje molecular.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de UV, IR, RMP, RMN-<sup>13</sup>C y EMIE.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 125 del Departamento de Farmacia en el Edificio E de la Facultad de Química, por el apoyo que me brindaron durante el proceso de este trabajo.

A mi familia por ser mi fuerza y mi orgullo. Gracias y que Dios los bendiga.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
INDICE.....	i
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCION.....	1
Figura 1. Enzimas presentes en la biosíntesis de andrógenos.....	1
Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.....	2
Figura 3. Ejemplos de antiandrógenos.....	4
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
3. HIPOTESIS.....	9
4. OBJETIVOS.....	11
5. DISCUSION Y RESULTADOS.....	13
Etapa A) Análisis y construcción de las moléculas por modelaje molecular.....	13
Tabla 1. Datos de log P (teórico) y la Energía de formación de las moléculas construidas por modelaje molecular.....	15
Figura 4. Moléculas seleccionadas de la literatura que presentaron mayor actividad biológica que el estándar finasterida.....	15
Figura 5. Estructura del conformero más estable de las moléculas <b>19d</b> , <b>20a</b> y <b>20e</b> .....	16
Etapa B) Síntesis y caracterización de los derivados.....	16
Figura 6. Esquema de síntesis.....	17

Derivados BETA METIL.....	20
Tabla 2. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>19a</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	24
Tabla 3. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>19b</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	25
Tabla 4. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>19c</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	25
Tabla 5. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>19d</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	25
Tabla 6. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>19e</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	26
Tabla 7. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>20a</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	28
Tabla 8. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>20e</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	28
Derivados D-HOMO.....	28
Tabla 9. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>24</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	31
Tabla 10. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>25</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	33
Derivados BETA BROMO .....	33
Tabla 11. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>26</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	34
Tabla 12. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>27</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	35
Tabla 13. Asignación del desplazamiento químico del compuesto <b>28</b> en RMN- <sup>13</sup> C.	37
Etapa C) Evaluación farmacológica.....	38
Figura 7. Inhibición del diámetro de la mancha pigmentada de los órganos flanco de animales control y tratados con los esteroides sintetizados.....	40
Figura 8. Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de las vesículas seminales de hámsters machos gonadectomizados y tratados con testosterona.....	41
Figura 9. Efecto de los esteroides sintetizados en la transformación <i>in vitro</i> de T a DHT.....	43
Tabla 14. Valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ) para la formación del complejo	

[ <sup>3</sup> H]DHT-receptor y los valores de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50 % (IC <sub>50</sub> ) de la unión a receptores androgénicos en vesículas seminales.....	44
Figura 10. Especificidad de la unión de los receptores presentes en el citosol de las vesículas seminales en presencia de diferentes esteroides competidores.....	46
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
Etapa A) Análisis y construcción de las moléculas por modelaje molecular.....	47
Etapa B) Síntesis y caracterización de los derivados.....	48
Derivados BETA METIL.....	52
Tabla 15. Cantidad del ácido correspondiente para la síntesis de los compuestos 19a-19e.....	55
Derivados D-HOMO.....	61
Derivados BETA BROMO.....	66
Etapa C) Evaluación farmacológica.....	69
7. CONCLUSIONES.....	75
8. BIBLIOGRAFIA.....	78
9. ANEXO DE ESPECTROSCOPIA.....	87
10. ARTICULO PUBLICADO	

COMPUESTO	ESPECTROS
Acetato de 16-Dehidropregnenolona 12	Espectro 1. IR., Espectro 2. RMN- <sup>1</sup> H
16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona 13	Espectro 3. IR., Espectro 4. RMN- <sup>1</sup> H

3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona <b>14</b>	Espectro 5. IR., Espectro 6. RMN- <sup>1</sup> H
3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno <b>15</b>	Espectro 7. IR., Espectro 8. RMN- <sup>1</sup> H
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-3 $\beta$ -metil-5-pregneno <b>16</b>	Espectro 9. IR., Espectro 10. RMN- <sup>1</sup> H
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona <b>17</b>	Espectro 11. IR., Espectro 12. RMN- <sup>1</sup> H
17 $\alpha$ -Hidroxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona <b>18</b>	Espectro 13. IR., Espectro 14. RMN- <sup>1</sup> H
16 $\beta$ -Metil-4,6-pregnadien-17 $\alpha$ -valeriloxi-3,20-diona <b>19a</b>	Espectro 15. IR., Espectro 16. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 17 y 18. RMN- <sup>13</sup> C
17 $\alpha$ -(5-Bromovaleriloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona <b>19b</b>	Espectro 19. IR., Espectro 20. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 21 y 22. RMN- <sup>13</sup> C, Espectro 23. EMIE
17 $\alpha$ -(5-Clorovaleriloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona <b>19c</b>	Espectro 24. IR., Espectro 25. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 26 y 27. RMN- <sup>13</sup> C, Espectro 28. EMIE
17 $\alpha$ -Ciclopentilcarboniloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona <b>19d</b>	Espectro 29. IR., Espectro 30. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 31 y 32. RMN- <sup>13</sup> C
17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona <b>19e</b>	Espectro 33. IR., Espectro 34. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 35 y 36. RMN- <sup>13</sup> C
16 $\beta$ -Metil-17 $\alpha$ -valeriloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona <b>20a</b>	Espectro 37. IR., Espectro 38. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 39 y 40. RMN- <sup>13</sup> C

17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona <b>20e</b>	Espectro 41. IR, Espectro 42. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 43 y 44. RMN- <sup>13</sup> C
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregneno <b>21</b>	Espectro 45. IR, Espectro 46. RMN- <sup>1</sup> H
3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona <b>22</b>	Espectro 47. IR, Espectro 48. RMN- <sup>1</sup> H
16 $\beta$ -Fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona <b>23</b>	Espectro 49. IR, Espectro 50. RMN- <sup>1</sup> H
16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona <b>24</b>	Espectro 51. IR, Espectro 52. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 53 y 54. RMN- <sup>13</sup> C
16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona <b>25</b>	Espectro 55. IR, Espectro 56. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 57 y 58. RMN- <sup>13</sup> C
16 $\beta$ -Bromo-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona <b>26</b>	Espectro 59. IR, Espectro 60. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 61 y 62. RMN- <sup>13</sup> C, Espectro 63. EMIE
16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -hidroxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona <b>27</b>	Espectro 64. IR, Espectro 65. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 66 y 67. RMN- <sup>13</sup> C, Espectro 68. EMIE
16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -ciclopentilcarboniloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona <b>28</b>	Espectro 69. IR, Espectro 70. RMN- <sup>1</sup> H, Espectros 71 y 72. RMN- <sup>13</sup> C, Espectro 73. EMIE

## RESUMEN

La transformación de testosterona (T) endógena a su metabolito  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) se lleva a cabo en la presencia de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y el cofactor NADPH. La DHT es un potente andrógeno que se relaciona con diversos padecimientos como el acné, la hiperplasia prostática benigna y el cáncer prostático. La inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa por antiandrogénos de tipo esteroidal permite la disminución de la formación de DHT. En nuestro grupo de trabajo se han sintetizado diversos derivados de la progesterona que presentan elevada actividad antiandrogénica con respecto al acetato de ciproterona y a la finasterida que son fármacos de uso actual. Por lo que el objetivo de este trabajo es desarrollar nuevos agentes antiandrogénicos para el tratamiento de diversos padecimientos andrógeno-dependientes. Por lo anterior, en este trabajo se presenta la síntesis de:  $17\alpha$ -aciloiloxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19a-19e**,  $17\alpha$ -aciloiloxi- $16\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a y 20e**,  $16\beta$ -fenil- $17\beta$ -metil- $17\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona **24**,  $16\beta$ -fenil- $17\beta$ -metil- $17\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona **25**,  $16\beta$ -bromo- $17\alpha$ -ciclopentanocarboniloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **28**. Se utilizó como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona por su disponibilidad comercial y la presencia de las funciones químicas necesarias para la transformación a los compuestos de interés. Los esteroides se evaluaron en hámsters machos adultos de la cepa dorada con un peso promedio de 150-200 g, gonadectomizados, bajo anestesia de éter, 30 días antes del estudio. La determinación de la actividad de los esteroides sintetizados se efectuó a través

de cuatro pruebas: en órganos del flanco de hámsters machos, en vesículas seminales, en la transformación (*in vitro*) T a DHT en homogeneizados de vesículas seminales y en receptores androgénicos presentes en la fracción citosólica de vesículas seminales. Se midió la constante de inhibición ( $K_i$ ) de la unión [ $^3$ H]DHT-receptor.

Los resultados de estos análisis mostraron que los esteroides sintetizados presentaron actividad antiandrogénica con respecto al fármaco actual finasterida; siendo los más importantes el derivado **20a** (como inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa), el derivado **19d** (afinidad por el receptor androgénico) y el derivado **20e** en ambos mecanismos de acción biológica.

## ABSTRACT

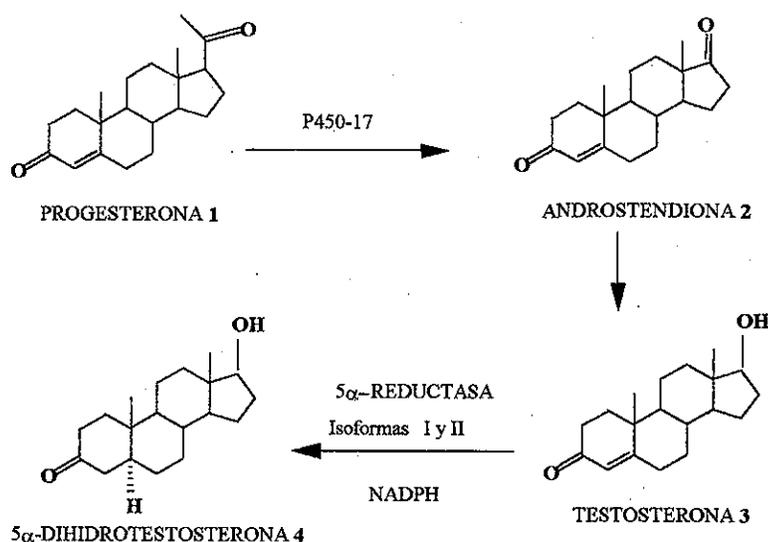
The conversion of endogenous testosterone (T) into the more potent metabolite dihydrotestosterone (DHT) is carried out in the presence of the enzyme  $5\alpha$ -reductase. This process is mediated by the cofactor NADPH. DHT is a potent androgen and is the cause of several diseases such as: acne, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Steroidal antiandrogens inhibit the enzyme  $5\alpha$ -reductase and reduce the concentration of DHT. Our group has synthesized a variety of progesterone derivatives some of which showed a higher antiandrogenic activity as compared to presently used cyproterone acetate and finasteride. The purpose of this study is to develop new steroidal antiandrogens which could be used in the future for the treatment of these androgen-dependent affliction. This study describes the synthesis of the following compounds:  $17\alpha$ -acyloyloxy- $16\beta$ -methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione **19a-19e**,  $17\alpha$ -acyloyloxy- $16\beta$ -methyl-1,4,6-pregnatriene-3,20-dione **20a y 20e**,  $17\beta$ -methyl- $16\beta$ -phenyl- $17\alpha$ -valeroyloxy-D-homopregna-4,6-diene-3,17a-dione **24**,  $17\beta$ -methyl- $16\beta$ -phenyl- $17\alpha$ -valeroyloxy-D-homopregna-1,4,6-triene-3,17a-dione **25**,  $16\beta$ -bromo- $17\alpha$ -ciclopentanecarbonyloxy-1,4,6-pregnatriene-3,20-dione **28**. The commercially available 16-dehydropregnenolone acetate was used as the starting material for this synthesis. This compound has several functional groups which were easily converted to the desired structures. The new compounds were evaluated in gonadectomized adult male golden hamsters with an average weight of 150-200 g. The castration was performed under ether anesthesia 30 days prior to the study. The pharmacological evaluation was carried out in four different models: the flank organs of male hamsters, in seminal vesicles, the effect of the steroids on the conversion of T to DHT in homogenated seminal vesicles.

These compounds were also evaluated as antiandrogens by determining the inhibition constant  $K_i$  for the steroid-androgen receptor in the cytosolic fraction of the seminal vesicles.

The results of this study showed that compound **20a** was a very powerful inhibitor for the enzyme  $5\alpha$ -reductase; on the other hand steroidal **19d** exhibited a high affinity for the androgen receptor (strong androgen) whereas derivative **20e** was involved in both biological mechanisms. The pharmacological activity of these compounds was compared to the presently used finasteride.

## 1. INTRODUCCION

La biosíntesis de andrógenos en el organismo está regulada por 2 enzimas:  $17\alpha$ -hidroxilasa/C17-20 liasa (P450-17) y la enzima  $5\alpha$ -reductasa (figura 1). La enzima P450-17 cataliza la  $17\alpha$ -hidroxilación de la progesterona 1 y la subsecuente ruptura del grupo acetilo (C20-C21) para dar la androstendiona 2 y posteriormente la testosterona 3. La enzima  $5\alpha$ -reductasa cataliza la conversión de la testosterona 3 a un andrógeno mas potente  $5\alpha$ -dihidrotestosterona 4 (1-4).

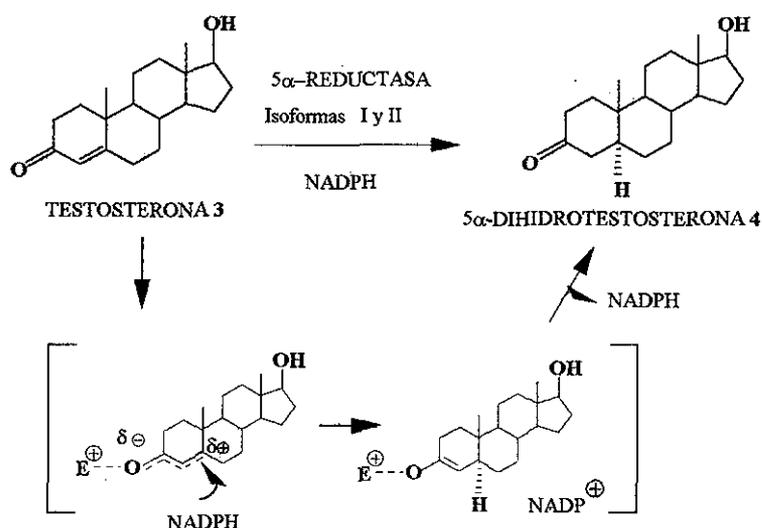


**Figura 1. Enzimas presentes en la biosíntesis de andrógenos.**

La transformación de T 3 a DHT 4 consiste en la adición del hidruo del NADPH (forma reducida de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) a la posición 5 de la testosterona 3 (figura 2). El enolato formado en C3-C4 se estabiliza por algún residuo

electrofílico ( $E^+$ ) de la enzima  $5\alpha$ -reductasa. Posteriormente, por tautomerismo, se da la formación de la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona 4 y la liberación de  $NADP^+$  (1-4).

La enzima  $5\alpha$ -reductasa (3-oxo-esteroide-4-ene-deshidrogenasa), es una proteína hidrofóbica formada por 259 aminoácidos, con un peso molecular de 29,462 Dalton y se localiza en la fracción microsomal de las células blanco para andrógenos (5-8). Se encuentra en dos isoformas denominadas tipo I y tipo II; las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función (9-13). La isoenzima I se encuentra predominantemente en las glándulas sebáceas de la piel y en el hígado, tiene un pH óptimo de 6-9. La isoenzima II predomina en tejido genital, por ejemplo, la próstata, testículos y vesículas seminales. Este tipo de enzima tiene un pH óptimo de 5.5 (10-11) y se relaciona directamente con el cáncer de próstata y a la hiperplasia prostática benigna (1, 3, 5-15).



**Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa.**

El exceso de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona **4** en el organismo está relacionado con una serie de padecimientos andrógeno-dependientes, entre los cuales se encuentran el acné, hirsutismo, alopecia androgénica, hiperplasia prostática benigna y el cáncer prostático; estos padecimientos también se vinculan a factores como la edad, raza, actividad profesional y circunstancias geográficas (3, 12, 20-23). Cada una de estas patologías se relaciona con un tipo de enzima, por ejemplo la isoenzima tipo I está relacionada con el acné y el hirsutismo en mujeres, el cual normalmente va asociado con el síndrome ovárico policístico (PCOS), (22). La hiperplasia prostática benigna y la alopecia androgénica, están asociadas con ambas isoenzimas (20, 21). El cáncer prostático se relaciona con la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa/C17-20 liasa (P450-17) y la enzima  $5\alpha$ -reductasa (isoenzima tipo II), (23).

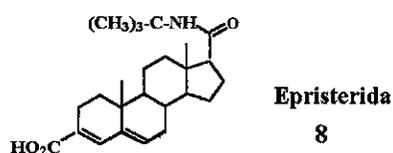
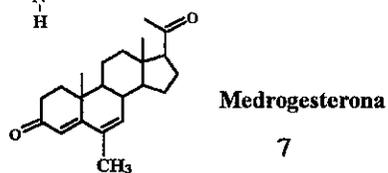
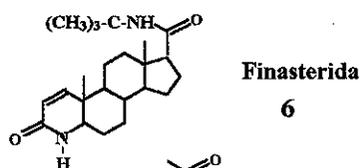
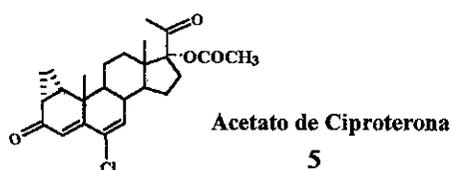
Entre los métodos disponibles para el tratamiento de diversos padecimientos andrógeno-dependientes existe la terapia hormonal utilizando antiandrógenos que modifiquen la producción de andrógenos endógenos (2, 16, 23).

Los antiandrógenos son moléculas que antagonizan los efectos de los andrógenos en sus tejidos blanco, actúan como inhibidores de la biosíntesis de andrógenos al impedir la síntesis o liberación de gonadotropinas del hipotálamo o por acción enzimática sobre la enzima  $5\alpha$ -reductasa para inhibir la conversión de testosterona **3** a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona **4** (figura 2), bloquean el efecto de los andrógenos endógenos por una acción sobre el receptor androgénico y así se promueve la formación de un complejo antiandrógeno-receptor (2, 16).

Los antiandrógenos pueden ser de origen natural como la progesterona **1**, o bien de origen sintético (esteroidal y no esteroidal). Entre los compuestos esteroidales se encuentran el acetato de ciproterona **5**, finasterida **6**, medrogesterona **7** y epristerida **8**. Algunos ejemplos de antiandrógenos no esteroidales son bicalutamida **9**, dietilestilbestrol **10** y ketoconazol **11** (figura 3), (2, 4, 15, 24-26).

### Antiandrógenos

#### Esteroidales



#### No esteroidales

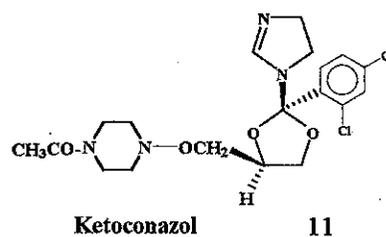
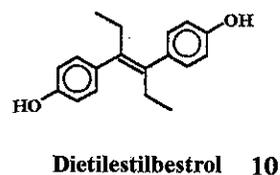
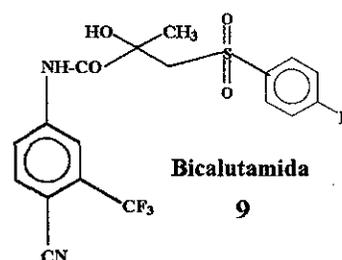


Figura 3. Ejemplos de antiandrógenos

La búsqueda de agentes hormonales antiandrogénicos se ha desarrollado debido a su amplia utilidad en la terapia médica, pues se emplean en el tratamiento del cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, hipersexualidad en el hombre, pubertad precoz en niños, virilización en la mujer, alopecia androgénica y en el tratamiento del acné, entre otros padecimientos (3, 19, 27-30). El uso de los antiandrógenos en la terapia médica, es restringido debido a los efectos colaterales que generalmente ocasionan, como alteraciones hormonales, fallas cardíacas, retención de líquidos, efectos hepatotóxicos severos y pérdida del deseo sexual, entre otras. (3, 16, 20, 29). Los efectos colaterales provocados por estos fármacos constituyen un factor que estimula el esfuerzo para buscar nuevas entidades químicas con mayor potencia antiandrogénica y un mínimo de efectos colaterales.

En nuestro grupo de trabajo, se han sintetizado y caracterizado una gran variedad de moléculas esteroidales derivadas de la progesterona (4, 17, 31-50) con actividad antiandrogénica considerable con respecto a los fármacos comerciales finasterida (inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa), (15, 24, 26) y acetato de ciproterona (competidor por el sitio de unión en el receptor androgénico), (50).

La síntesis de nuevas moléculas esteroidales con actividad antiandrogénica se basa en el análisis de la relación estructura-actividad considerando a las moléculas reportadas en la literatura (17-19, 31-52). Los requerimientos estructurales en las moléculas implican la presencia de sistemas insaturados conjugados en un derivado de progesterona 1; grupos voluminosos en la posición 17 del esteroide o la expansión del anillo D. El conocimiento de estos requerimientos y el mecanismo de acción del fármaco como inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -

reductasa son importantes para el diseño de la síntesis y la evaluación farmacológica de nuevos antiandrógenos.

Un estudio teórico realizado por nuestro grupo de trabajo (36), reveló que el primer paso en la inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa consiste en la formación del complejo de activación enzima-esteroide. La enzima se adicionó al sistema 4-pregnen-3-ona (adición 1-4) del esteroide para formar el complejo. El análisis mostró que en los esteroides con una segunda insaturación que extiende la conjugación se favorece la adición de la enzima al sistema 4,6-pregnadien-3-ona (adición 1-6). Por el cálculo de energía de activación de cada complejo se concluyó que aunque ambos mecanismos de adición (adición 1-4 y adición 1-6) son factibles, se favorece la participación de la enzima cuando hay mayor cantidad de insaturaciones conjugadas en la molécula (36).

Otro punto importante en el diseño de fármacos es la planeación del tipo de evaluación biológica. Algunos estudios de la inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa con derivados 4-aza-esteroides han demostrado que el grupo voluminoso en C-17 de estos compuestos se comporta diferente si se evalúa en ratas, perros o humanos lo que implica que existen diferencias entre las enzimas  $5\alpha$ -reductasas de las diferentes especies (19, 53-55).

Por otra parte, algunos investigadores reportan que la inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa por una serie de 4-aza-esteroides homólogos de la finasterida **6**, depende de la naturaleza del sustituyente en C-4 y C-17 (18, 51, 52). En estos trabajos se demostró que la

inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa se favorece si en C-17 se introduce un sustituyente voluminoso y lipofílico como grupo éster o amida (18, 51). En cambio en C-4 se requiere un grupo pequeño, como un grupo metilo (51, 52).

El parámetro log P (logaritmo del coeficiente de partición) está relacionado con el carácter lipofílico de una molécula y con el paso del fármaco a través de la membrana biológica (compuesta de lípidos) hasta alcanzar el sitio de acción (56). Los fármacos liposolubles ( $\log P > 1$ ) se absorben mejor a través de la membrana (16, 19). El valor de log P se puede determinar experimentalmente (57) o con la asistencia de un programa computacional que realice modelaje molecular y permita generar, visualizar, manipular y predecir estructuras moleculares y sus propiedades fisicoquímicas asociadas. Algunos programas comerciales son SPARTAN, HYPERCHEM, ALCHEMY III, etc. (58). El parámetro log P permite relacionar la lipofilidad de la estructura con su actividad biológica para establecer una relación estructura-actividad (REA) que permita proponer nuevas moléculas para el tratamiento de padecimientos andrógeno-dependientes (18, 51, 52).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El exceso de andrógeno en el organismo está relacionado con una serie de padecimientos como la hiperplasia prostática benigna, el cáncer prostático, acné, hirsutismo y alopecia androgénica, (3, 12, 20-23). Entre los tratamientos que existen para estos desórdenes se encuentra la terapia hormonal, que utiliza antiandrógenos que pueden antagonizar la acción de los andrógenos en sus tejidos blanco (1-4, 16).

El estudio de antiandrógenos como la progesterona **1** (figura 1, página 1), el acetato de ciproterona **5** y la finasterida **6**, (figura 3, página 4), (15, 24-26, 50) ha permitido visualizar los efectos colaterales (alteraciones hepatotóxicas severas y pérdida del deseo sexual, entre otras) que implica el uso de estos agentes (3, 16, 20, 29). Lo anterior estimula el esfuerzo para producir nuevas moléculas antiandrogénicas con mayor potencia y un mínimo de efectos colaterales. En nuestro grupo de trabajo nos hemos enfocado a la búsqueda de moléculas como inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa, pues es el punto clave para inhibir la transformación de la testosterona **3** a su metabolito más potente  $5\alpha$ -dihidrotestosterona **4**, (figura 2, página 2), (1-4).

### 3. HIPOTESIS

Sobre la base de una relación empírica entre el carácter antiandrogénico y la estructura de diferentes moléculas esteroidales reportada en la literatura, se logró establecer los requerimientos estructurales para el diseño de inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa (4, 17-19, 31-52).

#### REQUERIMIENTOS :

- 1.-Presencia del sistema conjugado 4,6-dien-3-ona
- 2.-Grupo electronegativo y voluminoso en C-17
- 3.- Presencia de un grupo alquilo en C-16
- 4.- Expansión del anillo D del esteroide
- 5.- Presencia de un grupo fenilo en C-16

Para proponer la síntesis de nuevas moléculas que cumplieran estos requisitos y predecir estructuras estables, se planteó el uso del modelaje molecular para generar estructuras y calcular algunas propiedades como log P para analizar su carácter lipofílico. Considerando que al incrementar la lipofilidad de una molécula también aumenta su actividad biológica se propuso generar derivados de la progesterona **1** (figura 1, página 1) que tuvieran en C-17 un grupo con libre movimiento como una cadena lineal de 5 átomos de carbono (**19a**) o sus homólogos  $\delta$  halogenados (**19b** y **19c**), (figura 6, página 17). Se consideró también la inserción de grupos con movimiento restringido como el ciclopentilcarbonílico (**19d**) y su homólogo con un átomo de carbono mas (**19e**). Para

analizar la influencia del sistema trieno se planteó la síntesis de los derivados **20a**, **20e** y **25**.

La modificación en el anillo **D** se analizará en las moléculas **24** y **25**.

La influencia en la actividad biológica del grupo metilo en C-16 ya es conocida (31, 34, 38) por lo que se pensó en generar una molécula con un átomo de bromo en C-16 **28** para compararla con el compuesto **20e** que posee un grupo metilo.

#### 4. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se propusieron con base al diseño racional de fármacos para el tratamiento de diversos padecimientos andrógeno-dependientes.

◆Revisión bibliográfica y posterior selección de los esteroides citados en la literatura (4, 17-19, 31-52) como agentes antiandrogénicos potenciales.

◆Generar las estructuras de los esteroides seleccionados de la literatura y las moléculas propuestas en este trabajo por modelaje molecular.

◆◆Análisis conformacional y optimización de la geometría para cada molécula

◆◆Cálculo de los valores de log P utilizando el modelo de Ghose-Crippen .

◆Síntesis, purificación e identificación (métodos espectroscópicos y propiedades físicas de los nuevos esteroides (figura 6, página 17):

◆◆17 $\alpha$ -Aciloiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19a-19e**

◆◆17 $\alpha$ -Aciloiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a y 20e**

◆◆16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona **24**

◆◆16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona **25**

◆◆16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -ciclopentanocarboniloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **28**

◆Determinar y analizar la actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los esteroides con respecto al estándar finasterida **6** que es uno de los fármacos antiandrogénicos de uso actual.

◆◆Se realizarán cuatro pruebas en hámsters machos adultos de la cepa dorada con un peso promedio de 150-200 g, gonadectomizados 30 días antes de los experimentos.

1. La prueba del órgano del flanco
2. Determinación del peso de las vesículas seminales
3. Transformación de la T a DHT en homogeneizados de vesículas seminales
4. La competencia por el receptor androgénico en el citosol de vesículas seminales
  - Determinación de la constante de inhibición ( $K_i$ ) de la unión [ $^3$ T]DHT-receptor
  - Determinación de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50 % de la unión a receptores androgénicos ( $IC_{50}$ ).

## 5. DISCUSION Y RESULTADOS

**Etapa A)** Análisis y construcción de las moléculas por modelaje molecular.

La búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades dependientes del exceso de andrógeno en el organismo, ha originado el diseño racional de ésta clase de fármacos. La mayoría de estos compuestos son derivados de la progesterona **1** (figura 1, página 1), pues se le considera un antiandrógeno natural.

La inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa por una serie de 4-aza-esteroides homólogos de la finasterida **6** (figura 3, página 4), depende de la naturaleza del grupo en C-4 y C-17 del esteroide. La actividad inhibitoria del compuesto aumentó cuando se incorporó en C-17 un sustituyente voluminoso y lipofílico como un grupo éster o amida (18, 51, 52). Después de realizar la revisión bibliográfica se seleccionaron las moléculas **AcMETILO** (4, 38) y **AcDHOMO** (40), (figura 4, página 15) que mostraron mayor actividad biológica con respecto a la finasterida **6**. Posteriormente se propuso la síntesis de algunos derivados de la progesterona **1** con modificaciones en el anillo A (sistemas dieno y trieno) y D (C-16, C-17 y la expansión). Los derivados propuestos fueron:  $17\alpha$ -aciloiloxi- $16\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19a-19e**,  $17\alpha$ -aciloiloxi- $16\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a** y **20e**,  $16\beta$ -fenil- $17\beta$ -metil- $17\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona **24**,  $16\beta$ -fenil- $17\beta$ -metil- $17\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona **25** y  $16\beta$ -bromo- $17\alpha$ -ciclopentanocarboniloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **28**, (figura 6, página 17).

Todas las estructuras se construyeron empleando el modelaje molecular. Se utilizó el programa SPARTAN en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo, bajo las condiciones descritas en la parte experimental. Se generó el confórmero más estable de cada molécula y a partir de ésta estructura se calcularon los valores de log P utilizando el modelo de Ghose-Crippen (58, 59), incluido en el programa. En los datos de la tabla 1 se puede observar que el log P aumentó al introducir: grupo ester en C-17 (**19a-19e**) con respecto al alcohol libre **18**, un átomo de bromo en C-16 (**27**) con respecto al metilo (**18**) y la expansión del anillo D (**23, 24, 25**). La factibilidad para generar las moléculas se analizó en función de su Energía de Formación (Ef), pues a menor valor de Ef mayor estabilidad de la molécula. Esto se observó claramente al comparar los derivados aciloiloxi (**19a-19e, 20a y 20e**), (**24 y 25**), (**28**) con los alcoholes libres de cada serie **18, 23, 27** respectivamente.

Al analizar los resultados biológicos (figuras 7-10) se observó que un grupo aciloiloxi en C-17 proporcionó a la molécula actividad biológica similar o mayor a la presentada por la finasterida. La naturaleza del grupo aciloiloxi (cadena lineal, anillo, etc) modificó su actividad como inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa o como competidor por el receptor androgénico. En la figura 5 se muestran las estructuras del confórmero más estable de las moléculas **19d, 20a y 20e** que presentaron mejor actividad biológica con respecto al estándar finasterida **6**.

Tabla 1. Datos de log P (teórico) y la Energía de formación de las moléculas construidas por modelaje molecular.

Compuesto	Log P Ghose-Crippen	Energía de formación (Ef), kcal/mol
<b>6</b>	2.91	-127.64
<b>18</b>	3.93	-115.37
<b>AcMETIL</b>	4.16	-148.71
<b>19a</b>	5.65	-168.24
<b>19b</b>	5.79	-161.80
<b>19c</b>	5.78	-175.13
<b>19d</b>	4.69	-189.29
<b>19e</b>	4.83	-179.70
<b>20a</b>	5.51	-151.40
<b>20e</b>	4.91	-175.20
<b>23</b>	4.83	-137.33
<b>AcDHOMO</b>	5.85	-123.35
<b>24</b>	6.34	-142.82
<b>25</b>	6.41	-136.18
<b>27</b>	4.05	-142.91
<b>28</b>	4.80	-182.98

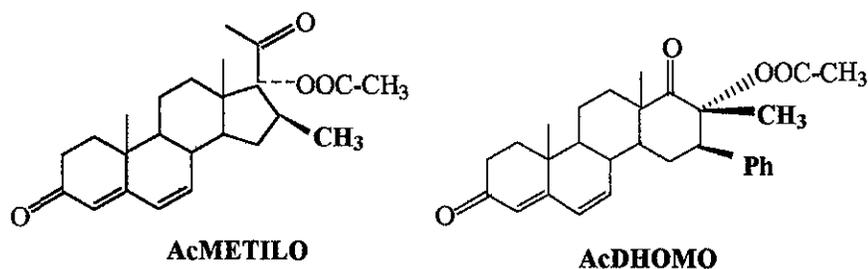
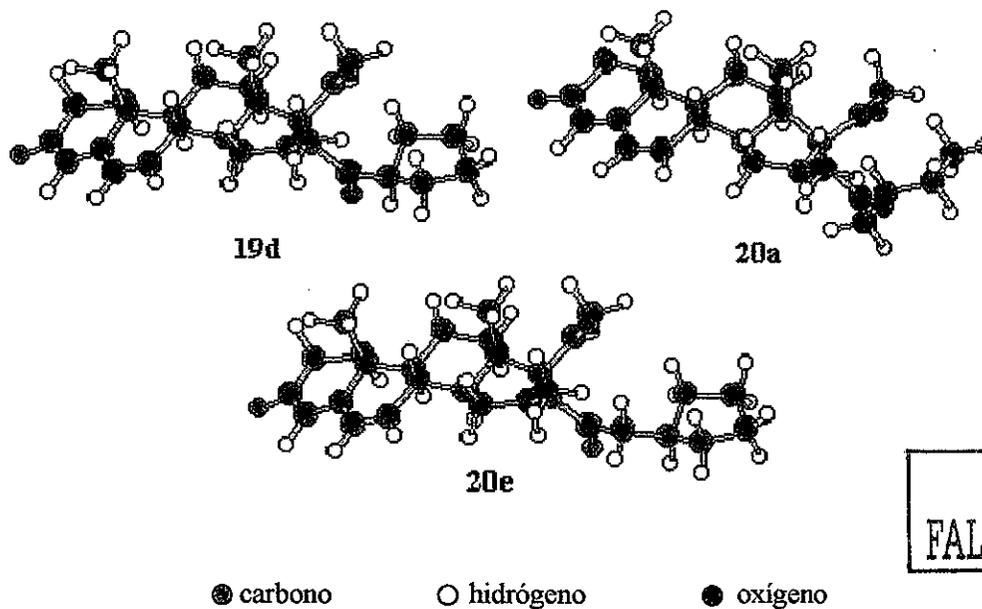


Figura 4. Moléculas seleccionadas de la literatura que presentaron mayor actividad biológica que el estándar finasterida.



**Figura 5. Estructura del conformero más estable de las moléculas 19d, 20a y 20e.**

**Etapa B) Síntesis y caracterización de los derivados.**

La preparación de los derivados esteroidales propuestos en este trabajo se llevó a cabo considerando el esquema de síntesis que se muestra en la figura 6. En primer término se caracterizó a la materia prima **12** por sus propiedades físicas y espectroscópicas (31, 48).

La inserción de un grupo oxirano en la molécula implicó la epoxidación de la doble ligadura en C16- C17. Se utilizó peróxido de hidrógeno al 30 % en un medio básico. La adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidroperóxido sobre la ligadura en C-16 se vio

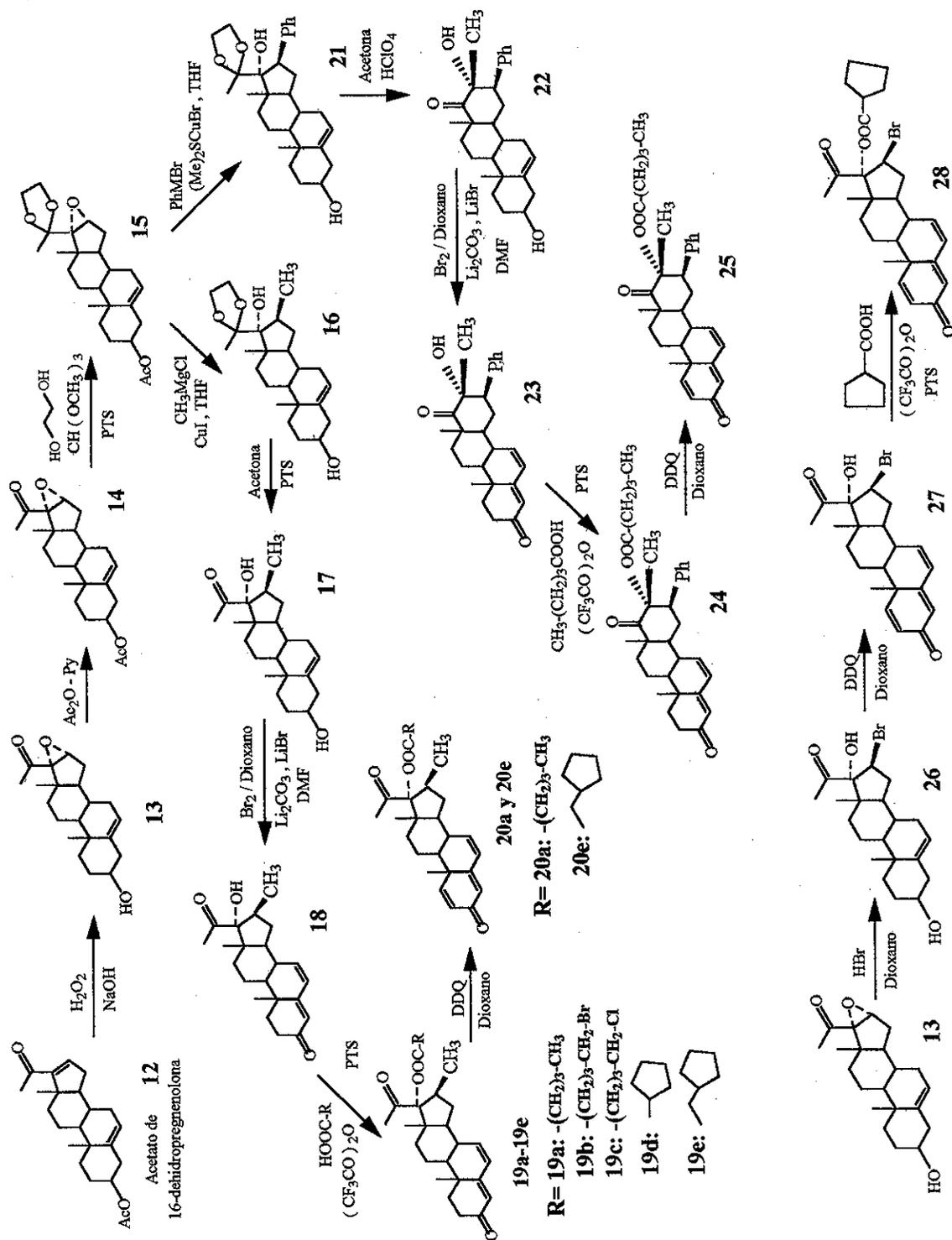


Figura 6. Esquema de Síntesis.

favorecida por la conjugación con la cetona en C-20. El compuesto obtenido **13** se aisló con un rendimiento del 99 % y se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas descritas en la literatura (31, 48).

El espectro de infrarrojo (espectro 3) del derivado **13** presentó una banda débil en  $857\text{ cm}^{-1}$  que se asignó al epóxido en C16-C17 y una banda intensa en  $1692\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20. La banda en  $3371\text{ cm}^{-1}$  se asignó al alcohol. Se observó en  $1056\text{ cm}^{-1}$  una banda de intensidad media que se asignó al enlace C-O del epóxido.

El espectro de resonancia protónica (espectro 4) mostró la señal en 3.6 ppm que integró para un protón y se asignó a H-16, también se registraron tres señales simples a 1.02, 1.05 y 2.03 ppm. Cada señal integró para tres hidrógenos y se asignaron a los protones H-18, H-19 y H-21, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la acetilación del alcohol en C-3 con anhídrido acético y piridina. El derivado acetoxi **14** se obtuvo con un rendimiento del 92 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas (31, 48).

En el espectro de infrarrojo (espectro 5) se observaron dos bandas intensas, una en  $1731\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster y otra banda en  $1697\text{ cm}^{-1}$  que se asignó a C-20. Las bandas en  $1245$  y  $1032\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a las vibraciones C-O-C del grupo acetoxi.

El espectro de resonancia protónica (espectro 6), presentó dos señales en 0.97 y 0.98 ppm, que integraron para tres protones cada una y se asignaron a los protones H-18 y H-19 respectivamente. En 1.96 y 1.95 ppm se observaron dos señales, cada una integró para tres protones, y se asignaron a los protones del metilo del acetoxi en C-3 y a H-21 respectivamente. Las señales a 3.42 y 4.58 ppm se asignaron a los protones H-16 y H-3 respectivamente. También se observó una señal doble de dobles en 5.30 ppm correspondiente al protón vinílico H-6 acoplado a los protones de H-7.

La síntesis del derivado etilendioxi 15, se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de metilo y ácido *p*-toluensulfónico como catalizador (31, 48). El producto 15, se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El espectro de infrarrojo (espectro 7) mostró una banda intensa de  $1719\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del acetoxi en C-3.

En el espectro de Resonancia Magnética Protónica (espectro 8), se observaron cuatro señales a 0.99, 1.04, 1.42 y 2.03 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19, H-21 y de metilo del acetoxi en C-3, respectivamente. En 3.39 ppm se observó el protón H-16. La señal múltiple a 3.97 ppm que integró para cuatro protones se asignó al dioxolano en C-20. La señal múltiple en 4.60 ppm se asignó al protón H-3 y la señal doble de dobles en 5.38 ppm se asignó al protón vinílico H-6.

El siguiente paso de la síntesis fue la apertura del anillo de oxirano, vía un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). En esta reacción se planteó la inserción en C-16 beta de un grupo metilo (tratamiento con cloruro de metilmagnesio y yoduro de cobre como catalizador) **16** (31, 48) o fenilo (tratamiento con bromuro de fenilmagnesio y un complejo de dimetilsulfuro de cobre como catalizador) **21** (40). Cada producto de la apertura generó una serie de compuestos, los cuales se agruparon para su descripción como derivados BETA METIL (**16-19(a-e)**, **20a** y **20e**) y derivados D-HOMO (**21-25**). Por otra parte, con la apertura del anillo de oxirano del derivado **13** con HBr (19) se formaron los derivados BETA BROMO (**26-28**), los cuales presentan un átomo de bromo en C-16 beta orientado.

#### Derivados BETA METIL (**16-19(a-e)**, **20a** y **20e**)

El espectro de infrarrojo del derivado **16** (espectro 9) mostró una banda a  $3450\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los alcoholes en C-17 y C-3, así como una banda intensa en  $1045\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo C-O-C del etilendioxi.

El espectro de Resonancia Magnética Protónica del compuesto **16** (espectro 10) mostró tres señales en 0.83, 1.01 y 1.40 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y H-21 respectivamente. La señal doble en 1.20 ppm se asignó al metilo en C-16. La señal múltiple a 3.50 ppm se asignó al protón H-3. La señal múltiple en 3.92 ppm se asignó a los protones del grupo etilendioxi en C-20. También se observaron los protones de los

hidroxilos libres en C-3 a 3.70 ppm y en C-17 a 2.23 ppm. La señal doble de dobles en 5.30 ppm se asignó al protón H-6 acoplado a los dos protones en C-7.

En el siguiente paso se regeneró el grupo carbonilo en C-20 haciendo una reacción de transcetalización en medio ácido (48). Se utilizó acetona y ác. *p*-toluensulfónico a temperatura ambiente. El producto 17 se obtuvo con un rendimiento del 95 % y presentó las mismas características físicas y espectroscópicas del producto reportado en la literatura (48).

El espectro de IR del compuesto 17 (espectro 11) mostró una banda intensa en 1690  $\text{cm}^{-1}$  que se asignó al carbonilo en C-20, que se generó por la hidrólisis del cetal. Otras bandas de mediana intensidad están en 3400 y 3342  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos hidroxilos en C-3 y en C-17.

En el espectro de RMP (espectro 12) se observaron las señales en 0.96, 0.98, 1.21 y 2.10 ppm correspondientes a los protones H-18, del metilo en C-16, H-19 y H-21, respectivamente. La señal múltiple en 3.50 ppm se asignó al protón H-3 y la señal en 5.31 ppm al protón vinílico H-6.

La formación del sistema 4,6-pregnadien-3-ona en el compuesto 18, se llevó a cabo al hacer reaccionar el compuesto 17 con bromo, carbonato de litio y DMF. El producto 18 se obtuvo con un 70 % de rendimiento y se caracterizó por sus propiedades espectroscópicas y físicas (31, 48). La formación del sistema dieno en el producto 18, se

verificó utilizando la espectroscopía de UV. En el espectro se observó un máximo de absorción a 284.02 nm ( $\epsilon= 23210$ ).

En el espectro de infrarrojo del compuesto **18** (espectro 13) se observó una señal en  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alcohol en C-17, también se observaron dos señales intensas a  $1706$  y  $1666\text{ cm}^{-1}$  que se asignaron al carbonilo en C-20 y C-3, respectivamente.

El espectro de RMP (espectro 14) mostró tres señales simples (integración para tres protones cada una) en 1.16, 1.18 y 2.31 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y H-21, respectivamente. Una señal doble a 1.22 ppm se asignó a los protones del metilo en C-16, también se observaron los desplazamientos a 6.16, 5.72 y 5.40 ppm correspondientes a H-6, H-4 y H-7, respectivamente.

El siguiente paso fue la esterificación del alcohol en C-17 para obtener los compuestos **19a-19e**. La reacción se llevó a cabo con el ácido correspondiente (tabla 15, página 55), anhidrido trifluoroacético y el ácido *p*-toluensulfónico, como catalizador. En el primer paso se formó el anhidrido mixto aciloilxitrifluoroacético que reaccionó con el alcohol en C-17, originando los ésteres correspondientes. Los derivados obtenidos se caracterizaron por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

En los espectros de ultravioleta de cada uno de los derivados (**19a-19e**) se observó un máximo de absorción a 282 nm ( $\epsilon= 23000$ ).

En cada espectro de IR (espectros 15, 19, 24, 29, 33) se observó una señal intensa a 1723-1728  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster y al carbonilo de cetona en C-20. La señal a 1661-1667  $\text{cm}^{-1}$  se asignó al carbonilo en C-3.

En cada espectro de RMP de los derivados **19a-19e** (espectros 16, 20, 25, 30, 34) se observaron tres singuletes (cada uno integró para tres hidrógenos) a 0.8, 1.1-1.2 y 2.0 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y H-21, respectivamente. En cada caso a 1.4 ppm se observó un doblete asignado al metilo en C-16. La señal simple en 5.70 ppm se asignó al protón vinílico H-4. La señal doble a 6.19 ppm que integró para 2H se asignó, en cada derivado, a los protones H-6 y H-7. En el espectro del derivado **19a** (espectro 16) se observó a 0.87 ppm la señal correspondiente a los protones del metilo del éster y la señal a 2.44 ppm se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster. En los espectros de los derivados  $\delta$  halogenados del ácido valérico **19b** y **19c** (espectros 20 y 25 respectivamente) se observó a 3.4-3.6 ppm los protones del metileno unido al átomo de halógeno de la cadena del éster en C-17. La señal a 2.4 ppm se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster.

En el espectro de RMP del derivado **19d** (espectro 30) se observó un quintuplete a 2.8 ppm que se asignó al protón del carbono terciario perteneciente al éster. En el espectro del derivado **19e** (espectro 34) se observó a 2.4 ppm un doblete que se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster.

En cada uno de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **19a-19e** (espectros 17, 18, 21, 22, 26, 27, 31, 32, 35, 36), (tablas 2-6) se observaron las señales en 15, 17, 20 y 28 ppm que se asignaron a los carbonos C-16, C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Las señales a 128, 163, 124, 140, 199, y 204 ppm se asignaron a los carbonos C-4, C-5, C-6, C-7, C-3 y C-20, respectivamente. La señal en 173 ppm (tablas 2-6) se asignó al carbonilo del éster. Las señales en 47 y 95 ppm se asignaron a los carbonos C-16 y el C-17, respectivamente. En el espectro del derivado **19b** (espectro 22, tabla 3) se observó a 34.10 ppm una señal que se asignó al carbono secundario adyacente al átomo de bromo. En el espectro del derivados **19c** (espectro 27, tabla 4) la señal a 44 ppm se asignó al carbono secundario adyacente al átomo de cloro. El espectro del derivado **19d** (espectro 32, tabla 5) mostró una señal a 44.20 ppm que se asignó al carbono terciario del grupo ciclopentiloxi. En el espectro 36 y tabla 6 (compuesto **19e**) se observó un desplazamiento a 40 ppm que se asignó al carbono secundario adyacente al carbonilo del éster (-OCO-CH<sub>2</sub>-ciclopentilo).

Tabla 2. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **19a** en RMN $^{13}\text{C}$ .

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (5)	C-16 $\beta$ :15.00, C-18:16.30, C-19:19.90, C-21:22.20, C-5':13.90
2° (8)	C-1:32.50, C-2:31.70, C-11:20.20, C-12:27.00, C-15:24.30, C-2':34.40, C-3':34.00, C-4':22.20
3° (7)	C-4:128.00, C-6:124.00, C-7:140.90, C-8:37.50, C-9:50.00, C-14:46.53, C-16:47.00
4° (7)	C-3:199.13, C-5:163.00, C-10:36.00, C-13:48.00, C-17:94.76, C-20:204.18, C-1':173.87

Tabla 3. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **19b** en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-16β:15.60, C-18:16.30, C-19:19.90, C-21: 28.00
2° (9)	C-1:33.50, C-2:33.40, C-11:20.20, C-12:33.20, C-15:32.00, C-2':34.00, C-3':33.80, C-4':23.00, C-5':34.10
3° (7)	C-4:128.00, C-6:123.90, C-7:140.10, C-8:38.00, C-9:50.20, C-14:46.00, C-16:47.10
4° (7)	C-3:199.90, C-5:163.10, C-10:36.10, C-13:48.00, C-17:95.10, C-20:204.20, C-1': 173.82

Tabla 4. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **19c** en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-16β:14.80, C-18:18.00, C-19:19.90, C-21: 28.10
2° (9)	C-1:32.50, C-2:32.10, C-11:20.20, C-12:32.00, C-15:22.10, C-2':35.00, C-3':34.00, C-4':21.90, C-5':44.00
3° (7)	C-4:128.00, C-6:123.90, C-7:139.90, C-8:37.00, C-9:49.00, C-14:46.00, C-16:46.50
4° (7)	C-3:199.93, C-5:163.50, C-10:36.10, C-13:48.40, C-17:94.96, C-20:204.12, C-1':173.87

Tabla 5. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **19d** en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-16β:15.00, C-18:16.50, C-19:19.90, C-21: 28.00
2° (9)	C-1:32.00, C-2:34.00, C-11:20.20, C-12:30.30, C-15:26.43, C-3':35.00, C-4':26.50
3° (8)	C-4:128.00, C-6:123.80, C-7:140.00, C-8:37.90, C-9:50.00, C-14:46.53, C-16:47.00, C-2':44.20
4° (7)	C-3:199.13, C-5:162.50, C-10:36.00, C-13:48.00, C-17:95.00, C-20:204.00,

	C-1':178.10
--	-------------

Tabla 6. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **19e** en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-16β:14.93, C-18:15.31, C-19:20.29, C-21: 28.31
2° (10)	C-1:35.00, C-2:34.00, C-11:20.30, C-12:32.00, C-15:32.01, C-2':40.00, C-4':24.20, C-5':19.80
3° (8)	C-4:128.80, C-6:123.80, C-7:140.32, C-8:36.00, C-9:50.07, C-14:37.18, C-16:46.86, C-3':46.46
4° (7)	C-3 :199.44, C-5 :163.23, C-10:36.00, C-13:48.36, C-17:94.96, C-20:204.30, C-1':173.46

El espectro de EMIE (espectrometría de masas por impacto electrónico) del derivado **19b** (espectro 23) mostró en 504 y 506 m/z dos señales, prácticamente de la misma intensidad, que se asignaron a M<sup>+</sup> (ion molecular) y [M+2]<sup>+</sup>. El pico base se observó en 281 m/z y se generó por la pérdida de [Br-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> y [MeCO]<sup>+</sup> a partir del ion molecular. En el espectro 28 que corresponde al compuesto **19c** se observó una señal a 460 m/z que se asignó a M<sup>+</sup> y otra señal a 462 m/z (30 % de la intensidad con respecto a M<sup>+</sup>) que se asignó a [M+2]<sup>+</sup>. La señal en 282 m/z se asignó al pico base que se generó por la pérdida de [Cl-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup> y [MeCO]<sup>+</sup> a partir del ion molecular.

La síntesis de **20a** y **20e**, se llevó a cabo al hacer reaccionar los derivados **19a** y **19e** respectivamente con DDQ en dioxano. La presencia de los sistemas dieno y trieno en los productos **20a** y **20e** se confirmó con un espectro de ultravioleta. Para el derivado **20a** se observaron 3 máximos de absorción a 298.78, 254.46 y 221.27 nm (ε= 17300, 12400,

14600, respectivamente). Para el derivado **20e** se observaron 3 máximos de absorción a 298.89, 254.72 y 221.60 nm ( $\epsilon = 18000, 13000, 15200$ , respectivamente).

En los espectros de IR de los compuestos **20a** y **20e** (espectros 37, 41) se observó la señal en 1724-1726  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster y al de cetona en C-20. También se observó en 1654-1656  $\text{cm}^{-1}$  la señal de la cetona en C-3.

El espectro de RMP del derivado **20a** (espectros 38) se observó una señal en 7.1 ppm que se asignó al protón vinílico H-4. La señal en 6.3 ppm que integró para 2H se asignó a los protones H-1 y H-2. La señal a 5.7 ppm que integró para 2H se asignó a los protones H-6 y H-7. El triplete en 2.37 ppm se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster. Las señales a 1.98, 1.38, 1.2, 0.91, 0.8 ppm se asignaron a los protones H-21, del metilo en C-16, H-19, del metilo del éster y H-18, respectivamente. Por otra parte, en el espectro 42 del derivado **20e**, se observó una señal en 7.1 ppm que se asignó al protón vinílico H-4. Las señales en 6.3 y 6.13 ppm (cada una integró para 2H) se asignaron a los protones H-1, H-2 y H-6, H-7, respectivamente. El triplete en 2.37 ppm se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster. Las señales a 2, 1.4, 1.1 y 0.8 ppm se asignaron a los protones H-21, del metilo en C-16, H-19 y H-18, respectivamente.

En los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **20a** (espectros 39 y 40, tabla 7) y **20e** (espectros 43 y 44, tabla 8) se observaron las señales a 204, 186, 173, 152, 128.2, 128.0, 162, 124 y 137 ppm que se asignaron a los carbonos C-20, C-3, C-1', C-1, C-2, C-4, C-5, C-6 y C-7 respectivamente.

Tabla 7. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 20a en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (5)	C-16β:15.00, C-18:16.30, C-19:19.90, C-21:22.20, C-5':13.90
2° (6)	C-11:20.10, C-12:27.00, C-15:24.30, C-2':34.56, C-3':34.34, C-4':22.31
3° (9)	C-1:152.56, C-2:128.26, C-4:128.00, C-6:124.40, C-7:137.50, C-8:37.60, C-9:48.00, C-14:46.37, C-16:47.02
4° (7)	C-3:186.20, C-5:162.40, C-10:41.10, C-13:47.79, C-17:94.79, C-20:204.18, C-1':173.82

Tabla 8. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 20e en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-16β:15.00, C-18:19.00, C-19:20.10, C-21: 28.00
2° (8)	C-11:24.00, C-12:34.00, C-15:32.20, C-2':41.40, C-4':32.10, C-5':22.0,
3° (10)	C-1:152.00, C-2:128.00, C-4:128.20, C-6:124.30, C-7:137.80, C-8:38.01, C-9:36.10, C-14:48.00, C-16:47.00, C-3':46.40,
4° (7)	C-3:186.00, C-5:162.00, C-10:36.00, C-13:48.00, C-17:94.56, C-20:203.50, C-1':173.50

#### Derivados D-HOMO (21-25).

El producto 21 se obtuvo después de que el derivado 15 reaccionó con bromuro de fenilmagnesio en presencia de dimetilsulfuro de cobre como catalizador (40). El espectro de IR (espectro 45) mostró una banda en 3374 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los alcoholes en C-17 y C-3. También presentó una banda intensa en 1048 cm<sup>-1</sup> asignada al grupo C-O-C del etilendioxi.

El espectro de RMP del compuesto **21** (espectro 46) mostró tres señales en 1.07, 1.12 y 1.23 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y H-21, respectivamente. La señal a 7.2 ppm que integró para 5H se asignó a los protones aromáticos. La señal múltiple en 3.6 ppm se asignó a los protones del grupo etilendioxi en C-20. La señal doble de dobles en 5.40 ppm se asignó al protón H-6.

En el siguiente paso, al desproteger el grupo carbonilo en C-20 se llevó a cabo la expansión del anillo D (40). Se utilizó acetona y ácido perclórico a temperatura ambiente. El producto **22** se obtuvo con un rendimiento del 95 % y presentó las mismas características físicas y espectroscópicas del producto reportado en la literatura (40).

El espectro de IR del compuesto **22** (espectro 47) mostró una banda intensa en  $1664\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo de la cetona en C-17a, también se observó una señal en  $3455\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los alcoholes en C-3 y C-17.

En el espectro de RMP del derivado **22** (espectro 48) se observaron las señales a 1.03, 1.10, y 1.21 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y a los del metilo en C-17, respectivamente. Por otra parte, la señal en 2.93 ppm se asignó al protón H-16. La señal múltiple en 3.52 ppm se asignó al protón H-3. El desplazamiento que se observó a 5.32 ppm se asignó al protón H-6. La señal a 7.3 ppm que integró para 5H se asignó a los protones aromáticos.

La formación del sistema 4,6-pregnadien-3-ona en el compuesto **23**, se llevó a cabo al mezclar el derivado **22** con bromo, carbonato de litio y DMF. El producto **23** se obtuvo con un 75 % de rendimiento y se caracterizó por sus propiedades espectroscópicas y físicas (40). La formación del sistema dieno en el producto **23** se verificó con un espectro de ultravioleta, en donde se observó un máximo de absorción en 282.29 nm ( $\epsilon = 23500$ ).

En el espectro de infrarrojo del compuesto **23** (espectro 49) se observó una señal en  $3445\text{ cm}^{-1}$  que se asignó al alcohol en C-17. Las señales intensas en  $1694$  y  $1652\text{ cm}^{-1}$  correspondieron al carbonilo en C-17a y C-3, respectivamente.

El espectro de RMP del derivado **23** (espectro 50) presentó tres señales simples (integración para tres protones cada una) en 1.13, 1.14, 1.29 ppm correspondientes a los protones H-18, H-19 y del metilo en C-17, respectivamente. Los desplazamientos en 5.69, 6.18 y 6.31 ppm se asignaron a los protones vinílicos H-4, H-6 y H-7, respectivamente. La señal a 7.3 ppm se asignó a los protones aromáticos.

El compuesto **24** se sintetizó al esterificar el alcohol en C-17 (derivado **23**) con ácido valérico. El espectro de ultravioleta, mostró un máximo de absorción en 282.10 nm ( $\epsilon = 23400$ ).

El espectro de IR compuesto **24** (espectro 51) se observó la presencia de una señal intensa en  $1727\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster en C-17. Las señales en  $1712$  y  $1664\text{ cm}^{-1}$  se asignaron al carbonilo de cetona en C-17a y C-3, respectivamente.

En el espectro de RMP del derivado **24** (espectros 52) se observaron cuatro singuletes (cada uno integró para tres hidrógenos) en 1.26, 1.12, 1.11 y 0.93 ppm correspondientes a los protones del metilo en C-17, H-19, H-18 y a los del metilo del éster, respectivamente. El desplazamiento en 2.38 ppm se asignó a los protones del metileno adyacente al carbonilo del éster. Los desplazamientos a 5.68, 6.17 y 6.32 ppm se asignaron a los protones vinílicos H-4, H-6 y H-7 respectivamente. La señal a 7.35 ppm, que integró para 3H se asignó a los protones H-*meta* y H-*para*. El desplazamiento en 7.16 ppm (integración para 2H) se asignó a los protones H-*orto*.

En el análisis por RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **24** (espectros 53, 54), (tabla 9) se observó la presencia de cuatro señales a 14.17, 16.21, 17.80, 22.84 ppm que se asignaron a los carbonos C-5', C-18, C-19, y al carbono primario en C-17, respectivamente. Los desplazamientos a 128.92, 162.68 123.80 y 138.96 ppm se asignaron a los carbonos C-4, C-5, C-6 y C-7, respectivamente. Las señales correspondientes al anillo aromático en C-17 se observaron en 128.82 (C-*meta*), 128.17 (C-*orto*), 127.19 (C-*para*) ppm. También se observaron las señales en 211.76, 199.48 y 173.17 ppm que se asignaron a los carbonos cuaternarios C-17a, C-3 y el carbonilo del éster. La señal en 49.46 ppm se asignó al carbono C-16 y la señal en 83.56 ppm se asignó a C-17.

Tabla 9. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **24** en RMN $^{13}\text{C}$ .

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-17 $\beta$ :22.84, C-18:16.21, C-19:17.18, C-5':14.17
2° (8)	C-1:33.10, C-2:33.00, C-11:19.27, C-12:26.74, C-15:25.84, C-2':35.54, C-3':34.20, C-4':22.23

3° (12)	C-4:128.92, C-6:123.80, C-7:138.23, C-8:36.15, C-9:44.41, C-14:48.50, C-6:49.46, C-orto:128.17, C-meta:128.82, C-para:127.19
4° (8)	C-3:199.48, C-5:162.68, C-10:36.00, C-13:48.50, C-17:83.56, C-17a:211.76, C ipso del grupo fenilo en C-16:139.30, C-1':173.17

El producto **25** se obtuvo al reaccionar el derivado **24** con DDQ en reflujo de dioxano. La formación del sistema trineo se verificó con un espectro de ultravioleta en donde se observaron los siguientes máximos de absorción: 298.78 nm ( $\epsilon= 26400$ ), 254.46 nm ( $\epsilon= 11800$ ) y 221.27 nm ( $\epsilon= 13500$ ).

En el espectro de IR del compuesto **25** (espectro 55) se observaron las bandas a 1712 y en  $1664\text{ cm}^{-1}$  que se asignaron al carbonilo del éster en C-17, y las cetonas en C-17a y C-3.

En el espectro RMP del derivado **25** (espectro 56) se observó una señal a 7.32 ppm (integró para 3H) que se asignó a los protones H-*meta* y H-*para*. La señal en 7.16 ppm (integró para 2H) se asignó a los protones H-*orto*. El desplazamiento a 7.1 ppm que integró para 2H se asignó a los protones vinílicos H-6 y H-7. La señal a 6.3 ppm (integró para 2H) se asignó a los protones H-1 y H-2. Los desplazamientos a 6 y 3.84 ppm se asignaron a los protones H-4 y H-16, respectivamente. Las señales a 1.21, 1.15, 0.93 y 1.26 se asignaron a los protones H-17, H-18, del metilo del éster y del metilo en C-17.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **25** (espectros 57, 58), (tabla 10) se observaron las señales a 152.1, 128.8, 128.9, 162, 123.8, 137, ppm que se asignaron a los carbonos C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, respectivamente. Los desplazamientos a 211.2,

186.2, 173 y 84 ppm se asignaron a los carbonos cuaternarios C-17a, C-3, C-1' y C-17. Las señales a 128.7, 128, y 127.14 ppm se asignaron a los carbonos aromáticos en las posiciones *meta*, *orto* y *para*, respectivamente. Las cinco señales de carbonos primarios se conservaron sin cambio aparente con respecto a los espectros 53 y 54 del derivado 24.

Tabla 10. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 25 en RMN<sup>13</sup>C.

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (4)	C-17β:22.00, C-18:18.00, C-19:20.00, C-5':13.90
2° (6)	C-11:22.00, C-12:27.00, C-15: 26.00, C-2':34.00, C-3':32.00, C-4':31.00
3° (14)	C-1:152.1, C-2:128.80, C-4:128.90, C-6:123.80, C-7:137.9, C-8:136.20, C-9:44.10, C-14:48.40, C-16:49.10, C-orto:128.00, C-meta:128.70, C-para:127.14
4° (8)	C-3:186.2, C-5:162.00, C-10:40.00, C-13:48.50, C-17:84.00, C-17a:211.20, C ipso del grupo fenilo en C-16:139.80, C-1':173.00,

#### Derivados BETA BROMO (26-28).

El derivado 26 se obtuvo por la apertura del epoxiderivado 13 con HBr en dioxano (19). La bromohidrina formada 26 se obtuvo con un rendimiento del 58 % y se identificó por espectroscopía de IR, espectrometría de masas y pruebas cualitativas como la identificación de halógeno por la prueba de Beilstein (60).

El espectro de IR del compuesto 26 (espectro 59) mostró una banda intensa en 3375 cm<sup>-1</sup> correspondiente a los grupos hidroxilos, la señal en 1700 cm<sup>-1</sup> se asignó al carbonilo de la cetona en C-20.

En el espectro de RMP del derivado **26** (espectro 60) se observaron tres señales simples (integración para tres protones cada una) en 1.03, 1.29 y 2.43 ppm correspondientes a H-18, H-19 y H-21, respectivamente. La señal en 4.09 ppm se asignó al protón H-16, también se asignó la señal múltiple en 3.52 ppm al protón H-3 y la señal en 5.36 ppm se asignó al protón vinílico H-6.

En los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **26** (espectros 61, 66), (tabla 11) se observaron tres señales a 16.20, 19.30, 28.20 ppm que se asignaron a los carbonos C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Los desplazamientos a 51.7, 71.61, 89.76, 140.82, 120.93 y 206.40 ppm se asignaron a C-16, C-3, C-17, C-5, y C-20.

Tabla 11. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **26** en RMN $^{13}\text{C}$ .

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (3)	C-18:16.20, C-19:19.30, C-21:28.20
2° (7)	C-1:19.91, C-2:38.63, C-4:42.15, C-7:31.68, C-11:31.01, C-12:31.53, C-15:37.21
3° (6)	C-3:71.61, C-6:120.93, C-8:31.15, C-9:50.27, C-14:49.52, C-16:51.71
4° (5)	C-5:140.82, C-10:36.50, C-13:47.70, C-17:89.76, C-20:206.4

El espectro de EMIE del derivado compuesto **26** (espectro 63) mostró en 410 y 412 m/z dos señales, prácticamente de la misma intensidad, que se asignaron a  $\text{M}^+$  (ion molecular) y  $[\text{M}+2]^+$ . El pico base se observó en 331 m/z y se generó por la pérdida de [Br] a partir del ion molecular.

La síntesis del derivado **27** implicó la oxidación del alcohol en C-3 y la formación del sistema 1,4,6-pregnatrien-3-ona. Para lo cual se hizo reaccionar el compuesto **26** con DDQ

en un reflujo de dioxano. La presencia del sistema trieno en el producto **27** se verificó con un espectro de ultravioleta que mostró tres máximos de absorción a 298.94, 255.08 y 219.96 nm ( $\epsilon = 17950, 12800, 15000$ , respectivamente).

El espectro de IR del compuesto **27** (espectro 64) mostró una banda intensa en 1715  $\text{cm}^{-1}$  asignada al carbonilo de la cetona en C-20 y en 1646  $\text{cm}^{-1}$  una banda intensa asignada al carbonilo en C-3.

En el espectro RMP del derivado **27** (espectro 65) se observó la señal en 7.08 ppm que se asignó al protón vinílico H-4. Las señales en 6.23 y 5.97 (cada una integró para 2H) se asignaron a los protones H-1, H-2 y H-6 H-7, respectivamente. La señal en 4.1 ppm se asignó al protón H-16. Las señales de los protones H-18, H-19 y H-21 se conservaron sin cambio aparente con respecto al espectro 60 del derivado **26**.

En los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **27** (espectros 66, 67), (tabla 12) se observaron las señales a 153.01, 128.10, 128.0, 162.43, 123.97 y 137.20 ppm que se asignaron a C-1, C-2, C-4, C-5, C-6 y C-7. Las señales en 205.40, 89.08, 50.85 ppm se asignaron a los carbonos C-20, C-17 y C-16. Las tres señales de carbonos primarios se conservaron sin cambio aparente con respecto a los espectros 61 y 63 del derivado **26**.

Tabla 12. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **27** en RMN $^{13}\text{C}$ .

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (3)	C-18:15.80, C-19:20.70, C-21:28.63
2° (3)	C-11:20.70, C-12:31.00, C-15:37.60
3° (9)	C-1:153.01, C-2:128.10, C-4:128.00, C-6:123.91, C-7:137.20, C-8:47.10,

	C-9:47.92, C-14:37.12, C-16:50.86
4° (6)	C-3:186.41, C-5:162.43, C-10 :47.16, C-13:41.45, C-17:89.08, C-20:205.40

El espectro de EMIE del derivado **27** (espectro 68) mostró en 404 y 406 m/z dos señales, prácticamente de la misma intensidad, que se asignaron a  $M^+$  (ion molecular) y  $[M+2]^+$ . El pico base se observó en 264 m/z y se generó por la pérdida de  $[MeCO-H_2O-Br]$  a partir del ion molecular.

El producto **28** se obtuvo al esterificar el derivado **27** con el ácido ciclopentilcarbonílico. El espectro de ultravioleta de éste derivado mostró tres máximos de absorción a 291.78, 256.12 y 217.85 nm ( $\epsilon= 17500, 12400, 14600$ ) que se atribuyen a la presencia del sistema trieno.

En el espectro de IR del compuesto **28** (espectro 69) se observó la señal intensa en  $1731\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del éster y al carbonilo de cetona en C-20. La señal en  $1651\text{ cm}^{-1}$  se asignó al carbonilo en C-3.

En el espectro de RMP del derivado **28** (espectro 70) se observaron tres singuletes a 2.14, 1.31 y 1.2 ppm correspondientes a los protones H-21, H-19 y H-18. El desplazamiento a 4.2 ppm se asignó al protón H-16. El quintuplete en 2.78 ppm se asignó al protón terciario perteneciente al éster. La señal en 7.08 se asignó al protón H-4. Los desplazamientos en 6.3 y 6 ppm (cada señal integró para 2H) se asignaron a los protones H-1, H-2 y H-6, H7, respectivamente.

En los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **28** (espectros 71, 72), (tabla 13) se observaron las señales en 152.62, 128.48, 128.21, 161.81, 125.50 y 136.50 ppm y se asignaron a C-1, C-2, C-4, C-5, C-6 y C-7 respectivamente. También se observaron las señales en 199.50, 186.10 y 175.42 ppm que se asignaron a C-20, C-3 y al carbonilo del éster. La señal en 48.93 ppm se asignó C-16 y la señal a 93.36 ppm al C-17. Los desplazamientos en 15.50, 20.70 y 28.20 ppm se asignaron a los carbonos C-18, C-19 y C-21.

Tabla 13. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **28** en RMN $^{13}\text{C}$ .

CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
1° (3)	C-18:15.50, C-19:20.70, C-21:28.20
2° (7)	C-11:20.91, C-12:33.34, C-15:47.92, C-3':29.78, C-4':25.51
3° (10)	C-1:152.62, C-2:128.48, C-4:128.21, C-6:125.50, C-7:136.50, C-8:43.73, C-9:48.81, C-14:31.15, C-16:48.93, C-2':38.25
4° (7)	C-3:186.10, C-5:161.80, C-10:41.00, C-13:47.40, C-17:93.36, C-20:199.50, C-1':175.42

El espectro de EMIE del compuesto **28** (espectro 73) mostró en 500 y 502 m/z dos señales, prácticamente de la misma intensidad, que se asignaron a  $M^+$  (ion molecular) y  $[M+2]^+$ . El pico base se observó en 420 m/z y se generó por la pérdida de [Br] a partir del ion molecular.

### **Etapa C) Evaluación farmacológica.**

En la tercera fase del trabajo se realizó la evaluación biológica de los compuestos  $17\alpha$ -aciloiloxi derivados (19a-19e, 20a, 20e, 24, 25, 28) y los intermediarios (12-18, 21-23, 26, 27), con respecto al estándar finasterida 6.

La actividad biológica de los esteroides sintetizados se determinó a través de cuatro pruebas:

- 1) La prueba del órgano del flanco
- 2) Determinación del peso de las vesículas seminales
- 3) La transformación de T a su metabolito 5-alfa reducido (DHT)
- 4) La competencia por el receptor androgénico

Las pruebas se realizaron en hámsters machos adultos de la cepa dorada, con un peso promedio de 150-200 g, gonadectomizados 30 días antes de los experimentos. Los animales se mantuvieron en condiciones de biotério con comida y agua *ad libitum*.

- 1) Prueba del órgano del flanco (41, 42, 46, 48, 55).

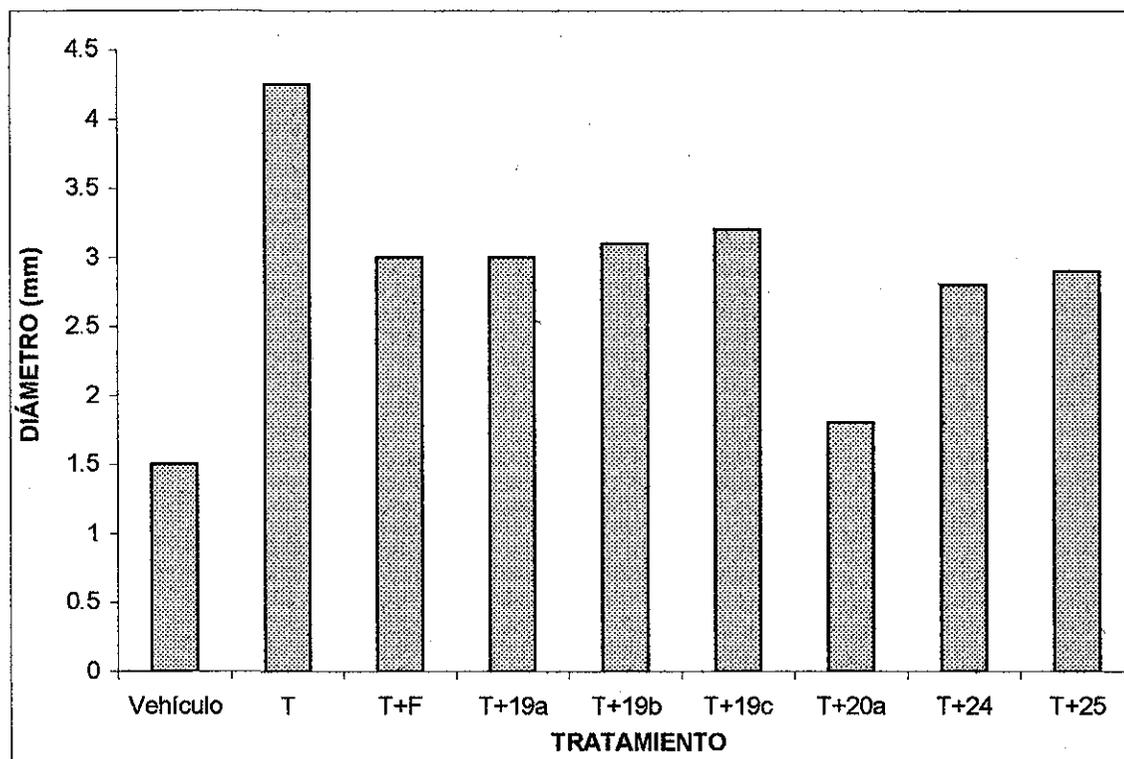
La prueba de los órganos del flanco de hámsters, permitió evaluar el efecto inhibitorio de los compuestos sobre la enzima  $5\alpha$ -reductasa, pues a mayor inhibición de la enzima es menor el diámetro de la mancha pigmentada de las glándulas. De acuerdo a los resultados de la figura 7, la castración disminuye el diámetro de la mancha pigmentada de

los órganos del flanco hasta un valor de 1.5 mm, mientras que la administración de testosterona regenera el diámetro de la mancha pigmentada hasta un valor de 4.25 mm. El efecto antiandrogénico de la finasterida se mostró al inhibir considerablemente el crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada a 3.0 mm (figura 7).

Los productos **19a-19c**, **20a**, **24** y **25**, disminuyeron del diámetro de la mancha pigmentada, de manera similar que la finasterida.

El derivado **20a** presentó mayor inhibición del crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada lo que indicó que es un potente inhibidor de la enzima. El marcado efecto inhibitorio del trieno derivado **20a** sobre la enzima  $5\alpha$ -reductasa con respecto al dieno derivado **19a** indicó que al extender la conjugación en la molécula, ésta se comportó como un mejor sustrato para la enzima. Este resultado se explicó en función de un estudio teórico realizado por nuestro grupo de trabajo con respecto al mecanismo hipotético de la inhibición de la enzima (36). En ésta hipótesis, se mencionó que la inhibición de la enzima consiste en la formación de un complejo enzima-antiandrógeno por la adición (1-4) de la enzima al sistema 4-pregnen-3-ona del esteroide. En este estudio se analizaron diferentes esteroides con insaturaciones en los anillos A (sistema 4-pregnen-3-ona) y en los anillos A y B (sistema 4,6-pregnadien-3-ona), (36). Se observó que los esteroides que ampliaron su conjugación favorecieron adición de la enzima al (sistema 4,6-pregnadien-3-ona) y la formación del complejo enzima-esteroide.

El compuesto **25** presentó menor inhibición del crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco con respecto al compuesto **20a**. Lo anterior, indicó que la expansión del anillo D influyó para abatir la actividad del compuesto.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

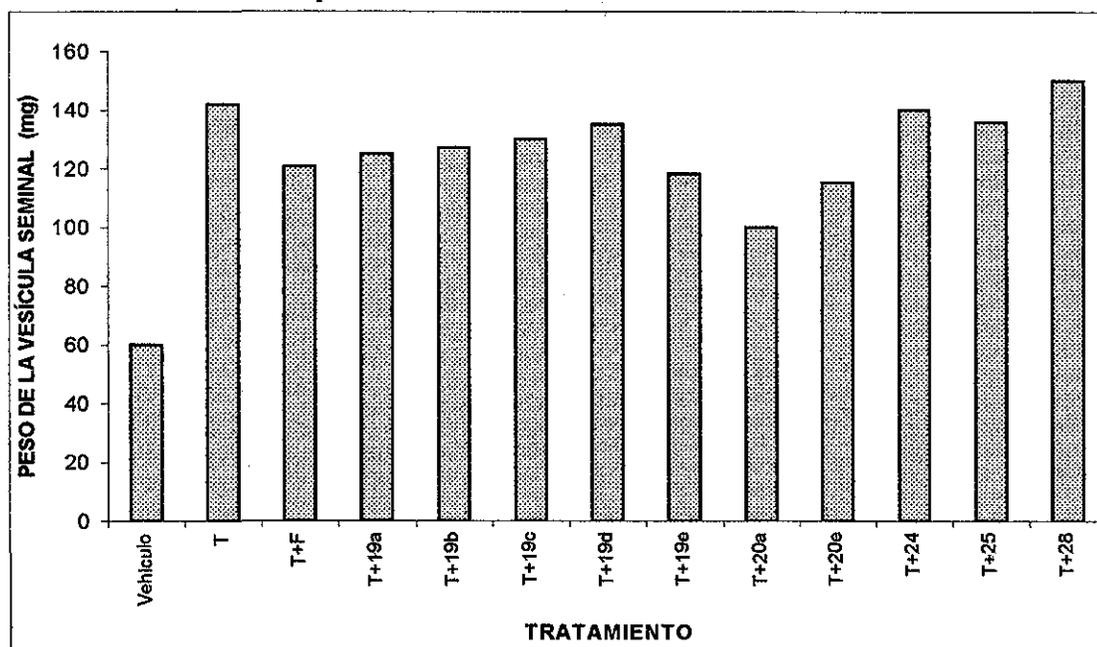
**Figura 7. Inhibición del diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco de animales control y tratados con los esteroides sintetizados.**

2) Determinación del peso de las vesículas seminales (40, 45, 48).

Después de la castración, el peso de las vesículas seminales decrece significativamente con respecto a las glándulas de animales enteros (14). Los resultados mostrados en la gráfica 8 indicaron que el tratamiento diario con inyecciones de

testosterona a los animales gonadectomizados regeneró el peso de las vesículas seminales hasta 143 mg, mientras que la finasterida disminuyó el peso de las vesículas seminales hasta 120 mg. Los derivados **19a-19c** mostraron un efecto semejante al de la finasterida, mientras que los compuestos **19d, 24, 25 y 28** no mostraron inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa tipo II.

Los compuestos **19e, 20a y 20e** disminuyeron el peso de las vesículas seminales mejor que el estándar finasterida. Se observó que el derivado **20a** mostró un importante efecto inhibitorio en esta prueba. El derivado **20a** se comportó como el mejor inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa en pruebas *in vivo*.



**Figura 8.** Efecto de los nuevos esteroides sobre el peso de las vesículas seminales de hámsters machos gonadectomizados y tratados con testosterona.

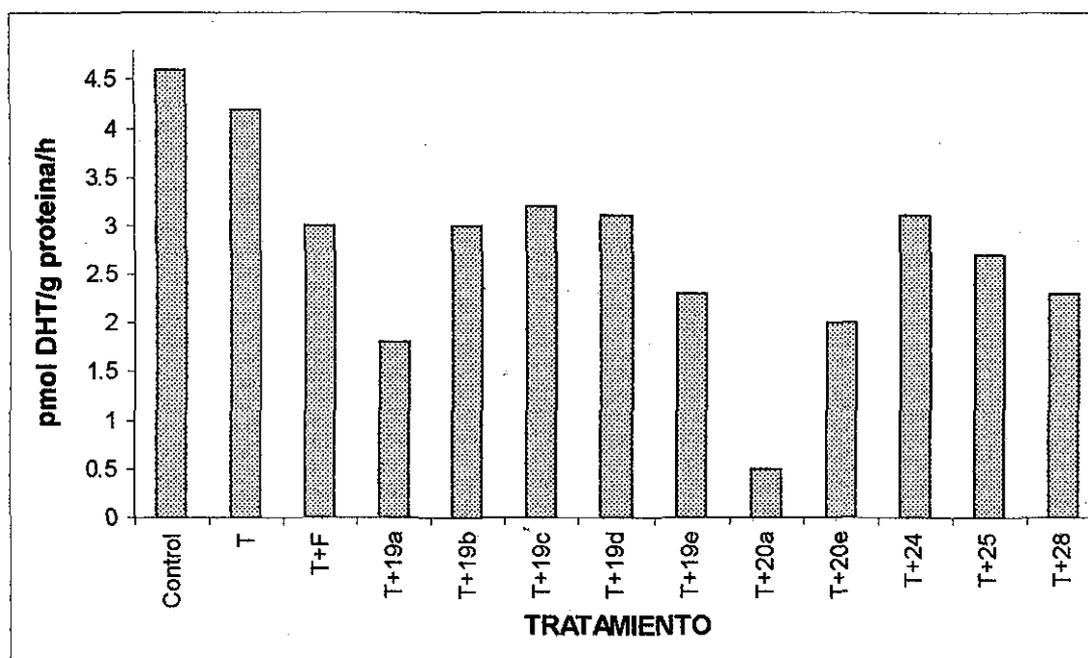
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

3) Transformación de la testosterona (T) a la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) en homogenados de vesículas seminales (4, 34, 38, 40, 48).

Se realizó un estudio metabólico *in vitro* con homogeneizados de vesículas seminales para conocer el efecto del esteroide en la transformación de T a DHT. En la figura 9 se muestran los resultados de ésta prueba.

Los compuestos **19b-19d**, **24** y **25** presentaron una disminución de la transformación de la formación de T a DHT semejante a la que presentó la finasterida (3 pmol/DHT/g proteína/h), Figura 9. Los derivados **19a**, **19e**, **20a**, **20e** y **28** mostraron mayor inhibición de la enzima  $5\alpha$ -reductasa que la finasterida, siendo el derivado **20a** el que mostró la mayor actividad biológica.

El compuesto **20a** mostró su capacidad como un potente inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa tanto en pruebas *in vivo* (prueba del órgano del flanco y la determinación del peso de las vesículas seminales) como en pruebas *in vitro* (transformación de T a DHT). Esto apoyó la hipótesis referente a que el ataque de la enzima se favorece si se extiende el sistema conjugado en el esteroide (formación de un sistema trieno). Por otra parte, la presencia de los grupos aciloiloxi en C-17 modificó la actividad biológica de cada esteroide. Se observó que la actividad inhibitoria del esteroide disminuyó cuando se tuvo en C-17 un anillo (ciclopentilacetoiloxi) **20e** con respecto a una cadena lineal (valeroiloxi) **20a**.



**Figura 9. Efecto de los esteroides sintetizados en la transformación *in vitro* de T a DHT.**

4) Análisis de la competencia de los esteroides sintetizados por los receptores androgénicos. (40, 62).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El estudio se realizó en la fracción citosólica de las vesículas seminales de hámsters machos adultos tratados como se describió en la parte experimental. Se analizaron los esteroides 19d, 19e, 20e y 28 con la finalidad de conocer si competían por los receptores de andrógenos, además de ser inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa.

Se observó que cantidades crecientes de los esteroides sintetizados (50-500  $\mu$ M) inhibieron la formación del complejo [ $^3$ H]DHT-receptor. Se determinó para cada

compuesto estudiado la constante de inhibición ( $K_i$ , [nM]) del complejo [ $^3\text{H}$ ]DHT-receptor (40, 62). Los resultados se muestran en la tabla 14. En la figura 10 se presentan los gráficos del porcentaje de unión a los receptores en presencia de los esteroides competidores.

Tabla 14. Valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ) para la formación del complejo [ $^3\text{H}$ ]DHT-receptor y los valores de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) de la unión a receptores androgénicos en vesículas seminales.

Compuesto	$K_i$ (nM)	$\text{IC}_{50}$ (nM)
<b>4 (DHT)</b>	8.29	7.29
<b>19e</b>	NA	NA
<b>19d</b>	11.79	10.79
<b>20e</b>	73.04	72.04
<b>28</b>	NA	NA

NA: no afinidad por los receptores androgénicos.

La  $K_i$  es una medida indirecta de la afinidad de los esteroides por los receptores androgénicos, pues un valor pequeño de  $K_i$ , significa menor concentración del esteroide necesaria para inhibir la formación del complejo [ $^3\text{H}$ ]DHT-receptor, es decir, el compuesto tendrá mayor afinidad por el receptor. A partir de los resultados mostrados en la tabla 14 se logró establecer el siguiente orden de afinidad de los esteroides por los receptores androgénicos presentes en el citosol de las vesículas seminales:

Afinidad por el receptor androgénico    DHT > 19d > 20e

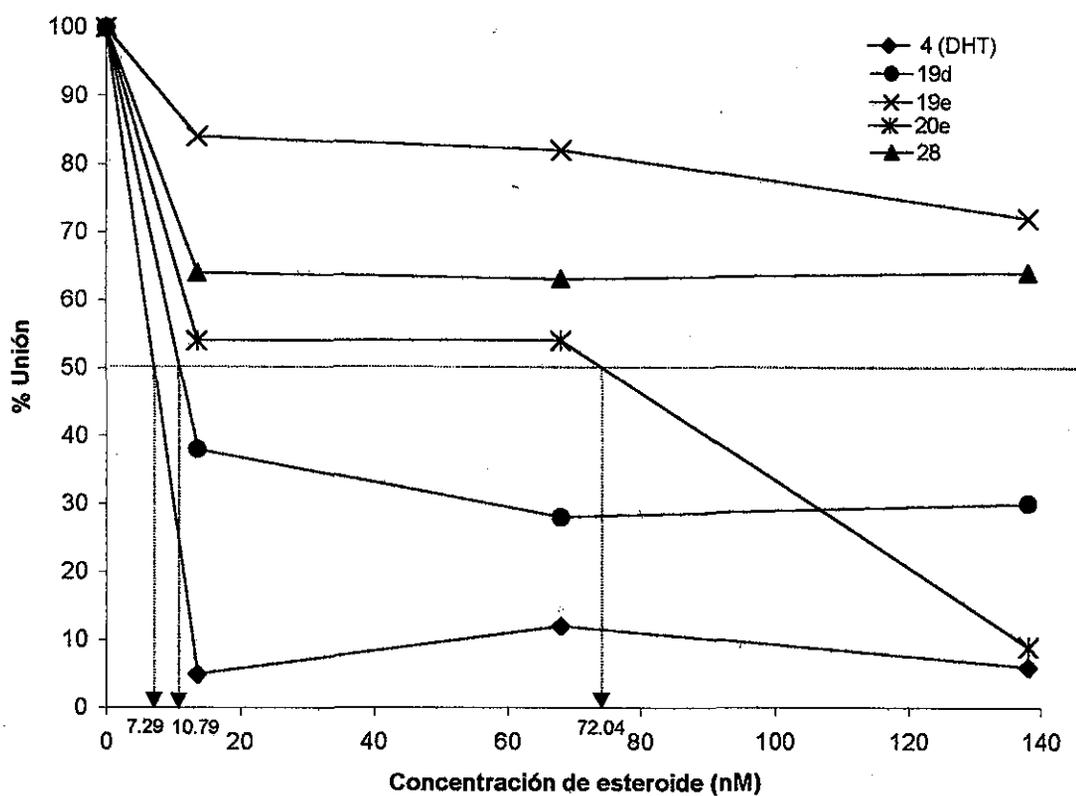
Constante de inhibición ( $K_i$ )            8.29 < 11.79 < 73.04 nM

Los compuestos **19e** y **28** no presentaron afinidad por los receptores de andrógenos, mientras que el compuesto **19d** mostró afinidad comparable con la que presentó la DHT. En este caso, la presencia de un grupo voluminoso con giro restringido en C-17 le confirió al esteroide una conformación apropiada para la unión al receptor androgénico.

El derivado **20e** presentó afinidad por los receptores androgénicos y además se comportó como un inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa pues disminuyó la transformación de T a DHT en la prueba *in vitro* descrita en la parte experimental.

Por otra parte, en ésta prueba también se determinaron los valores de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50 % de la unión a los receptores androgénicos (IC<sub>50</sub>). Los resultados en la tabla 14 mostraron que el compuesto **19d** presentó un valor de IC<sub>50</sub> comparable con el valor mostrado por la DHT, mientras que el derivado **20e** mostró un valor de IC<sub>50</sub> 72.04 nM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 10. Especificidad de la unión de los receptores presentes en el citosol de las vesículas seminales en presencia de diferentes esteroides competidores.**

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

**Etapa A)** Análisis y construcción de las moléculas por modelaje molecular.

Se realizó una revisión bibliográfica de los esteroides que se reportaban como inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y/o como competidores por el receptor androgénico (4, 17-19, 31-52). De éste análisis se seleccionaron las moléculas **AcMETILO** (4, 38) y **AcDHOMO** (40, 42), (figura 4, página 15) que son derivados de la progesterona **1** (figura 1, página 1), y presentaron mayor actividad biológica con respecto al estándar finasterida **6** (figura 3, página 4).

Las estructuras de los esteroides **AcMETIL** (4, 38), **AcDHOMO** (40, 42), (figura 4), la finasterida **6** (figura 3) y las moléculas propuestas **18**, **19a-19e**, **20a**, **20e**, **23**, **24**, **25**, **27**, **28**, (figura 6, página 17), se construyeron y analizaron empleando el programa SPARTAN SEMIEMPIRICAL SGI/R4K, con el modelo AM1 (Austin Model 1), (59) en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo. El análisis conformacional se realizó aplicando primero mecánica molecular, utilizando un campo de fuerza SYBYL (59) y la simulación de Osawa, y después se recalculó la optimización de la geometría de cada molécula con el modelo RHF/AM1 (convergencia en E-difference abajo de 0.5-0.3 kcal/mol) incluido en el programa. En la figura 5 (página 16) se muestran las estructuras del conformero más estable de las moléculas **19d**, **20a**, y **20e** que presentaron mejor actividad biológica con respecto a la finasterida **6**.

Se calculó el log P (logaritmo del coeficiente de partición) de cada estructura, utilizando el modelo de Ghose-Crippen, incluido en el programa (58, 59). Los resultados de log P y la Energía de formación de las moléculas propuestas se muestran en la Tabla 1 (página 15).

**Etapas B) Síntesis y caracterización de los derivados (figura 6, página 17).**

Los espectros de infrarrojo para los derivados y productos finales se determinaron en un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer 549B. Las determinaciones se realizaron en película. Para indicar la intensidad de las bandas se emplearon las siguientes abreviaturas : (S) fuerte, (M) media y (W) débil.

Los espectros de RMN de Hidrógeno y Carbono-13 se determinaron en un aparato de RMN Varian Gemini 200 y Varian VRX-300S, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos están dados en ppm.

El análisis por espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro de masas HP 5985-B, por inserción directa utilizando la técnica de Impacto Electrónico (EMIE). Los valores se expresan en m/z (masa-carga).

Los espectros de absorción en el UV de los esteroides sintetizados se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

El avance y la pureza de las reacciones se determinó por cromatografía en capa fina (C.C.F) utilizando gel de sílice Merck 60GF254 y SilicaGel 60 G.

Acetato de 16-Dehidropregnenolona **12**. Materia prima.

Fórmula molecular:  $C_{23}H_{32}O_3$

Peso Molecular (uma): 356

Punto de Fusión: 169-171 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 1) 2945 (W,  $CH_3-$ ,  $CH_2-$ ), 1729 (S, MeCOOR en C-3), 1661 (S, C=O en C-20), 1584 (W, C=C conjugado en C-16), 1247 (S, MeCOOR en C-3), 1037 (S, MeCOOR en C-3)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 2) 6.80 (1H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=1.5$  Hz, H-16), 5.40 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 2.26 (3H, s, MeCOO-), 2.04 (3H, s, H-21), 1.06 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-18) ppm.

16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona **13** (31, 48).

En un matraz bola de 100 ml, se disolvió la materia prima **12** (1 g, 2.8 mmol) en 50 ml de metanol. Posteriormente se adicionaron 2 ml de una solución de hidróxido de sodio 4 N y 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla resultante se agitó por espacio de 4 h a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, el exceso de metanol se destiló a presión reducida y se agregó hielo a la mezcla. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco **13**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó de metanol. Rendimiento: 99 % (0.92 g, 2.79 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>

Peso Molecular (uma): 330

Punto de Fusión: 191-194 °C

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 3) 3371 (M, -OH en C-3), 2937 (S, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>-), 1692 (S, C=O en C-20), 1376 (M, C=C en C-5), 1056 (M, C-O en C-3), 857 (W, epóxido C16-C17) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 4) 5.38 (1H, dd, J<sub>1</sub>=4 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-6), 3.6 (1H, dd, J<sub>1</sub>=4 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 2.03 (3H, s, H-21), 1.05 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-18) ppm.

3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona **14** (31, 48).

En un matraz bola de 25 ml, se disolvió 1g (3.0 mmol) del producto **13** en 5 ml (61.9 mmol) de piridina. Se agregaron bajo agitación constante 10 ml (106 mmol) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó por 6 h a temperatura ambiente. Al

término de la reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados con 30 g de hielo y se agitó vigorosamente por 30 min. El precipitado blanco **14** se separó por filtración y se recristalizó de metanol. Rendimiento: 91 % (1.03 g, 2.76 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{23}H_{32}O_4$

Peso Molecular (uma): 372

Punto de Fusión: 157-159 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 5) 2943 (M,  $CH_3-$ ,  $CH_2-$ ), 1731 (S,  $MeCOOR$  en C-3), 1697 (S,  $C=O$  en C-20), 1376 (M,  $C=C$  en C-5), 1245 (S,  $MeCOOR$  en C-3), 1032 (M,  $MeCOOR$  en C-3)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 6) 5.30 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 4.58 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=1$  Hz, H-16), 1.96 (3H, s,  $MeCOO-$ ), 1.95 (3H, s, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, s, H-18) ppm.

**3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено 15 (48).**

La formación del producto **15** se llevó a cabo en un matraz bola de 50 ml en donde se disolvió 1g (2.6 mmol) del producto **14** en 6 ml de tolueno. Bajo agitación constante se agregaron, 3.2 ml (53 mmol) de etilenglicol, 4 ml (45 mmol) de ortoformiato de trimetilo y 0.020 g (1.13 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. La mezcla de reacción se agitó durante 6 h y a temperatura ambiente. Al término de la reacción se adicionaron 0.097 g (1.18 mmol) de acetato de sodio y la mezcla se agitó por 15 min. Después se vertió esta mezcla en un embudo de separación que contenía 20 ml de agua y 20 ml de cloroformo. Posteriormente, se separó la fase orgánica y se lavó con 20 ml de agua. La fase cloroformica se separó nuevamente y se trató con sulfato de sodio anhidro.

Después se separó por filtración la sal del líquido, éste se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **15** se recristalizó con metanol.

Rendimiento: 78 % (0.87 g, 2.1 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{25}H_{36}O_5$

Peso Molecular (uma): 416

Punto de Fusión: 192-194 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 7) 2942 (M,  $CH_3-$ ,  $CH_2-$ ), 1719 (S, MeCOOR en C-3), 1248 (S, MeCOOR en C-3), 1033 (M, MeCOOR en C-3)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 8) 5.38 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-16), 4.60 (1H, m, H-3), 3.97 (4H, m, etilendioxi en C-20), 3.39 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-16), 2.03 (3H, s, Me de éster en C-3), 1.42 (3H, s, H-21), 1.04 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, s, H-18) ppm.

Derivados BETA METIL (**16-19(a-e)**, **20a** y **20e**)

**3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-3 $\beta$ -metil-5-pregнено 16** (31, 48).

En un matraz de 50 ml se colocaron 1.0 g (2.4 mmol) del producto **15**, 22 ml de una solución de cloruro de metilmagnesio 3 M en tetrahidrofurano y 0.30 g (1.58 mmol) de yoduro de cobre como catalizador. La mezcla se mantuvo a reflujo por 5 días, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente en 20 ml de una solución saturada de cloruro de amonio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se

evaporó. El producto **16** se recristalizó con metanol. Rendimiento: 67 % (0.63 g, 1.61 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{24}H_{38}O_4$

Peso Molecular (uma): 390

Punto de Fusión: 160-162 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 9) 3450 (M, -OH en C-17 y C-3), 2935 (S,  $CH_3$ -,  $CH_2$ -), 2897 (S, -O- $CH_2$ - de etilendioxi), 1045 (S, C-O-C del etilendioxi)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 10) 5.30 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 3.92 (4H, m, etilendioxi en C-20), 3.50 (1H, m, en H-3), 1.40 (3H, s, H-21), 1.20 (3H, d,  $J=2$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.01 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18) ppm.

*3 $\beta$ ,17 $\alpha$* -Dihidroxi-16 $\beta$ -metil-5-pregnen-20-ona **17** (31, 48).

Se preparó en un matraz bola de 100 ml, una solución del producto **16** (1g, 2.56 mmol) y 0.5 g (28.25 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico (catalizador) en 40 ml de acetona. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló el exceso de la acetona y se agregó hielo a la mezcla. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco **17**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó con metanol.

Rendimiento: 95 % (0.84 g, 2.44 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{34}O_3$

Peso Molecular (uma): 346

Punto de Fusión: 228-230 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 11) 3400 (M, -OH en C-17), 3342 (M, -OH en C-3), 2928 (S,

CH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>-), 1690 (S, C=O en C-20), 1052 (S, C-O en C-3) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 12) 5.31 (1H, dd, J<sub>1</sub>=4 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-6), 3.50 (1H, m, en H-3),

2.10 (3H, s, H-21), 1.21 (3H, d, J=2 Hz, Me en C-16β), 0.98 (3H, s, H-19),

0.96 (3H, s, H-18) ppm.

17α-Hidróxi-16β-metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **18** (31, 48).

En un matraz de dos bocas equipado con un embudo de adición y un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1 g (2.89 mmol) del producto **17**, 3 g (40 mmol) de carbonato de litio, 2 g (22 mmol) de bromuro de litio y 14 ml de dimetilformamida. La suspensión se agitó por espacio de 30 min. A través del embudo se adicionó lentamente una solución de bromo (0.93 g, 0.30 ml, 5.82 mmol) en 6.02 ml de dioxano. La mezcla resultante se agitó durante 2.30 horas a 75 °C y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y las sales precipitadas se lavaron con dimetilformamida. Al filtrado se le agregaron 70 ml de una solución de bisulfito de sodio (0.5 g) y bicarbonato de sodio (0.5 g) en 100 ml de agua. Se obtuvo un precipitado amarillo que se separó por filtración a vacío. El producto **18** se recristalizó con acetato de etilo. Rendimiento: 70 % (0.69 g, 2.02 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>

Peso Molecular (uma): 342

Punto de Fusión: 211-215 °C

UV λ<sub>max</sub> = 284.02 nm. (C=O α, β, γ, δ insaturada C4-C5, C6-C7), (ε = 23210)

IR (ν<sub>max</sub>), (espectro 13) 3500 (M -OH en C-17), 1706 (S, C=O en C-20), 1666 (S,

C=O en C-3), 1617 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 14) 6.16 (1H, d,  $J_1=2$  Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 5.40 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-7), 2.31 (3H, s, H-21), 1.22 (3H, d,  $J=4$  Hz, Me en C-16), 1.18 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, s, H-18) ppm.

Derivados 17 $\alpha$ -Aciloiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19a-19e** (48).

En un matraz de 25 ml se mezclaron 4.23 mmol del ácido correspondiente (Tabla 2), 0.6 ml (0.89 g, 4.23 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 50 mg (0.28 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. La mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Después se agregó el producto **18** (0.5 g, 1.41 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. Los productos **19a-19e** se purificaron por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v.

Tabla 15. Cantidad del ácido correspondiente para la síntesis de los compuestos (**19a-19e**).

Compuesto	Acido	Cantidad (4.23 mmol)
<b>19a</b>	Valérico	422.40 mg, 0.47 ml
<b>19b</b>	5-Bromovalérico	794.00 mg
<b>19c</b>	5-Clorovalérico	599.05 mg, 0.45 ml
<b>19d</b>	Ciclopentilcarbonílico	482.22 mg, 0.48 ml
<b>19e</b>	Ciclopentilacético	562.15 mg, 0.55 ml

16 $\beta$ -Metil-4,6-pregnadien-17 $\alpha$ -valeriloxi-3,20-diona **19a** (48).

Rendimiento: 70 % (0.84 g, 1.97 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>

Peso Molecular (uma): 426

Punto de Fusión: 147-149 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 282.1 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 23200)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 15) 2950 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1728 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1665 (M, C=O de cetona en C-3), 1617 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7), 1222 (W, -COO de éster en C-17) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 16) 6.17 (2H, dd, J<sub>1</sub>=4 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-6 y H-7), 5.70 (1H, s, H-4), 2.44 (2H, t, -COCH<sub>2</sub>-de la cadena del éster), 1.99 (3H, s, H-21), 1.37 (3H, d, J=5 Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.10 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, t, Me del éster), 0.79 (3H, s, H-18) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 17 y 18). Tabla 2, página 24.

17 $\alpha$ -(5-Bromovaleriloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19b**

Rendimiento: 77 % (0.57 g, 1.13 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>Br

Peso Molecular (uma): 504

Punto de Fusión: 149-152 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 282.7 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 22900)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 19) 2948 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1727 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1664 (M, C=O de cetona en C-3), 1617 (W, C=C dieno

conjugado C4-C5, C6-C7), 1222 (W, -COO de éster en C-17)  $\text{cm}^{-1}$ .

RMP (espectro 20) 6.19 (2H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 5.70 (1H, s, H-4), 3.4 (3H, t,  $-\text{CH}_2\text{-Br}$  del éster), 2.43 (2H, t,  $-\text{COCH}_2\text{-}$  de la cadena del éster), 2.0 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, d,  $J=6$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.2 (3H, s, H-19), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN  $^{13}\text{C}$  (espectros 21 y 22). Tabla 3, página 25.

EMIE (espectro 23) 504  $\text{M}^+$ , 506  $[\text{M}+2]^+$ , 281 ( $\text{M}^+$ -  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2\text{Br-MeCO}$ , 100%)  $m/z$ .

17 $\alpha$ -(5-Clorovaleroiloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19c**

Rendimiento: 77 % (0.52 g, 1.12 mmol).

Fórmula molecular:  $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{Cl}$

Peso Molecular (uma): 460

Punto de Fusión: 172-175  $^\circ\text{C}$

UV  $\lambda_{\text{max}}=282.8$  nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon=23000$ )

IR ( $\nu_{\text{max}}$ ), (espectro 24) 2948 (M,  $\text{CH}_3\text{-}$  y  $\text{CH}_2\text{-}$ ), 1726 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1661 (M, C=O de cetona en C-3), 1616 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7), 1222 (W, -COO de éster en C-17)  $\text{cm}^{-1}$ .

RMP (espectro 25) 6.2 (2H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 5.70 (1H, s, H-4), 3.6 (3H, t,  $-\text{CH}_2\text{-Cl}$  del éster), 2.4 (2H, t,  $-\text{COCH}_2\text{-}$  de la cadena del éster), 2.0 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, d,  $J=6$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.1 (3H, s, H-19), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN  $^{13}\text{C}$  (espectros 26 y 27). Tabla 4, página 25.

EMIE (espectro 28) 460  $M^+$ , 462  $[M+2]^+$ , 282 ( $M^+$ -  $C_5H_8O_2Cl-MeCO$ , 100%)  
m/z.

**17 $\alpha$ -Ciclopentilcarboniloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 19d**

Rendimiento: 52 % (0.33 g, 0.76 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{28}H_{38}O_4$

Peso Molecular (uma): 438

Punto de Fusión: 160-165 °C

UV  $\lambda_{max}$  = 282.67 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 23100)

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 29) 2949 (M,  $CH_3$ - y  $CH_2$ -), 1723 (S,  $-COO$  de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1667 (M, C=O de cetona en C-3), 1618 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7)  $cm^{-1}$ .

RMNP(espectro 30) 6.14 (2H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 5.70 (1H, s, H-4), 2.8 (1H, q,  $-CH$ -del anillo del éster), 1.98 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, d,  $J=5$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.13 (3H, s, H-19), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN  $^{13}C$  (espectros 31 y 32). Tabla 5, página 25.

**17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona 19e**

Rendimiento: 64 % (0.42 g, 0.93 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{29}H_{40}O_4$

Peso Molecular (uma): 452

Punto de Fusión: 182-183 °C

UV  $\lambda_{max}$  = 282.54 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 22900)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 33) 2948 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1723 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1663 (M, C=O de cetona en C-3), 1617 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 34) 6.16 (2H, dd, J<sub>1</sub>=4 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-6 y H-7), 5.70 (1H, s, H-4), 2.4 (2H, d, -CH<sub>2</sub>-ciclopentil de la cadena del éster), 2.0 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, d, Me en C-16 $\beta$ ), 1.1 (3H, s, H-19), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 35 y 36). Tabla 6, página 26.

Derivados 17 $\alpha$ -Aciloiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a** y **20e**.

16 $\beta$ -Metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a** (48)

En un matraz esférico de 250 ml se colocaron 0.5 g (0.23 mmol) del producto **19a**, 100 ml de dioxano seco y 1.17 g (5.16 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) en tres porciones cada 12 horas. La mezcla se mantuvo a reflujo por 2 días en condiciones anhidras bajo agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente y bajo agitación en 180 ml de una solución de NaOH al 3 % y 100 ml de cloroformo. Posteriormente se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se concentró a presión reducida. El producto **20a** se purificó por CCF con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v. Rendimiento: 67 % (0.33 g, 0.78 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>

Peso Molecular (uma): 424

Punto de Fusión: 140-145 °C

UV  $\lambda_{\text{max}}$  = 298.78, 254.46, 221.27 nm. (sistemas trieno y dieno), ( $\epsilon$  = 17300, 12400, 14600 respectivamente)

IR ( $\nu_{\text{max}}$ ), (espectro 37) 2952 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1726 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1654 (M, C=O de cetona en C-3) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 38) 7.1 (1H, s, H-4), 6.3 (2H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-1 y H-2), 5.70 (2H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 2.37 (2H, t, -COCH<sub>2</sub>-de la cadena del éster), 1.98 (3H, s, H-21), 1.38 (3H, d,  $J=5$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.2 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, t, Me del éster), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 39 y 40). Tabla 7, página 28.

#### 17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona 20e

En un matraz de 250 ml se colocaron 0.5 g (1.11 mmol) del producto 19e, 85 ml de dioxano seco y 1.10 g (4.87 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) en tres porciones cada 12 h. La mezcla se mantuvo a reflujo por 2 días en condiciones anhidras bajo agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente y bajo agitación en 160 ml de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y 90 ml de cloroformo. Posteriormente se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se concentró a presión reducida. El producto 20e se purificó por CCF con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v. Rendimiento: 66 % (0.33 g, 0.73 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>

Peso Molecular (uma): 450

Punto de Fusión: 182-183 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 298.89, 254.72, 221.60 nm. (sistemas trieno y dieno), ( $\epsilon$  = 18000, 13000, 15200 respectivamente)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 41) 2950 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1725 (S, -COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1656 (M, C=O de cetona en C-3) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 42) 7.1 (1H, s, H-4), 6.3 (2H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-1 y H-2), 6.13 (2H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 2.37 (2H, d, -CH<sub>2</sub>-ciclopentil de la cadena del éster), 2.0 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, d,  $J=4$  Hz, Me en C-16 $\beta$ ), 1.1 (3H, s, H-19), 0.8 (3H, s, H-18) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 43 y 44). Tabla 8, página 28.

#### Derivados D-HOMO (21-25)

**3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено 21 (40).**

En un matraz de 50 ml se colocaron 1.0 g (2.4 mmol) del producto 15, 14 ml de una solución de bromuro de fenilmagnesio 1M en tetrahidrofurano y 0.30 g (1.4 mmol) de complejo de bromuro de dimetilsulfuro de cobre como catalizador. La mezcla se mantuvo a reflujo por 5 días, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente en 20 ml de una solución saturada de cloruro de amonio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se

separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **21** se recristalizó con metanol.

Rendimiento: 68 % (0.42 g, 0.93 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{29}H_{40}O_4$

Peso Molecular (uma): 452

Punto de Fusión: 220-223 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 45) 3374 (M, -OH en C-17 y C-3), 2937 (S,  $CH_3$ -,  $CH_2$ -), 2894.00 (S, -O- $CH_2$ - de etilendioxi), 1548, 1493 (W, C=C aromático en C-16), 1048 (S, C-O-C del etilendioxi)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 46) 7.2 (5H, m, aromáticos), 5.40 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 3.6 (4H, m, etilendioxi en C-20), 2.65 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-16), 1.23 (3H, s, H-21), 1.12 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, s, H-18) ppm.

*3* $\beta$ ,*17* $\alpha$ -Dihidroxi-*16* $\beta$ -fenil-*17* $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-*17a*-ona **22** (40).

Se preparó en un matraz bola de 100 ml, una solución del producto **21** (1 g, 2.22 mmol) en 80 ml de acetona. Se agregó gota a gota y con agitación 1 ml (0.11 mol) de ácido perclórico. La mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló el exceso de la acetona y la mezcla se vertió en 150 ml de una solución saturada de  $NaHCO_3$  bajo agitación. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco **22**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó con metanol. Rendimiento del 95 % (0.87 g, 2.13 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{36}O_3$

Peso Molecular (uma): 408

Punto de Fusión: 210-212 °C

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 47) 3455 (M, -OH en C-1 y C-3), 2935 (S, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>-), 1664 (CO de cetona en C-17), 1690 (S, C=O en C-20), 1052 (S, C-O en C-OH) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 48) 7.3 (5H, m, aromáticos), 5.32 (H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 3.52 (1H, m, -CH en C-3), 2.93 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-16), 1.21 (3H, s, Me en C-17), 1.10 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, s, H-18) ppm.

16 $\beta$ -Fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona **23** (40).

En un matraz de dos bocas equipado con un embudo de adición y un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1 g (2.4 mmol) del producto **22**, 3 g (40 mmol) de carbonato de litio, 2g (22 mmol) de bromuro de litio y 14 ml de dimetilformamida. La suspensión se agitó por espacio de 30 min. A través del embudo se adicionó lentamente una solución de bromo (0.93 g, 0.30 ml, 5.82 mmol) en 8.5 ml de dioxano. La mezcla resultante se agitó durante 2.30 h a 75 °C y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y las sales precipitadas se lavaron con dimetilformamida. Al filtrado se le agregaron 70 ml de una solución de bisulfito de sodio (0.5 g) y bicarbonato de sodio (0.5 g) en 100 ml de agua. Se obtuvo un precipitado amarillo que se separó por filtración a vacío. El producto **23** se recristalizó con acetato de etilo. Rendimiento 75 % (0.68 g, 1.7 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>

Peso Molecular (uma): 404

Punto de Fusión: 275-277 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 282.29 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 26500)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 49) 3445 (M -OH en C-17), 1694 (M, C=O en C-17a), 1652

(S, C=O de cetona en C-3), 1616 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7)  $\text{cm}^{-1}$ .

RMP (espectro 50) 7.3 (5H, m, aromáticos), 6.31 (1H, dd,  $J_1=10$ ,  $J_2=2$  Hz, H-7),

6.18 (1H, dd,  $J_1=10$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 5.69 (1H, s, H-4), 2.99 (H, dd,  $J_1=4$  Hz,

$J_2=3$  Hz, H-16), 1.29 (3H, s, Me en C-17), 1.14 (3H, s, H-19), 1.13 (3H, s, H-18)

ppm.

#### 16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona **24**

En un matraz de 25 ml se mezclaron 0.4 ml (0.38 g, 3.65 mmol) de ac. valérico, 0.5 ml (4.46 g, 21.24 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 50 mg (0.28 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador. La mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Después se agregó el producto **23** (1 g, 2.47 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **24** se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 7:3 % v/v. Rendimiento: 70 % (0.85 g, 1.74 mmol)

Fórmula molecular:  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_4$

Peso Molecular (uma): 488

Punto de Fusión: 221-224 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 282.10 nm. (C=O  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  insaturada C4-C5, C6-C7), ( $\epsilon$  = 23400)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 51) 3030 (W, CH aromático), 2950 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1727 (S, COO de éster en C-17), 1712 (S, C=O de cetona en C-17a), 1664 (S, C=O de cetona en C-3), 1617 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 52) 7.35 (3H, m, H-*meta* y H-*para*), 7.16 (2H, m, H-*orto*), 6.32 (1H, dd,  $J_1=10$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-7), 6.17 (1H, dd,  $J_1=10$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-6), 5.68 (1H, s, H-4), 3.84 (1H, dd,  $J=4$  Hz,  $J=2$  Hz, H-16), 2.38 (2H, t, -COCH<sub>2</sub>-de la cadena del éster), 1.26 (3H, s, Me en C-17 $\beta$ ), 1.12 (3H, s, H-19), 1.11 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, t, Me del éster) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 53 y 54). Tabla 9, página 31.

#### 16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeroiloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona **25**

En un matraz de 250 ml de dos bocas equipado con un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 0.5 g (1.24 mmol) del producto **24**, 90 ml de dioxano seco y 1 g (4.5 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) en tres porciones cada 6 h. La mezcla se mantuvo a reflujo por 1 día en condiciones anhidras bajo agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente y bajo agitación en 180 ml de una solución de NaOH al 3 % y 100 ml de cloroformo. Posteriormente se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se concentró a presión reducida. El producto **25** se purificó por CCF con un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v. Rendimiento: 70 % (0.35 g, 0.71 mmol).

Fórmula molecular: C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>

Peso Molecular (uma): 486

Punto de Fusión: 221-224 °C

UV  $\lambda_{\max}$  = 298.78, 254.46, 221.27 nm. (sistemas trieno y dieno), ( $\epsilon$  = 26400, 11800, 13500, respectivamente)

IR ( $\nu_{\max}$ ), (espectro 55) 3030 (W, CH aromático), 2950 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1727 (S, COO de éster en C-17), 1712 (S, C=O de cetona en C-17a), 1664 (S, C=O de cetona en C-3), 1617 (W, C=C conjugado C1-C2, C4-C5, C6-C7) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 56) 7.32 (3H, m, H-*meta* y H-*para*), 7.16 (2H, m, H-*orto*), 7.1 (2H, dd,  $J_1=10$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-6 y H-7), 6.25 (2H, dd,  $J_1=10$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-1 y H-2), 6 (1H s, H-4), 3.84 (1H, m, H-16), 2.40 (2H, t, -COCH<sub>2</sub>-de la cadena del éster), 1.26 (3H, s, Me en C-17 $\beta$ ), 1.21 (3H, s, H-19), 1.15 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, t, Me del éster) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 57 y 58). Tabla 10, página 33.

#### Derivados BETA BROMO (26-28).

##### 16 $\beta$ -Bromo-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona **26** (19)

En un matraz bola de 25 ml, se preparó una solución del producto **13** (1 g, 3.03 mmol) en 18 ml de una solución de HBr al 32 % en dioxano. La mezcla se agitó durante 3 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se vertió en 50 ml de agua. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco **26**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó por par de disolventes acetato de etilo/hexano. Rendimiento: 58 % (0.72 g, 1.75 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{31}O_3Br$

Peso Molecular (uma): 410

Punto de Fusión: 196-198 °C

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 59) 3375 (M, -OH), 2932 (S,  $CH_3$ -,  $CH_2$ -), 1700 (S, C=O en C-20)  $cm^{-1}$ .

RMP (espectro 60) 5.36 (1H, dd,  $J_1=4$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6), 4.09 (1H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 2.43 (3H, s, H-21), 1.29 (3H, s, Me en H-19), 1.03 (3H, s, H-18) ppm.

RMN  $^{13}C$  (espectros 61 y 62). Tabla 11, página 34.

EMIE (espectro 63) 410  $M^+$ , 412  $[M+2]^+$ , 331 ( $M^+-Br$ , 100%)  $m/z$ .

#### 16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -hidroxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona 27.

En un matraz de 250 ml se colocaron 1 g (2.43 mmol) del producto 26, 86.3 ml de dioxano seco y 1 g (13.22 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) en tres porciones cada 6 h. La mezcla se mantuvo a reflujo por 3 días en condiciones anhidras bajo agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente y bajo agitación en 180 ml de agua y 100 ml de cloroformo. Posteriormente se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se concentró a presión reducida. El producto 27 se purificó por recristalización por par de disolventes acetato de etilo/hexano. Rendimiento: 41 % (41 mg, 0.99 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{25}O_3Br$

Peso Molecular (uma): 404

Punto de Fusión: 195-196 °C

UV  $\lambda_{\text{max}}$  = 298.94, 255.08, 219.96 nm. (sistemas trieno y dieno), ( $\epsilon$  = 17950, 12800, 15000 respectivamente)

IR ( $\nu_{\text{max}}$ ), (espectro 64) 3371 (M, -OH), 2944 (M, CH<sub>3</sub>- y CH<sub>2</sub>-), 1715 (S, C=O de cetona en C-20), 1646 (M, C=O de cetona en C-3) cm<sup>-1</sup>.

RMP (espectro 65) 7.08 (1H, d, J=3 Hz, H-4), 6.23 (2H, dd, J<sub>1</sub>=3 Hz, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-1 y H-2), 5.97 (2H, dd, J<sub>1</sub>=3, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-6 y H-7), 4.1 (1H, dd, J<sub>1</sub>=3, J<sub>2</sub>=2 Hz, H-16), 2.4 (3H, s, H-21), 1.4 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, s, H-18) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (espectros 66 y 67). Tabla 12, página 35.

EMIE (espectro 68) 404 M<sup>+</sup>, 406 [M+2]<sup>+</sup>, 264 (M<sup>+</sup>-MeCO-H<sub>2</sub>O-Br, 100%) m/z.

#### 17 $\alpha$ -Ciclopentilcarboniloxi-16 $\beta$ -bromo-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **28**

En un matraz de 25 ml se mezclaron 0.8 ml (4.99 mmol) del ácido ciclopentilcarbonílico, 0.2 ml (9.53 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 200 mg (1.16 mmol) de ac. *p*-toluensulfónico como catalizador. La mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Después se agregó producto **27** (1 g, 2.47 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **24** se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano- acetato de etilo 8:2 % v/v.

Rendimiento: 30% (0.37g, 0.74 mmol).

Fórmula molecular:  $C_{27}H_{33}O_4Br$

Peso Molecular (uma): 500

Punto de Fusión: 134-136 °C

UV  $\lambda_{max}$  = 291.78, 256.12, 217.85 nm. (sistema trieno), ( $\epsilon$  = 17500, 12400, 14600)

IR ( $\nu_{max}$ ), (espectro 69) 2955 (M,  $CH_3$ - y  $CH_2$ -), 1731 (S,  $-COO$  de éster en C-17 y  $C=O$  de cetona en C-20), 1651 (M,  $C=O$  de cetona en C-3)  $cm^{-1}$ .

RMN (espectro 70) 7.08 (1H, d,  $J=3$  Hz, H-4), 6.3 (2H, dd,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-1 y H-2), 6 (2H, dd,  $J_1=2$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-6 y H-7), 4.2 (1H, dd, C-16,  $J_1=3$  Hz,  $J_2=2$  Hz, H-16), 2.78 (1H, q,  $-CH$ -del anillo del éster), 2.14 (3H, s, H-21), 1.31 (3H, s, H-19), 1.2 (3H, s, H-18) ppm.

RMN  $^{13}C$  (espectros 71 y 72). Tabla 13, página 37.

EMIE (espectro 73) 500  $M^+$ , 502  $[M+2]^+$ , 420 ( $M^+-Br$ , 100%)  $m/z$ .

### Etapa C) Evaluación farmacológica.

La actividad biológica de los esteroides sintetizados se determinó a través de cuatro pruebas:

- 1) La prueba del órgano del flanco
- 2) Determinación del peso de las vesículas seminales
- 3) La transformación de T a su metabolito 5-alfa reducido (DHT)
- 4) La competencia por el receptor androgénico

Las pruebas se realizaron en hámsters machos adultos de la cepa dorada con un peso promedio de 150-200 g, gonadectomizados 30 días antes de los experimentos. Los animales se mantuvieron en condiciones de biotério con comida y agua *ad libitum*.

Se utilizaron ocho grupos de cuatro animales cada uno. A cada individuo se le administró por vía subcutánea una inyección diaria de 200 µg de testosterona y/o cada uno de los esteroides a analizar en 200 µl de aceite de sésamo como vehículo, por 6 días. Se utilizaron tres grupos de animales como control, el primero se trató únicamente con 200 µl de aceite de sésamo, el segundo con 200 µg de testosterona y el tercero con de 200 µg de finasterida + 200 µg de testosterona.

La finasterida que fue utilizada como estándar se encuentra como principio activo en el medicamento Proscar. Para obtener 150 mg de finasterida se colocaron 30 grageas de proscar (5 mg c/u), previamente pulverizadas, en un matraz erlenmeyer de 250 ml que contenía cloroformo. Esta mezcla se agitó por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se filtró al vacío y el filtrado se concentró en el rotavapor. El producto crudo finasterida se purificó por CCF (cromatografía en capa fina) utilizando un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v.

#### 1) Prueba del órgano del flanco (41, 42, 46, 48, 55).

Los órganos del flanco son estructuras pilosebáceas que forman nódulos pigmentados en la parte dorsal del hámster. En los machos, miden alrededor de 8 mm de

diámetro, mientras que en las hembras miden solamente 2 mm. Estas glándulas son dependientes de andrógenos, es decir la castración en los machos disminuye su tamaño, mientras que inyecciones diarias de T lo regeneran. Estas estructuras han sido utilizadas para determinar el efecto de fármacos antiandrogénicos (41, 42, 46, 48, 55).

En este estudio se determinó el efecto de los esteroides sintetizados sobre el diámetro de la mancha pigmentada producida por inyecciones diarias de T en machos castrados. Después del tratamiento los animales fueron sacrificados bajo anestesia de éter, posteriormente se rasuraron para medir el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos flanco. Los resultados se muestran en la figura 7 (página 40).

## 2) Determinación del peso de las vesículas seminales (40, 45, 48).

Las vesículas seminales, son glándulas anexas al aparato reproductor masculino. Estas glándulas son dependientes de andrógenos, en los hámsters la castración disminuye el peso de estas estructuras, mientras que inyecciones diarias con esta hormona restablecen el peso. La variación del peso bajo diferentes tratamientos con esteroides ha sido anteriormente informada por nuestro grupo de trabajo (40, 45, 48).

En este experimento los animales fueron tratados con los diferentes esteroides, como se indicó anteriormente, fueron sacrificados bajo anestesia de éter y las vesículas seminales fueron disectadas y pesadas. Los resultados se muestran en la figura 8 (página 41).

3) Transformación de la T a DHT en homogenados de vesículas seminales (4, 34, 38, 40, 48).

En este experimento se utilizaron las vesículas seminales de hámsters machos adultos gonadectomizados 30 días antes del experimento. Después de extirpar y pesar las vesículas seminales, estas fueron homogeneizadas por grupos en buffer de fosfatos a pH de 6. Los homogeneizados fueron incubados a 37 °C en un baño de agua por 1 hora en presencia de: testosterona tritiada (2.3  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]T), 1 mM de NADPH<sup>+</sup> y 8.7  $\mu\text{M}$  de finasterida o los esteroides a probar y aire. El volumen final de incubación fue de 3 ml. El control se incubó en las mismas condiciones pero sin tejido. La incubación terminó por la adición de diclorometano y los compuestos marcados se extrajeron con el mismo disolvente. El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (61), se utilizó albúmina sérica de bovino como estándar.

La purificación de la DHT extraída se realizó por CCF, utilizando T (testosterona) y DHT (5 $\alpha$ -dihidrotestosterona) como estándares de referencia. La cromatografía se desarrolló en un sistema cloroformo-acetona 9:1 % v/v. Los compuestos no radiactivos se identificaron en la placa con luz UV (254 nm) y con un revelador de ac. fosfomolibdico al 8 % en metanol.

La zona correspondiente a DHT ( $r_f = 0.34$ ) se separó del cromatograma y el compuesto se extrajo con metanol. Posteriormente el disolvente se evaporó y el extracto

fue resuspendido en 1 ml de metanol. Se tomaron alícuotas para determinar la radiactividad en un contador de centelleo líquido Packard modelo 3255, utilizando como solución de conteo Última Gold (Packard). La eficiencia del conteo fue del 47 %, la pérdida de radiactividad durante el proceso fue calculada de acuerdo a los resultados aportados por el experimento control. La formación de DHT se calculó y expresó en pmol de DHT/ g de proteína/ hora. Los resultados se muestran en la figura 9 (página 43).

4) Análisis de la competencia de los esteroides sintetizados por los receptores androgénicos (40, 62).

En ésta prueba se analizó la competencia de los esteroides **19d**, **19e**, **20e**, y **28** por los receptores androgénicos localizados en vesículas seminales (fracción citosólica) de 58 hámsters machos adultos gonadectomizados 30 días antes del experimento.

Preparación del citosol en vesículas seminales.

La homogeneización del tejido se realizó con buffer de TEDAM 1:3 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 a 4 °C, 1.5 mM de EDTA, 0.25 mM de ditioneitol y 10 mM de molibdato de sodio) conteniendo 10 % v/v de glicerol. El homogeneizado se centrifugó a 140,000Xg por 1 hora a 4 °C en un rotor 60 SW Beckman Instruments. La cantidad de proteína fue determinada por el método de Bradford (61) utilizando como estándar albúmina sérica.

### Experimento de competencia por el receptor androgénico.

Se incubaron por duplicado concentraciones crecientes (50-500  $\mu\text{M}$ ) de los esteroides **19d**, **19e**, **20e**, **28** y DHT fría con 1.26 nM de [ $^3\text{H}$ ]DHT (actividad específica de 110 Ci/ mmol) y alícuotas de citosol (120  $\mu\text{l}$ ), (2.64  $\mu\text{g}$  de proteína), por 18-20 horas a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo, en cada incubación, se agregaron 800  $\mu\text{l}$  de una mezcla carbón-dextrán en un buffer de TEDAM con la finalidad de separar la radiactividad unida de la no unida. Los tubos se incubaron en la mezcla por 45 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Cabe mencionar que el dextrán se agitó por 30 minutos antes de la adición del carbón a la mezcla. Después los tubos fueron centrifugados a 800Xg por 10 minutos. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante para evaluar la radiactividad unida a los receptores. La figura 10 (página 46) representa los gráficos de la especificidad de unión a los receptores presentes en el citosol de vesículas seminales en presencia de diferentes esteroides competidores. En la tabla 14 (página 44), se presenta la constante de inhibición ( $K_i$ ) de la unión [ $^3\text{H}$ ]DHT-receptor de cada compuesto estudiado, la cual se determinó por la siguiente fórmula:

$$K_i = (IC_{50} / 1) + (C/K_d)$$

C= concentración de hormona marcada con radioisótopo

C= 1.26 nM

$K_d$ = constante de disociación

$K_d$ = 1.26 nM

$IC_{50}$ = concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50 % de la unión a receptores androgénicos en vesículas seminales

## 7. CONCLUSIONES

Se determinó la conformación más estable de cada una de las moléculas planteadas en este trabajo, posteriormente se determinó su log P (logaritmo del coeficiente de partición) y la Energía de formación. La información generada por éste análisis mostró un cambio en la lipofilidad en cada estructura por la modificación de los anillos A y D, así como la factibilidad para sintetizar los esteroides.

Se sintetizaron e identificaron los nuevos esteroides (figura 6, página 17):

16 $\beta$ -Metil-4,6-pregnadien-17 $\alpha$ -valeriloxi-3,20-diona **19a**

17 $\alpha$ -(5-Bromovaleriloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19b**

17 $\alpha$ -(5-Clorovaleriloxi)-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19c**

17 $\alpha$ -Ciclopentilcarboniloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19d**

17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona **19e**

16 $\beta$ -Metil-17 $\alpha$ -valeriloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20a**

17 $\alpha$ -Ciclopentilacetoiloxi-16 $\beta$ -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **20e**

16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeriloxi-D-homopregna-4,6-dien-3,17a-diona **24**

16 $\beta$ -Fenil-17 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -valeriloxi-D-homopregna-1,4,6-trien-3,17a-diona **25**

16 $\beta$ -Bromo-17 $\alpha$ -ciclopentilcarboniloxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **28**

Se determinó la evaluación biológica de los nuevos esteroides a través de cuatro pruebas: 1) Prueba de los órganos del flanco en hámsters machos gonadectomizados, 2) Determinación del peso de vesículas seminales, 3) Transformación de T a su metabolito

DHT y 4) Análisis del comportamiento de los esteroides como competidores por el receptor androgénico.

El derivado **20a** mostró mayor actividad como inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa que el estándar finasterida. En la prueba de los órganos del flanco, el compuesto **20a** inhibió el crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada de las glándulas hasta 1.8 mm, este resultado fue mejor que el obtenido con la finasterida (3 mm) y comparable con el valor medido después de la castración (1.5 mm). Figura 7, (página 40). En la prueba de la determinación del peso de las vesículas seminales se observó que el derivado **20a** mostró mayor disminución del peso de las vesículas (96 mg) con respecto a la finasterida (120 mg). Figura 8, (página 41). En el experimento *in vitro* del análisis de la transformación de T a DHT se observó que el derivado **20a** fue el mejor inhibidor de ésta transformación. Aproximadamente 17.5 % más potente que el estándar finasterida. Figura 9, (página 43).

Los compuestos **20a** y **20e** presentaron mayor actividad inhibitoria sobre la enzima  $5\alpha$ -reductasa con respecto a sus correspondientes dieno derivados **19a** y **19e**, respectivamente (figura 9, página 43). Lo anterior, apoyó la hipótesis propuesta por nuestro grupo de trabajo (36) con respecto al mecanismo de inactivación de la enzima. La presencia del sistema trieno en el esteroide favoreció la adición de la enzima al sistema insaturado, promoviendo la formación del complejo enzima-esteroide.

Los compuestos **19d** y **20e** presentaron afinidad por los receptores androgénicos. Se midió la constante de inhibición ( $K_i$ ) del complejo [ $^3\text{H}$ ]DHT-receptor y se observó que la  $K_i$

del derivado **19d** (11.79 nM) fue similar al valor de  $K_i$  de la DHT (8.29 nM). Tabla 14, (página 44). Lo anterior, indicó que el compuesto **19d** presentó afinidad por los receptores de andrógenos comparable a la DHT.

El compuesto **20e** mostró actividad biológica en la prueba de la transformación de T a DHT (figura 9, página 43) y en la prueba de afinidad por el receptor androgénico (tabla 14, página 44 y figura 10, página 46). Esto indicó que el compuesto **20e** se comportó como un inhibidor de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y además como un competidor por los receptores androgénicos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Hartmann RW, Hector M, Haidar S, Ehmer PB, Reichert W, Jose J, **Synthesis and evaluation of novel steroidal oxime inhibitors of P450-17 (17 $\alpha$ -Hydroxylase/(C17-20-Lyase) and 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2**, *J.Med.Chem.*, **43**, 4266-4277 (2000)
2. Cesorsimo RJ, Carr D, **Therapy update prostate cancer: Current and evolving strategies**, *Am. J. Health-Syst Pharm.*, **53**, 381-396 (1996)
3. Metcalf BW, Levy MA, Holt D, **Inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne**, *Trends Pharmacol.Science*, **10**, 491-495 (1989)
4. Bratoeff E, Quiróz A, Ramírez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M, **Steroidal antiandrogens and 5 $\alpha$ -reductase inhibitors**, *Curr.Med.Chem*, **6**, 1107-1123 (1999)
5. Jenkins EP, Anderson S, Imperato-Mc Ginley J, Wilson JD, Russell DW, **Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5-alfa reductase**, *J.Clin.Inv.*, **89**, 293-300 (1992)
6. Kniwald J, Osredecki V, Gojmerac T, Zechner V, Kniwald Z, **Effect of s-triazine compounds on testosterone metabolism in the rat prostate**, *J.Appl.Tox.*, **15**, 215-218 (1995)
7. Anderson S, Bishop RW, Russell DW, **Expression cloning and regulation of steroid 5-alfa reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation**, *J.Biol.Chem.*, **264**, 16249-16255 (1989)

8. Anderson S, Russell DW, **Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases**, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **87**, 3640-3644 (1990)
9. Russell DW, Wilson JD, **Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes**, *Ann.Rev.Biochem.*, **63**, 25-61 (1994)
10. Normington K, Russell DW, **Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes**, *J.Biol.Chem.*, **267**, 19548-19554 (1992)
11. Thigpen AE, Russell DW, **Four aminoacid segment in steroid 5 $\alpha$ -reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor**, *J.Biol.Chem.*, **267**, 8577-8583 (1992)
12. Tian G, Stuart JD, Moss ML, Domanico PL, Bramson HN, Patel IR, Kadwell SH, Overton LK, Kost TA, Mook RA, Frye SV, Batchelor KW, Wiseman JS, **17 $\beta$ -(N-ter-butylcarbamoyl)-4-aza-5 $\alpha$ -androstan-1-en-3-one is in active site-directed slow time-dependent inhibitor of human steroid 5 $\alpha$ -reductase 1**, *Biochem.*, **33**, 2291-2296 (1994)
13. Grisenti P, Magni A, Olgiati V, Manzocchi A, Ferraboschi P, Villani V, Pucciarello R, Celotti F, **Substrate interaction with 5 $\alpha$ -reductase enzyme: Influence of the 17 $\beta$ -chain chirality in the mechanism of action of 4-azasteroid inhibitors**, *Steroids*, **66**, 803-810 (2001)
14. Bruchovsky N, Sadar MN, Akakura K, Goldemberg SL, Matsuoka K, Renie PS, **Characterization of 5 $\alpha$ -reductase gene expression in stroma and epithelium of human prostate**, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, **59**, 397-404 (1996)

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

15. Igarashi S, Inami H, Hara H, Koutoko H, Oritani H, Mase T, **A novel class of inhibitors for human and rat steroid  $5\alpha$ -reductases: Synthesis and pharmacological evaluation of indoline and aniline derivatives**, *Chem.Pharm.Bull.*, **48**, 1689-1697 (2000)
16. Brueggemeier R, **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**, Editorial John Wiley Inc., 5<sup>a</sup> Ed. USA, Capítulo 42 (1996)
17. Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Valencia N, **The pharmacology of the antiandrogens**, *Chimica Oggi*, **15**, 67-69 (1997)
18. Holt DA, Levy MA, OH H, Erb JM, Heaslip JI, Brandt M, Lan-Hargest H, Metcalf BW, **Inhibition of steroid  $5\alpha$ -reductase by unsaturated 3-carboxysteroids**, *J.Med.Chem.*, **33**, 943-950 (1990)
19. Li X, Shankar M, Côte J, Laplante S, **Synthesis and in vitro evaluation of 4-substituted N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-androstene-17 $\beta$ -carboxamides as inhibitors and antiandrogens**, *J.Med.Chem.*, **38**, 1456-1461 (1995)
20. Kaufman KD, **Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenic alopecia**, *J Dermatol.Clin.*, **17**, 245-260 (1999)
21. Rittmaster RS, **Clinical relevance of testosterone and dihydrotestosterone metabolism in women**, *Am.J.Med.*, **98**, 17S-21S (1995)
22. Kandaridis ED, **Current aspects of antiandrogen therapy in women**, *Curr.Pharm.Design*, **5**, 707-723 (1999)

23. Njar VCO, Brodie AMH, **Inhibitors of 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17): Potential agents for the treatment of prostate cancer**, *Curr.Pharm.Design*, **5**, 163-180 (1999)
24. Wilde MI, Goa KL, **Finasteride: an update of its use in the management of symptomatic benign prostatic hyperplasia**, *Drugs*, **57**, 557-581 (1999)
25. Barrow J, Nantermet P, Selnik H, Glass K, Rittle K, Gilbert K, Steele T, Homnick C, Freidinger R, et al., **In vitro e in vivo evaluation of dihydropyrimidone C-5 amidas as potent and selective  $\alpha_{1A}$  receptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia**, *J.Med.Chem.*, **43**, 2703-2718 (2000)
26. Sawada K, Okada S, Kuroda A, Wathanabe S, Sawada Y, Tanaka H, **4-(Benzoylindoliziny)butiric acids; novel non-steroidal inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase**, *Chem.Pharm.Bull.*, **49**, 799-813 (2001)
27. Abell AD, Henderson BR, **Steroidal and non-steroidal inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase**, *Curr.Med.Chem.*, **2**, 583-597 (1995)
28. Li X, Chen C, Singh S, Labrie F, **The enzyme and inhibitors of 4-ene-3-oxosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase**, *Steroids*, **60**, 433-441 (1995)
29. Kenny B, Ballard S, Blagg J, Fox D, **Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia**, *J.Med.Chem.*, **40**, 1293-1315 (1997)
30. Cilotti A, Danza G, Serio M, **Clinical application of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors**, *J.Endocrinol.Invest.*, **24**, 199-203 (2001)
31. Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Calderón D, Hernández E, **Síntesis de nuevos inhibidores de 5-alfa-reductasa**, *Rev.Mex.Cien.Farm.*, **28**, 13-19 (1997)

32. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, **Crystal structure of 17- $\alpha$  acetoxy-6-chloro-16-beta-methyl-4,6-pregnadiene-3,20-dione**, *Analytical Science*, **14**, 459-461 (1998)
33. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G, **17 $\alpha$ Acetoxi-17-beta methyl-16-beta-phenyl-d-homo-4,6-pregenadiene-3,17a-dione: Synthesis and crystal structure determination of a new rearranged pregnane derivative**, *J.Chem.Crystall.*, **28**, 487-491 (1998)
34. Cabeza M, Gutierrez E, Miranda R, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G, **Synthesis and pharmacological effect of 6-halo-16-beta methylpregnane derivatives**, *Proc.West.Pharmacol.Soc.*, **41**, 87-88 (1998)
35. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, **17- $\alpha$ Acetoxy-6-bromo-16-beta methylpregna-4,6-diene-3,20 dione**, *Acta Crystallographica*, 2022-2024 (1998)
36. Bratoeff E, Rubio M, Ramírez E, Flores G, García J, Ramírez G, **Pharmacological and theoretical evaluation of new antiandrogens**, *Chemistry Today*, November/December, 33-35 (1998)
37. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G, **Crystal structure of 17- $\alpha$  benzoyloxy-16-beta methylpregna- 4,6-diene-3,20 dione**, *Analytical Sciences*, **15**, 1-3 (1999)
38. Cabeza M, Gutierrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, **Androgenic and antiandrogenic effect of progesterone derivatives with different halogen at C-6 position**, *Steroids*, **64**, 413-421 (1999)

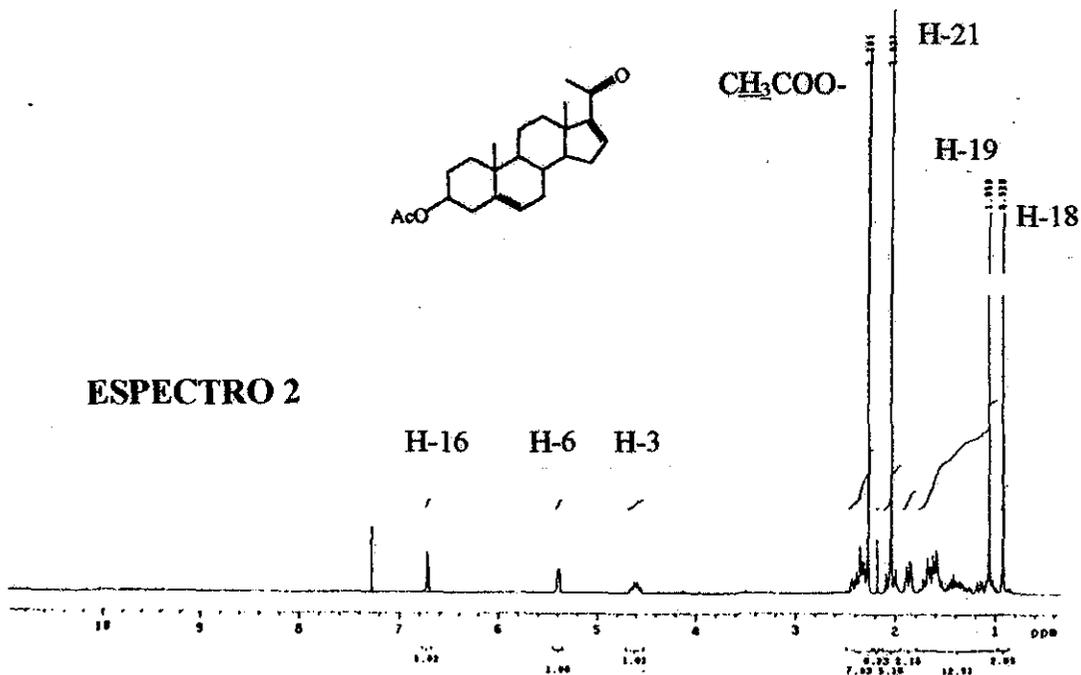
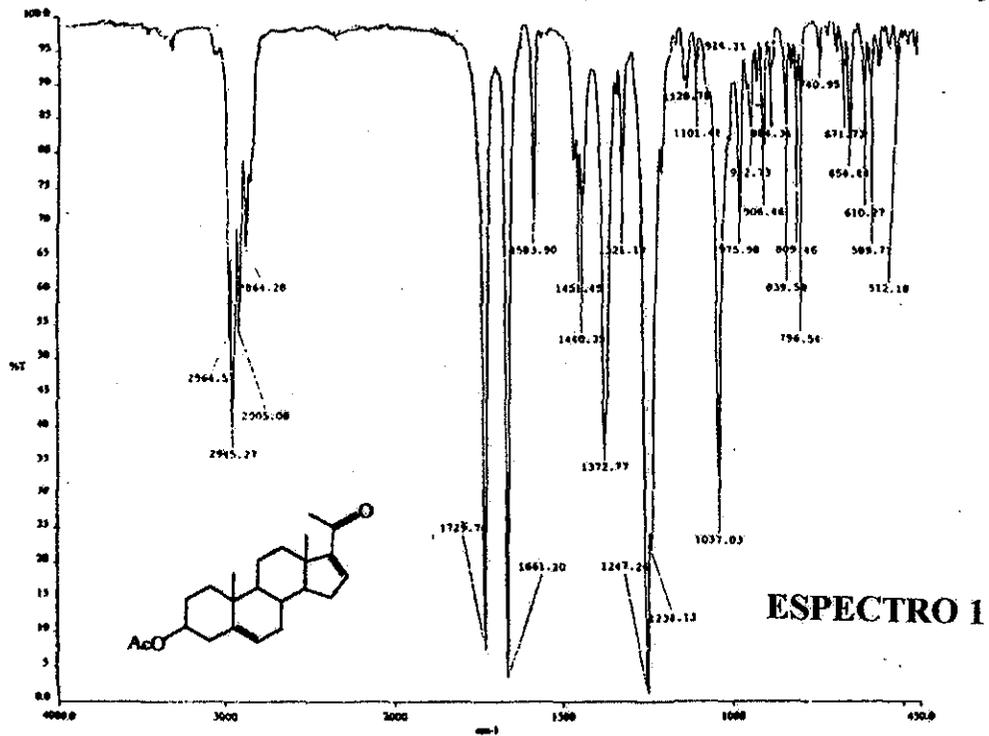
39. Cabeza M, Quiróz A, Bratoeff E, Murillo E, Ramírez E, Flores G, **Synthesis and pharmacological evaluation of 4-halo progesterone derivatives as antiandrogen**, *Chem.Pharm.Bull.*, **47**, 1232-1236 (1999)
40. Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Solorzano K, Murillo E, Quiróz A, Cabeza M, **Antiandrogenic effect of 16-substituted, non-substituted and D-homopregnane derivatives**, *Chem.Pharm.Bull.*, **48**, 1249-1255 (2000)
41. Cabeza M, Quiróz A, Heuze I, Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Murillo E, **Antiandrogenic effect of new synthetic steroids**, *Proc.West.Pharmacol.Soc.*, **43**, 1-2 (2000)
42. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramírez E, Martínez R, **Evaluation of new pregnane derivatives as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors**, *Chem.Pharm.Bull.*, **49**, 525-530 (2001)
43. Soriano M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre G, **Crystal structure and synthesis of 17 $\alpha$ -(5-bromovaleroyloxy)-16 $\beta$ -methylpregna-4,6-diene-3,20 dione**, *Analytical Science*, **17**, 911-912 (2001)
44. Soriano M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre G, **Crystal structure and synthesis of 17 $\alpha$ -hexanoyloxy-16-beta-methylpregna-4,6-diene-3,20 dione**, *Analytical Science*, **17**, 1245-1246 (2001)
45. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Murillo E, Ramirez E, Lira A, **New progesterone esters as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors**, *Chem.Pharm.Bull.*, **49**, 1081-1084 (2001)
46. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramirez E, Martínez R, Murillo E, **Inhibition of sodium acetate incorporation into lipids by novel steroids in hamster flank organs**, *Proc.West.Pharmacol.Soc.*, **44**, 99-101 (2001)

47. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramirez E, Martinez R, Murillo E, **Inhibition of the conversion of the Testosterone to Dihydrotestosterone by novel steroids in cultures of *Penicillium crustosum***, *Proc.West.Pharmacol.Soc.*, **44**, 103-105 (2001)
48. Ramirez E, Cabeza M, Heuze I, Gutierrez E, Bratoeff E, Membrillo A, Lira A, **Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives**, *Chem.Pharm.Bull.*, **50**, 15-20 (2002)
49. Quiróz A, Cabeza M, Bratoeff E, Ramirez E, Flores E, **Inhibición de la enzima 5-alfa-reductasa presente en cultivos de *Penicillium crustosum* producido por el compuesto esteroide PM-9**, *Rev.Latinoamericana Microbiol.*, **44**, 210 (2002)
50. Neumann F, **The antiandrogen cyproterone acetate: Discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research**. *Clin.Exp.Endocrinol.*, **102**, 1-32 (1994)
51. Rasmusson GH, Reynolds GF, Utne T, Jobson RB, Primka RL, Berman C, Brooks J, **Azasteroids as inhibitors of rat prostatic 5 $\alpha$ -reductase**, *J.Med.Chem.*, **27**, 1690-1701 (1984)
52. Rasmusson GH, Reynolds GF, Steinberg NG, Walton E, Patel GF, Liang T, Cascieri MA, Cheung A, Brooks J, Berman C, **Azasteroids: structure-activity relationships for inhibition of 5 $\alpha$ -reductase and androgen receptor binding**, *J.Med.Chem.*, **29**, 2298-2315 (1986)
53. Liang T, Cascieri M, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH, **Species differences in prostatic steroid 5 $\alpha$ -reductase of rat, dog and human**, *Endocrinology*, **117**, 571-579 (1985)

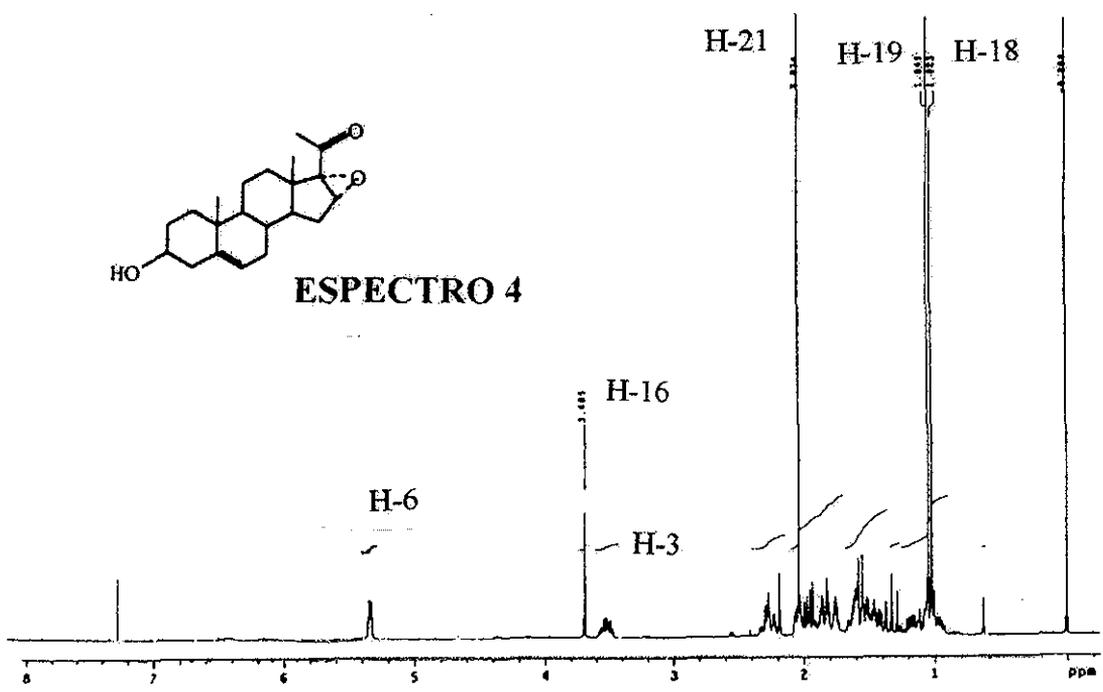
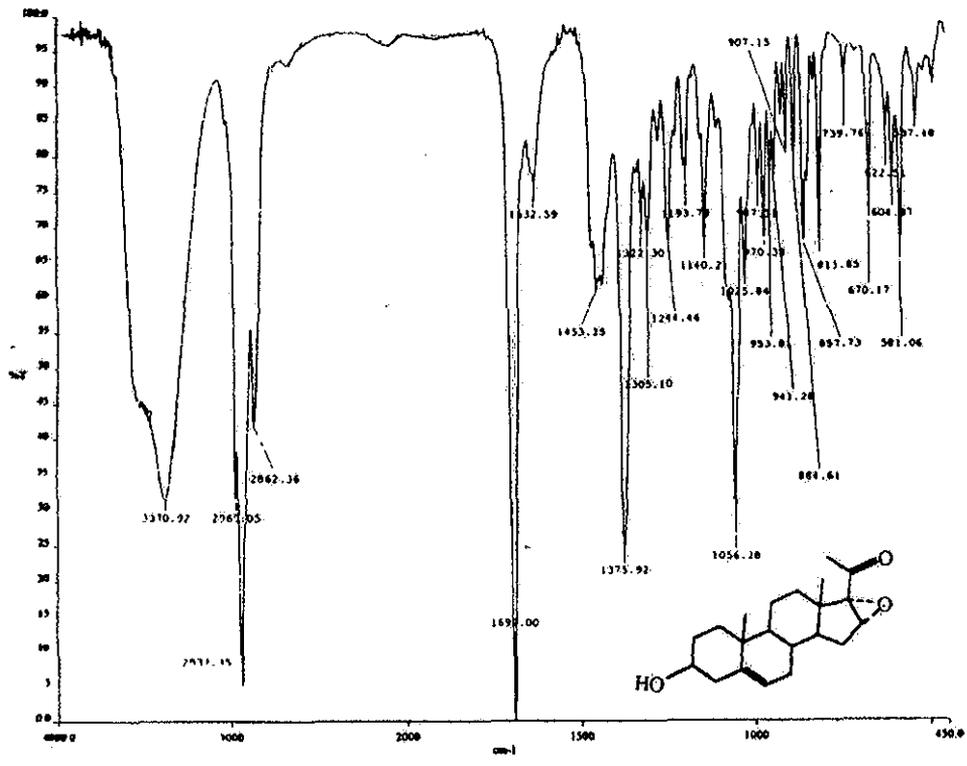
54. Anderson S, Bergman DM, Jenkins EP, Russell DW, **Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism**, *Nature*, **354**, 159-161 (1991)
55. Voigt W, Hsia LS, **The antiandrogenic action of 4-androsten-3-one-17 $\alpha$ -carboxylic acid and methyl esters on hamster flank organ**, *Endocrinology*, **92**, 1216-1220 (1972)
56. Silverstein R, **The organic chemistry of drug design and drug action**, *Academic Press*. USA (1992)
57. Janssens F, Torremans J, Janssen PA, **Synthetic 1,4-disubstituted-1,4-dihydro-5H-tetrazol-5-one derivatives of fentanyl: Alfentanyl (R39209), a potent, extremely short-acting narcotic analgesic**, *J.Med.Chem.*, **29**, 2290-2297 (1986)
58. Ghose AK, Crippen GM, **Use of physicochemical parameters in distance geometry and related three dimensional Quantitative Structure-Activity relationships: A demonstration using *Escherichia coli* dihydrofolate reductase inhibitors**, *J.Med.Chem.*, **28**, 333-346 (1985)
59. Hehre WJ, Huang WW, Klunzinger PE, Deppmeier BJ, Driessen AJ, **A Spartan tutorial**, Wavefunction, Inc., USA (1997)
60. Shriner RL, Fuson RC, Curtin DY, **Identificación sistemática de compuestos orgánicos**, Ed. Limusa, México, D.F. (1988)
61. Bradford MM, **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, *Ann.Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)

62. Cheng YC, Prusoff WH, **Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction**, *Biochem.Pharmacol.*, **22**, 3099-3108 (1973)

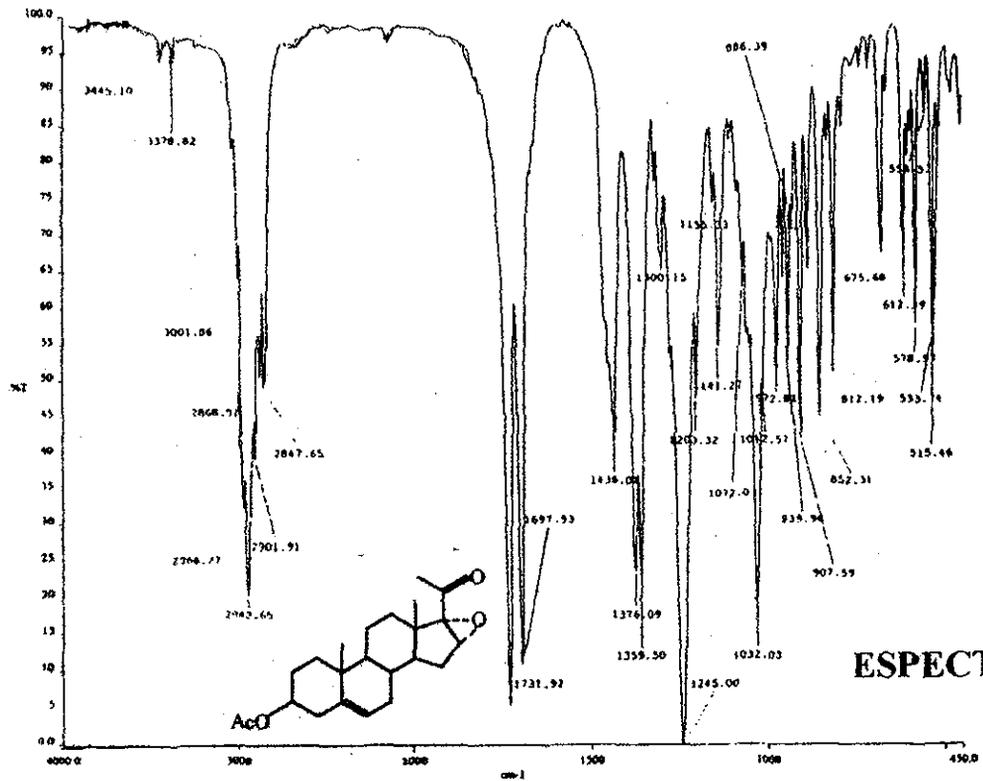
# **9. ANEXO DE ESPECTROSCOPIA**



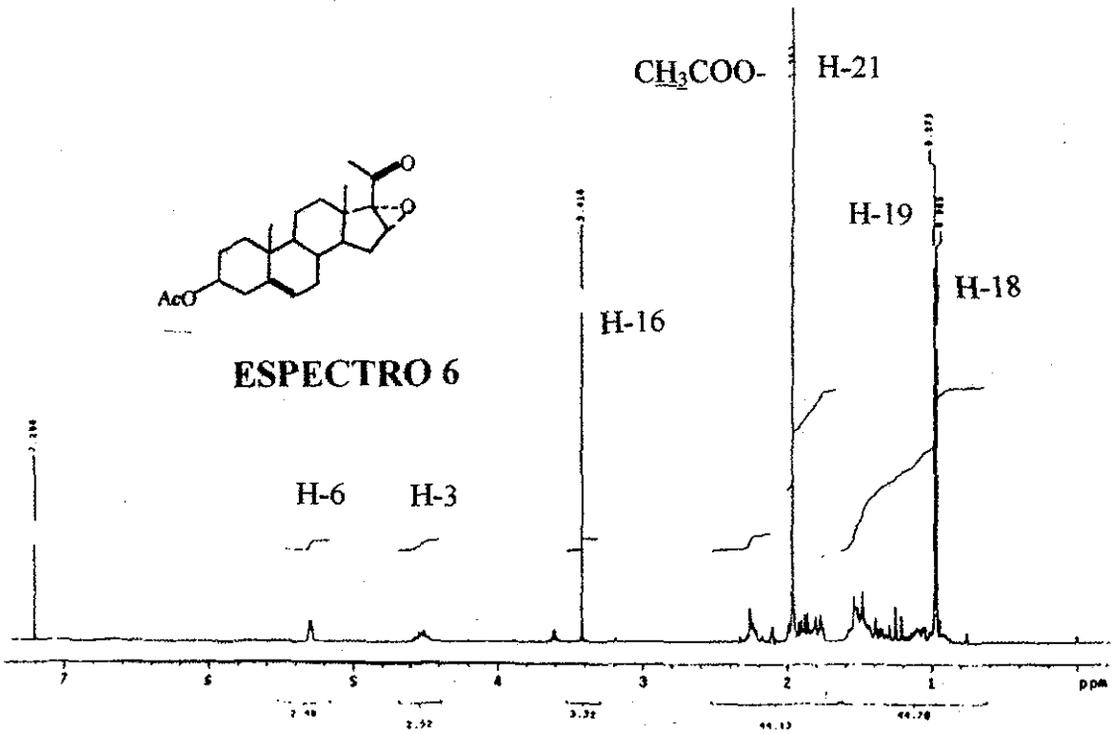
TESIS CON 88  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

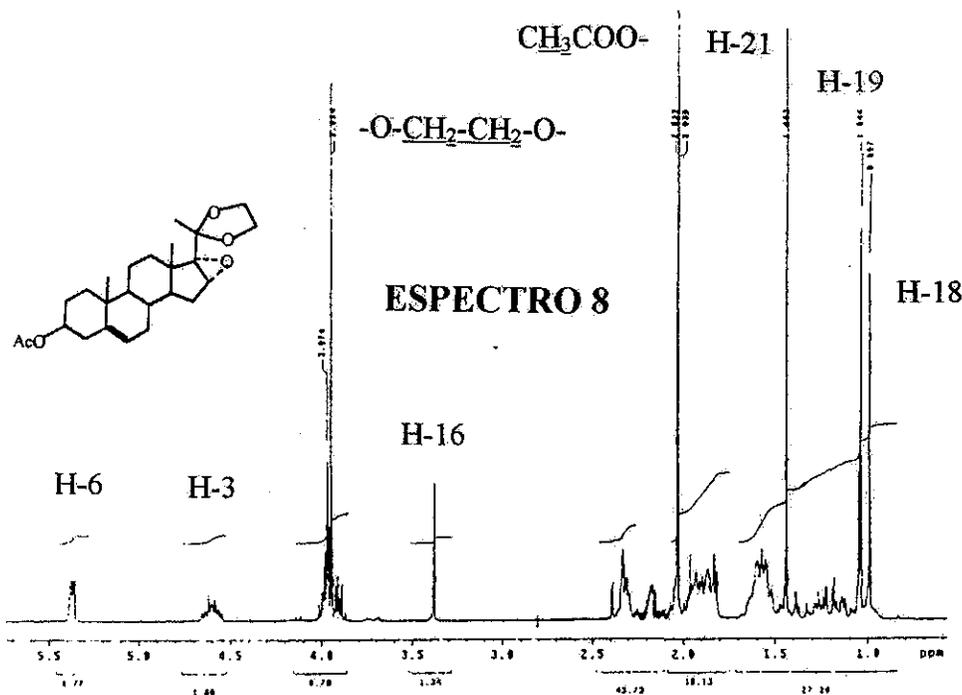
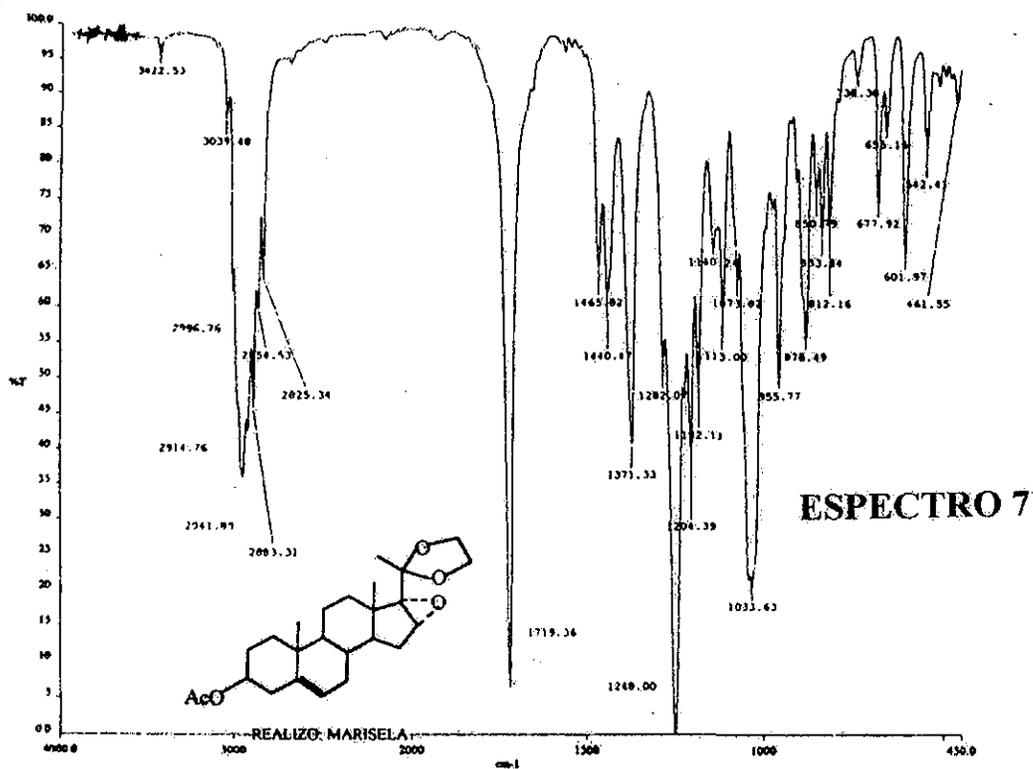


ESPECTRO 5

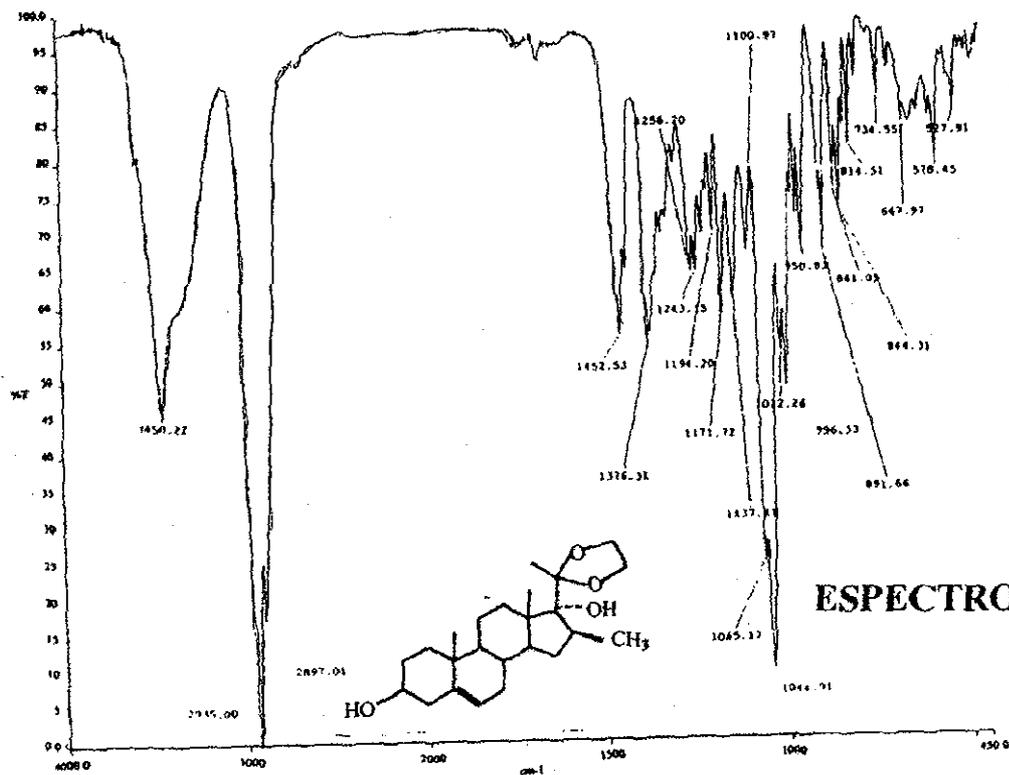


ESPECTRO 6

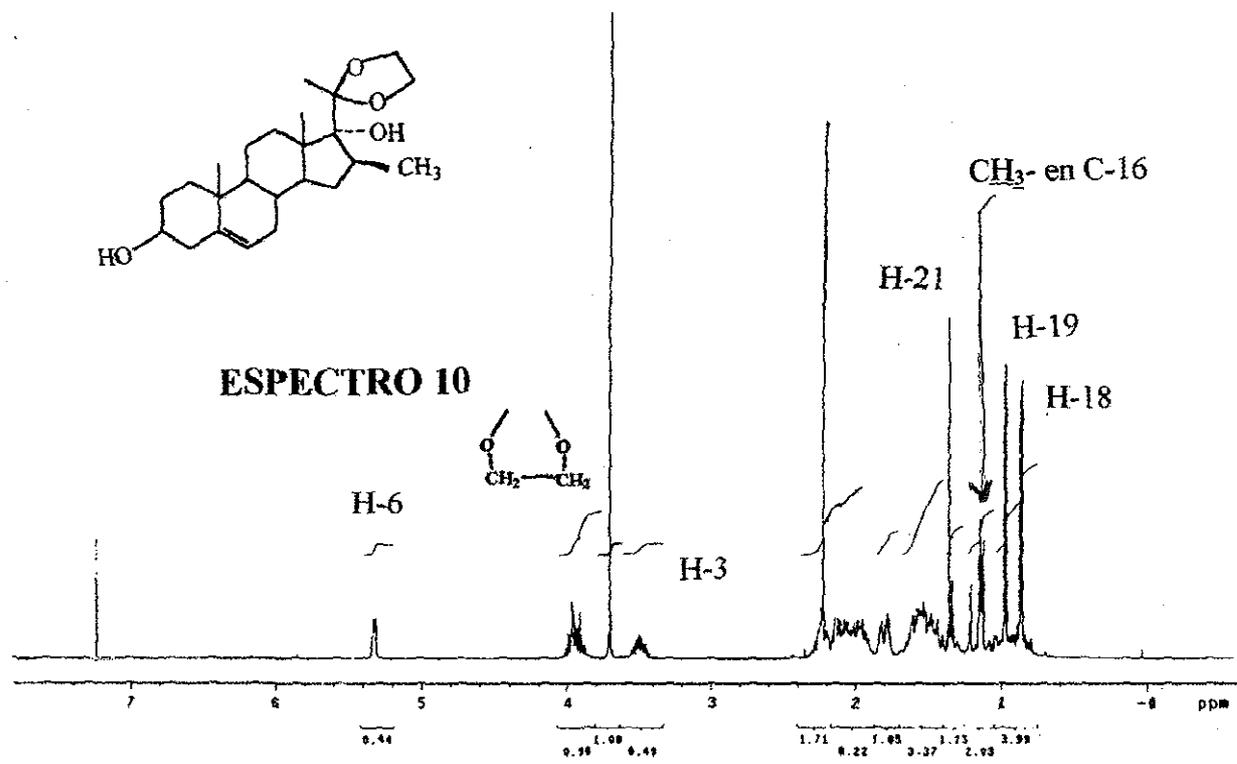
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

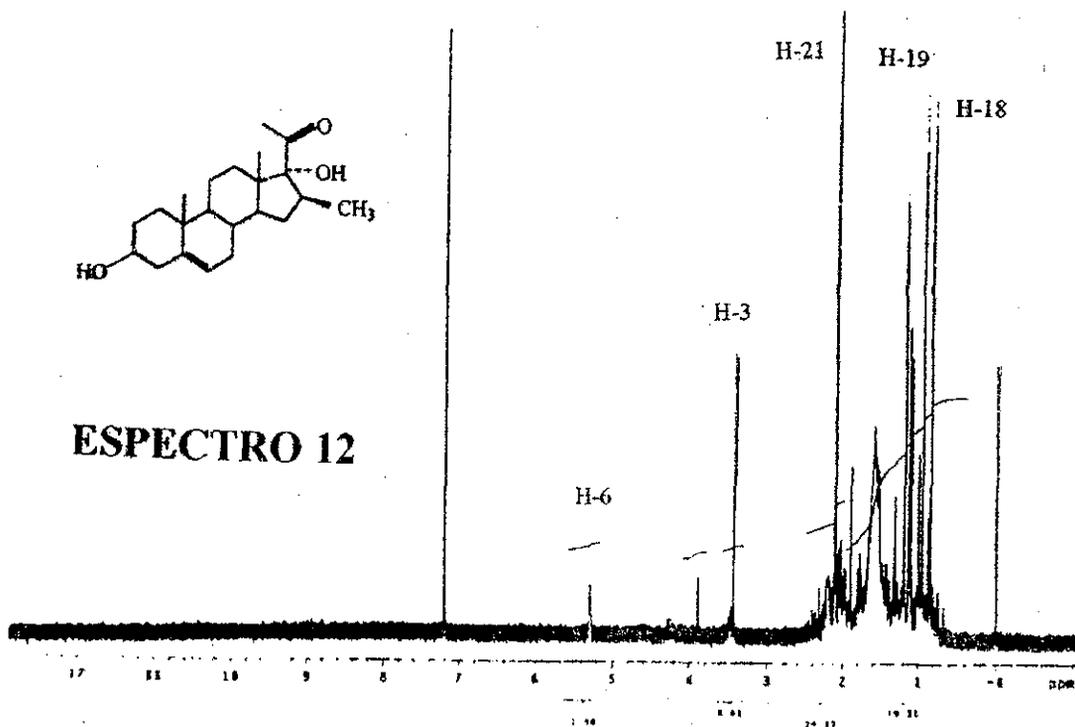
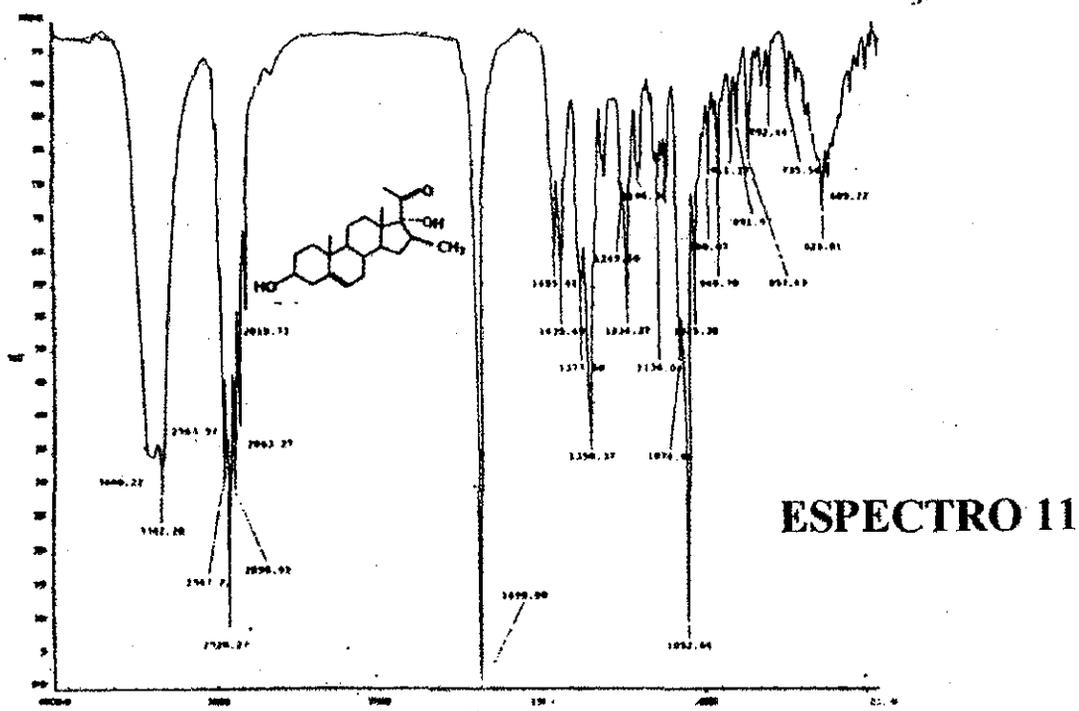


ESPECTRO 9

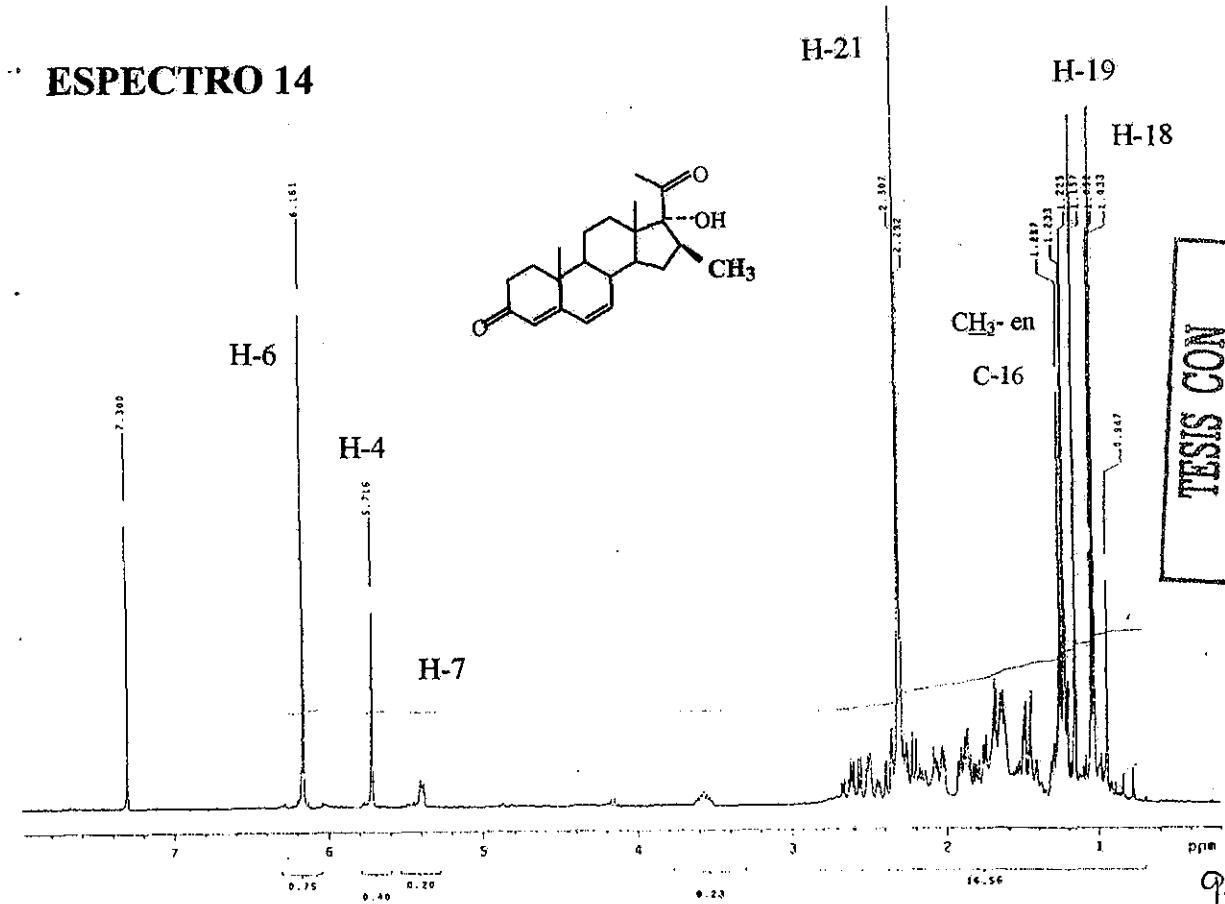
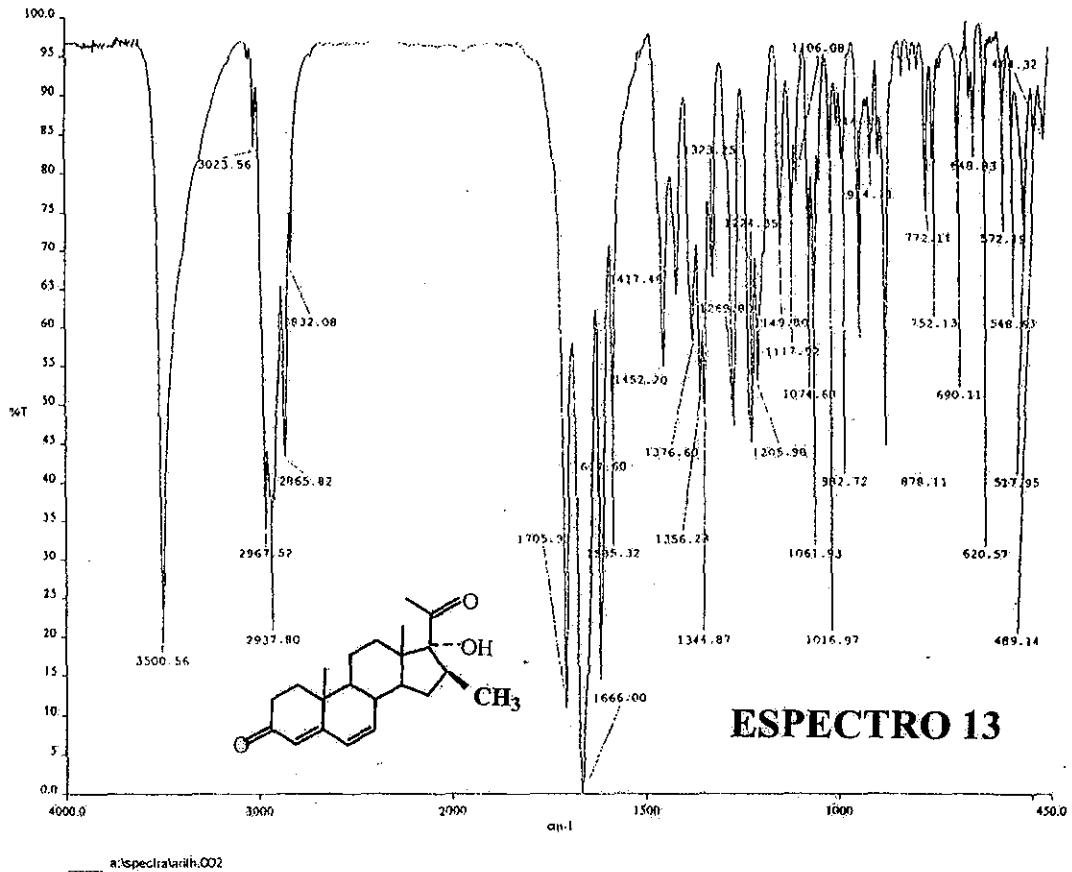


ESPECTRO 10

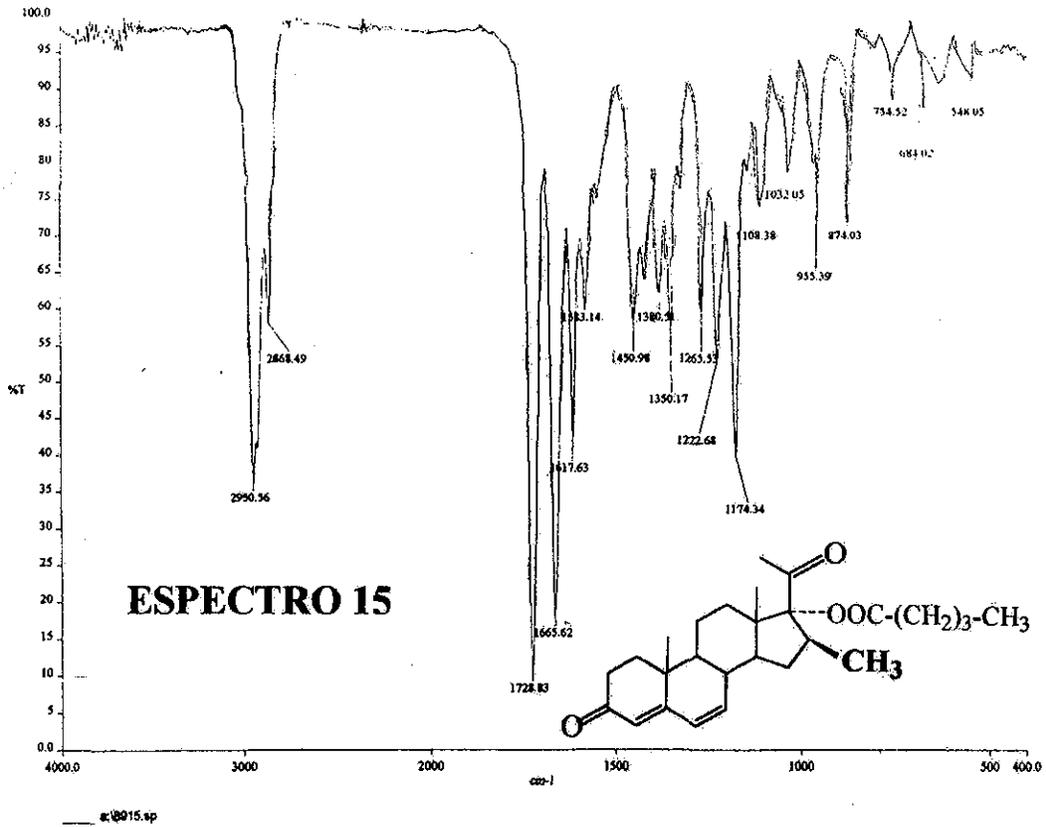
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



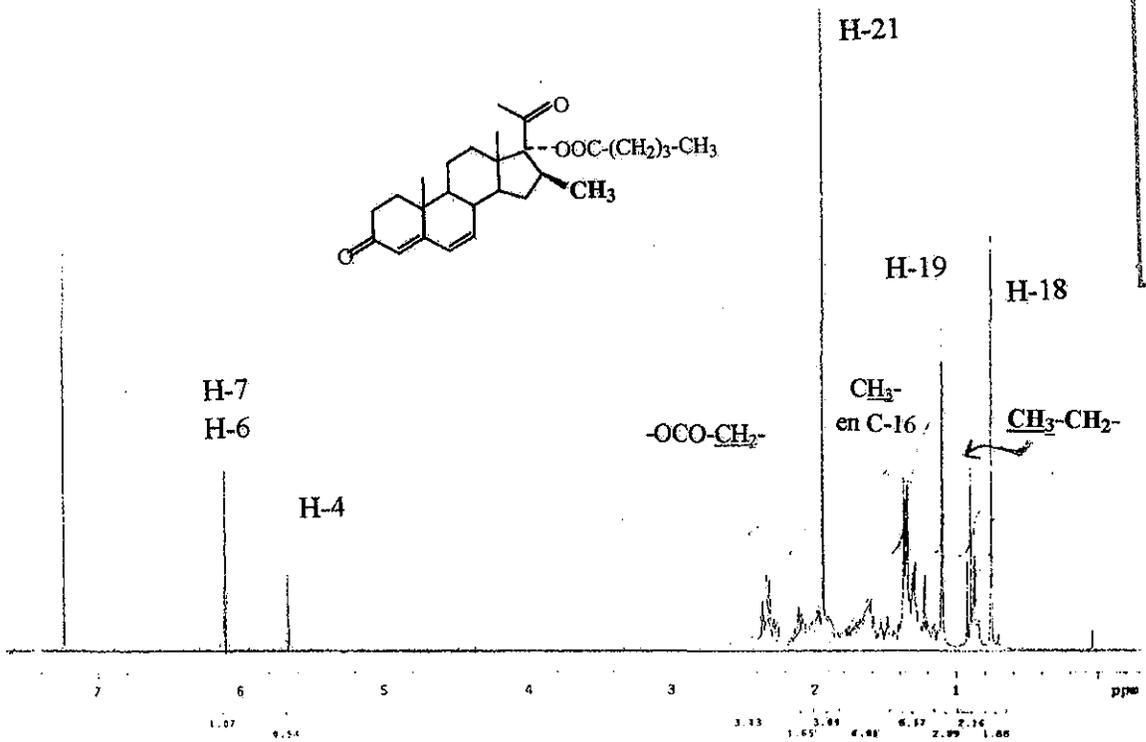
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

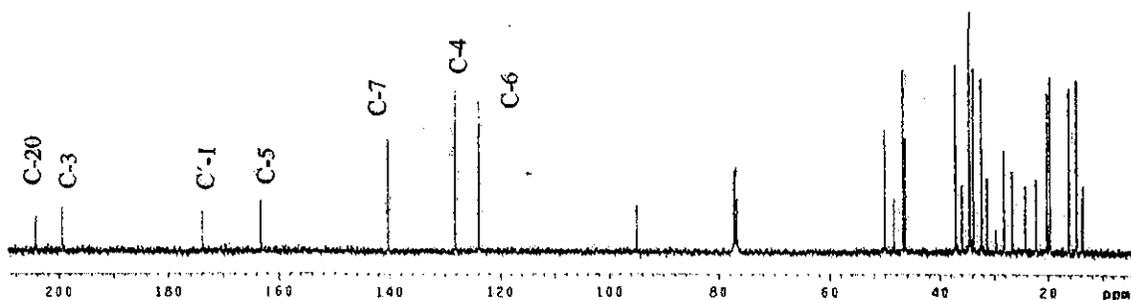
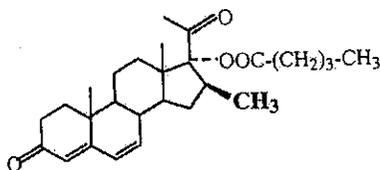


**ESPECTRO 16**

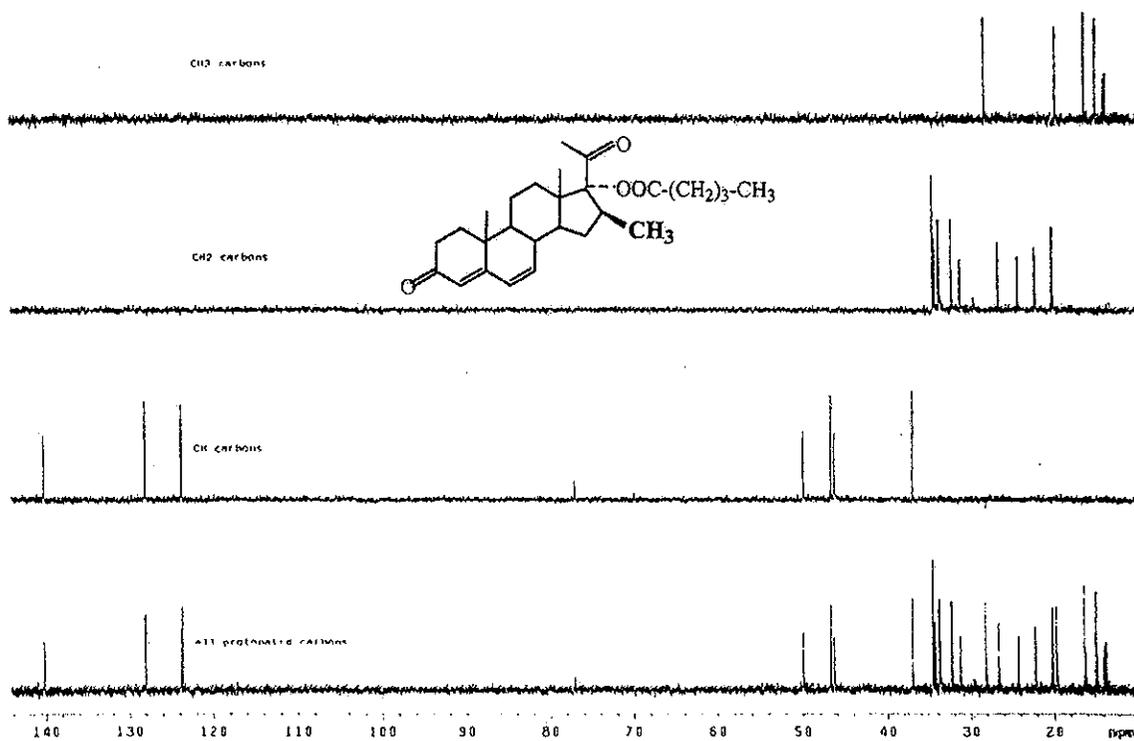
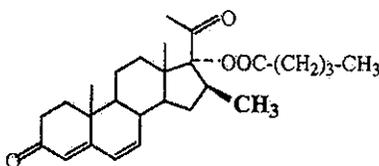


TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

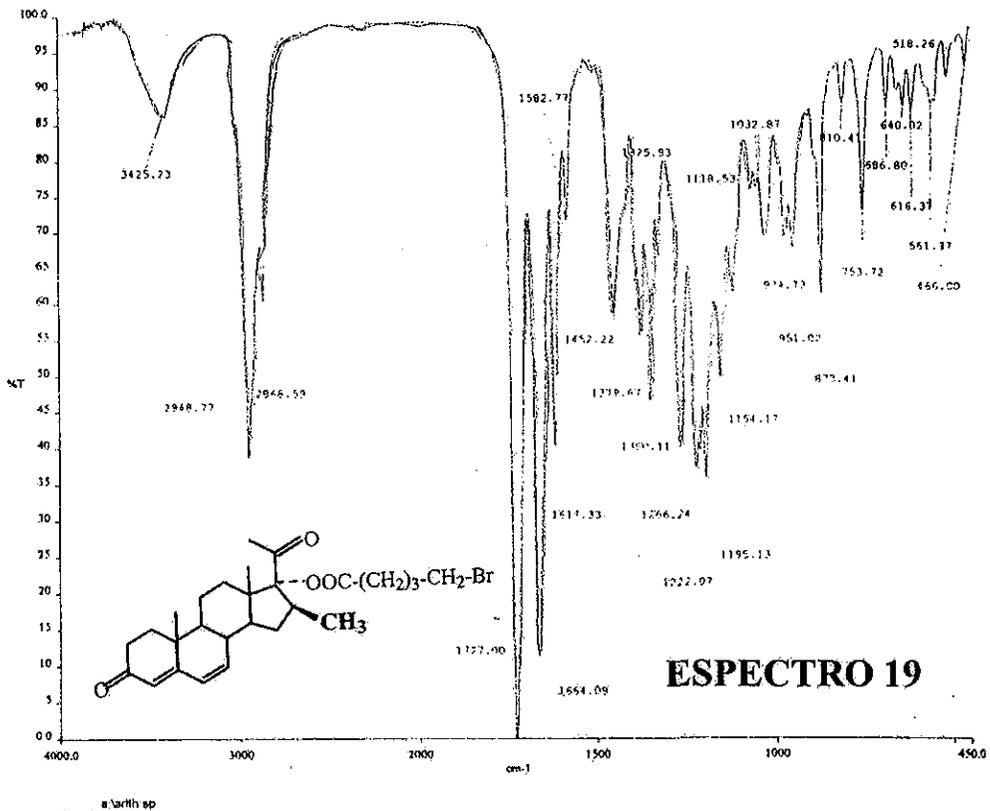
# ESPECTRO 17



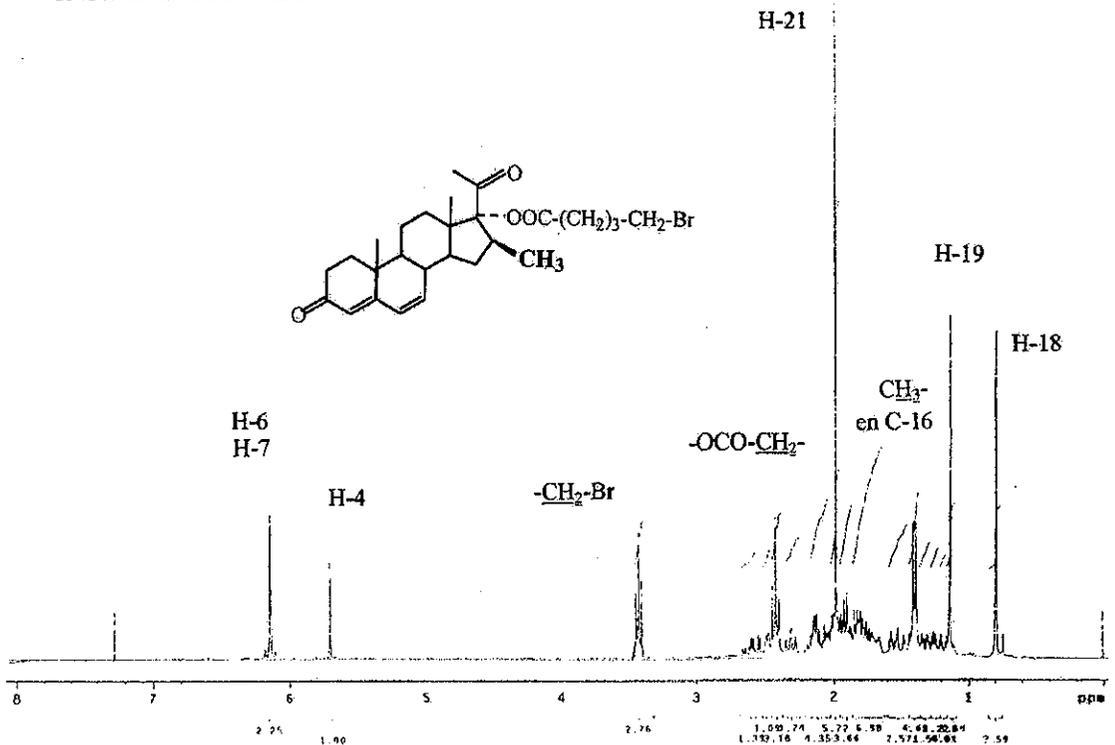
# ESPECTRO 18



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

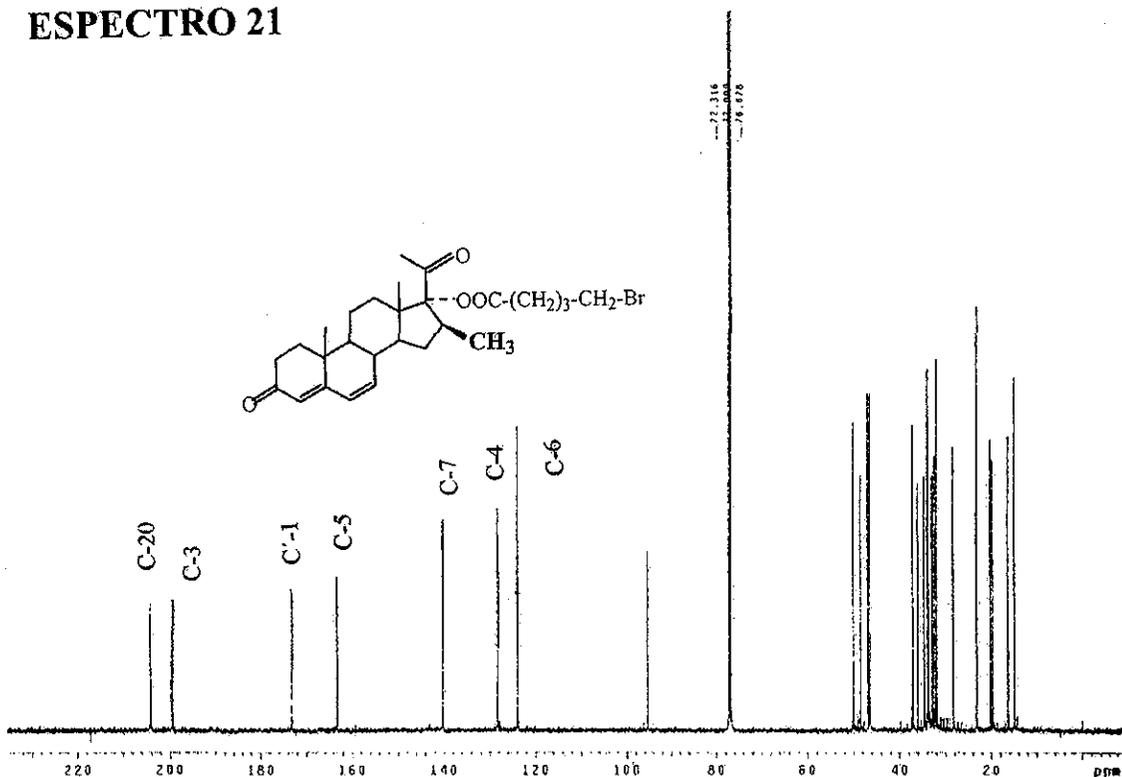


**ESPECTRO 20**



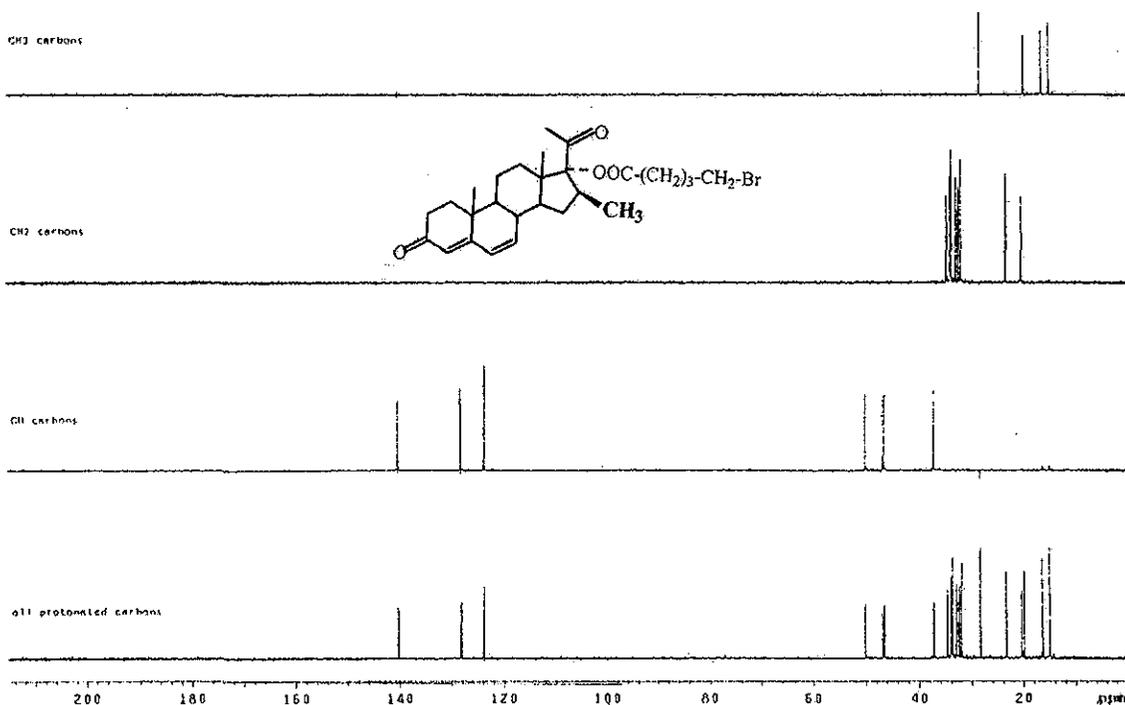
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ESPECTRO 21

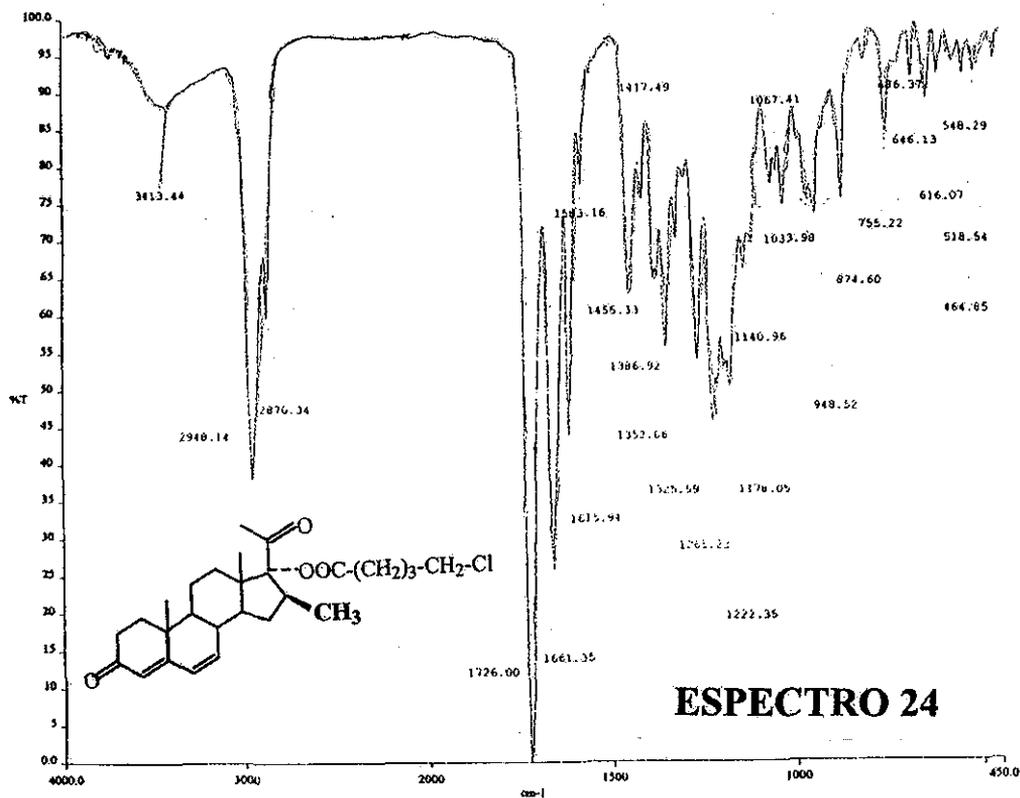
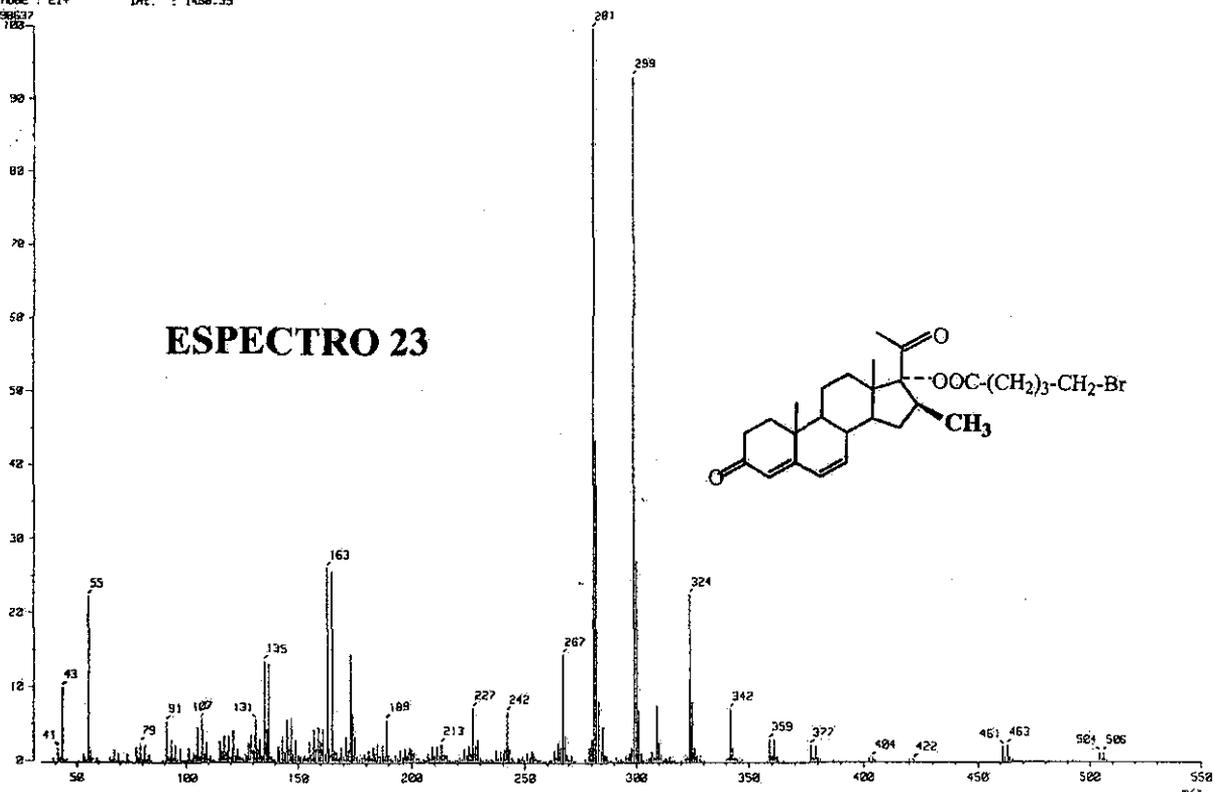


# ESPECTRO 22

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

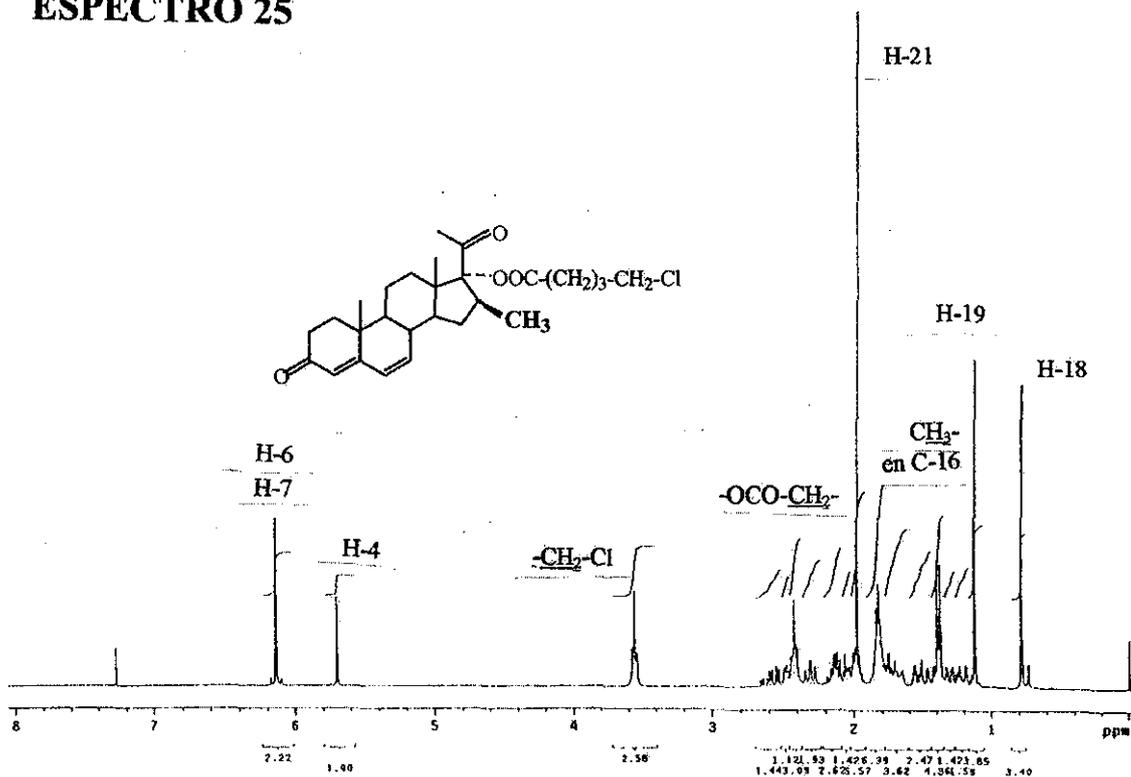


[ Mass Spectrum 1  
 RT : 1.46 min Scan : (53,56)-(75,100)-(4,16) Temp : 26.2 deg.C  
 Ion Mode : E1+ Int. : 1458.53  
 15398637

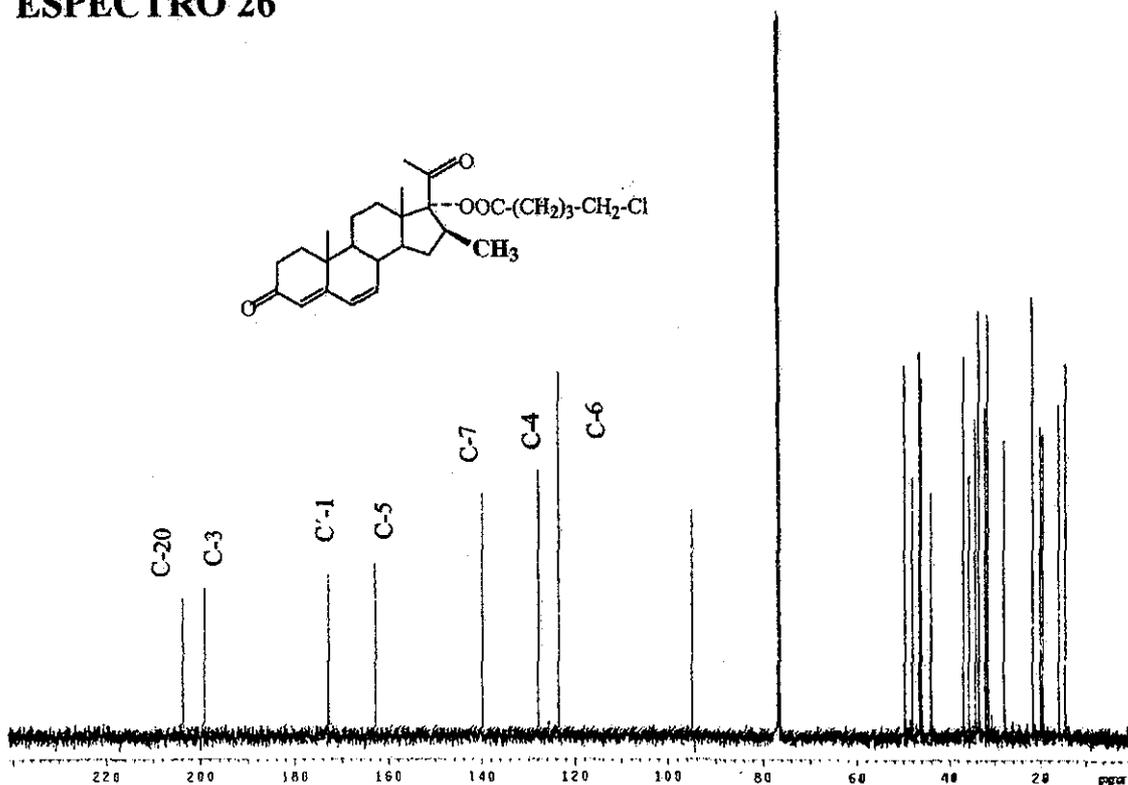


... A:\tdh\001

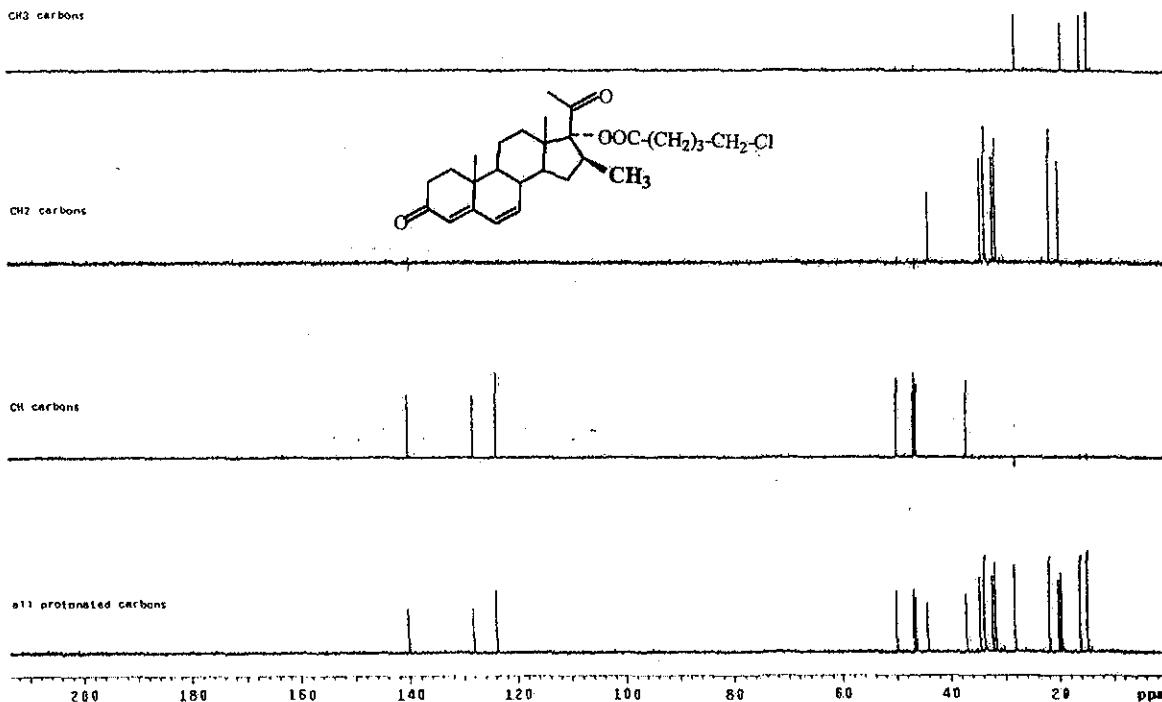
# ESPECTRO 25



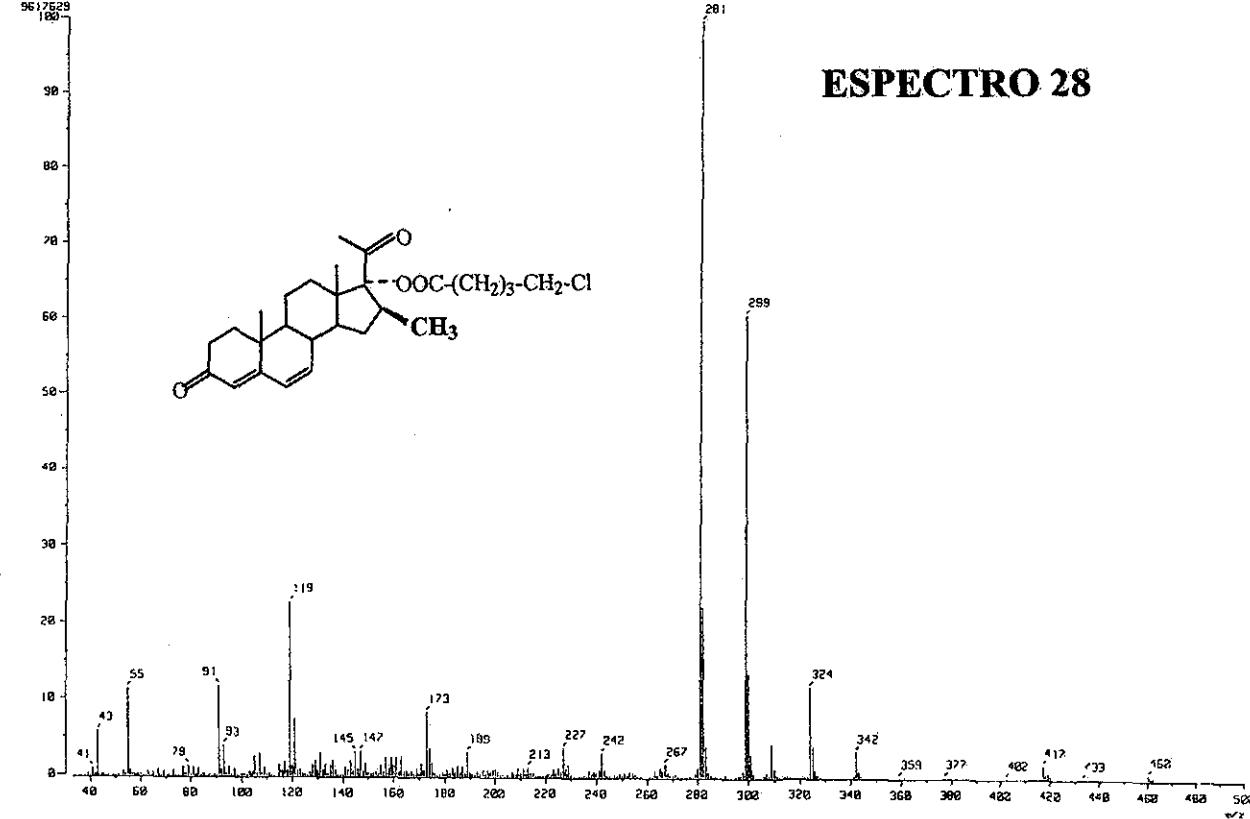
# ESPECTRO 26

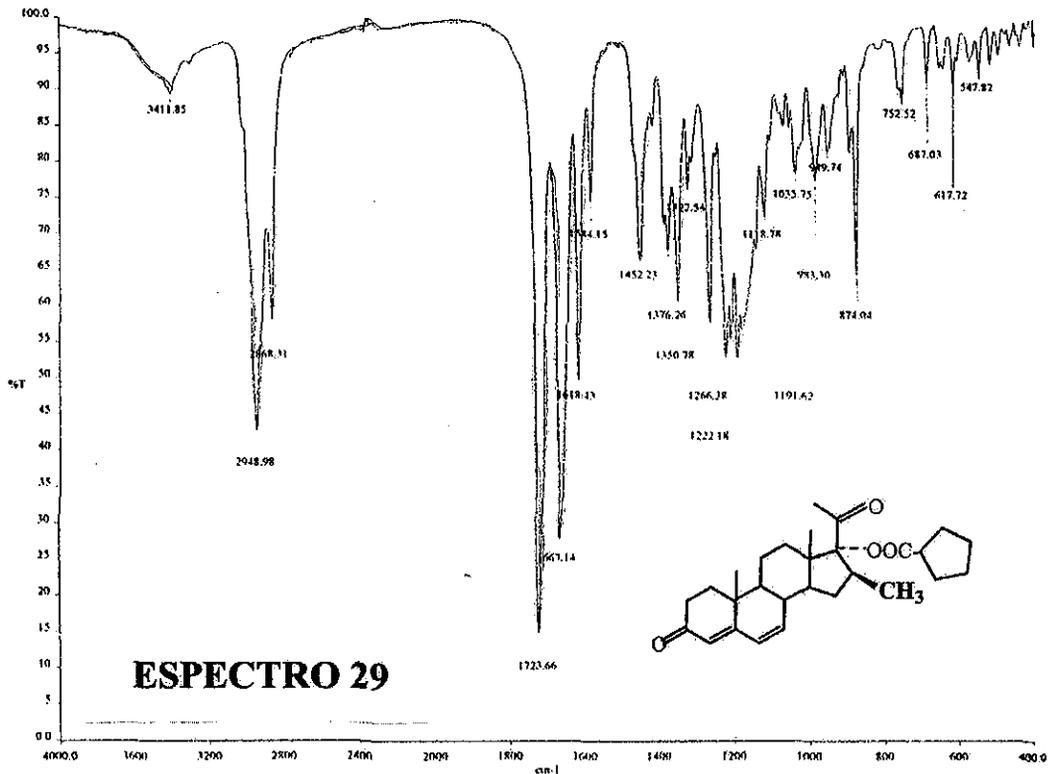


# ESPECTRO 27

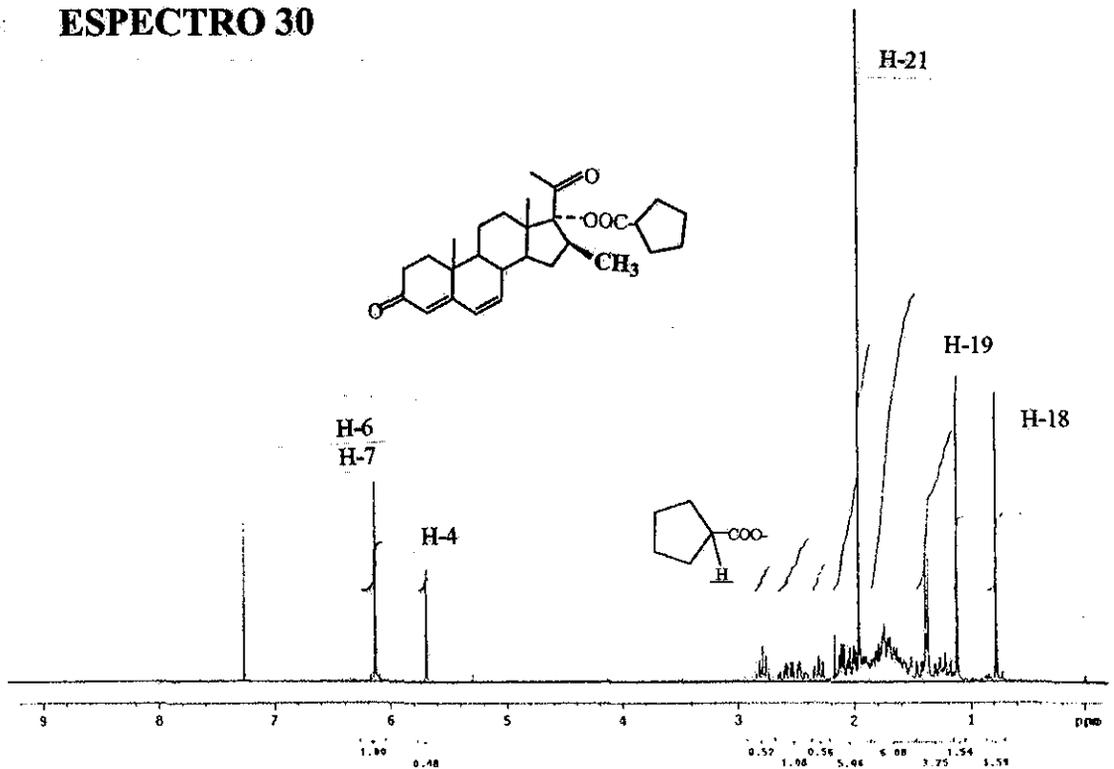


( Mass Spectrum )  
 RI : 0.91 min Scan# : (31,95)-(57,75)-(7,15) Temp : 23.7 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 917,21

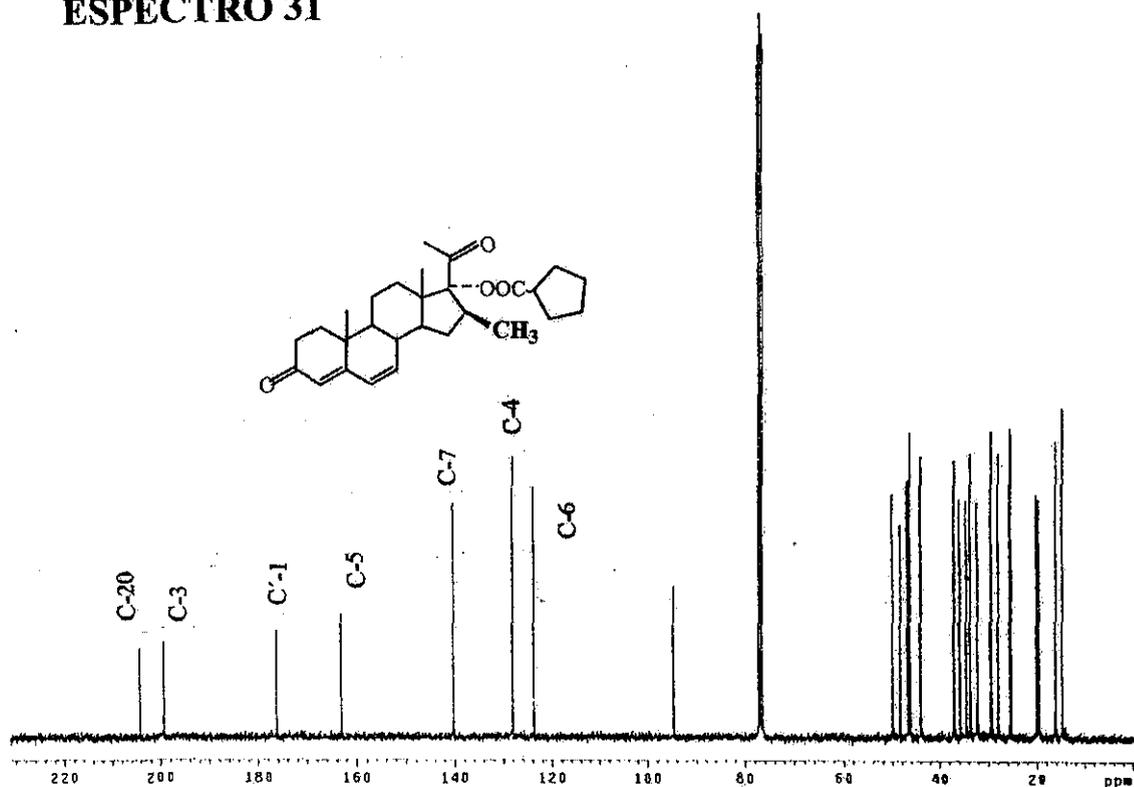




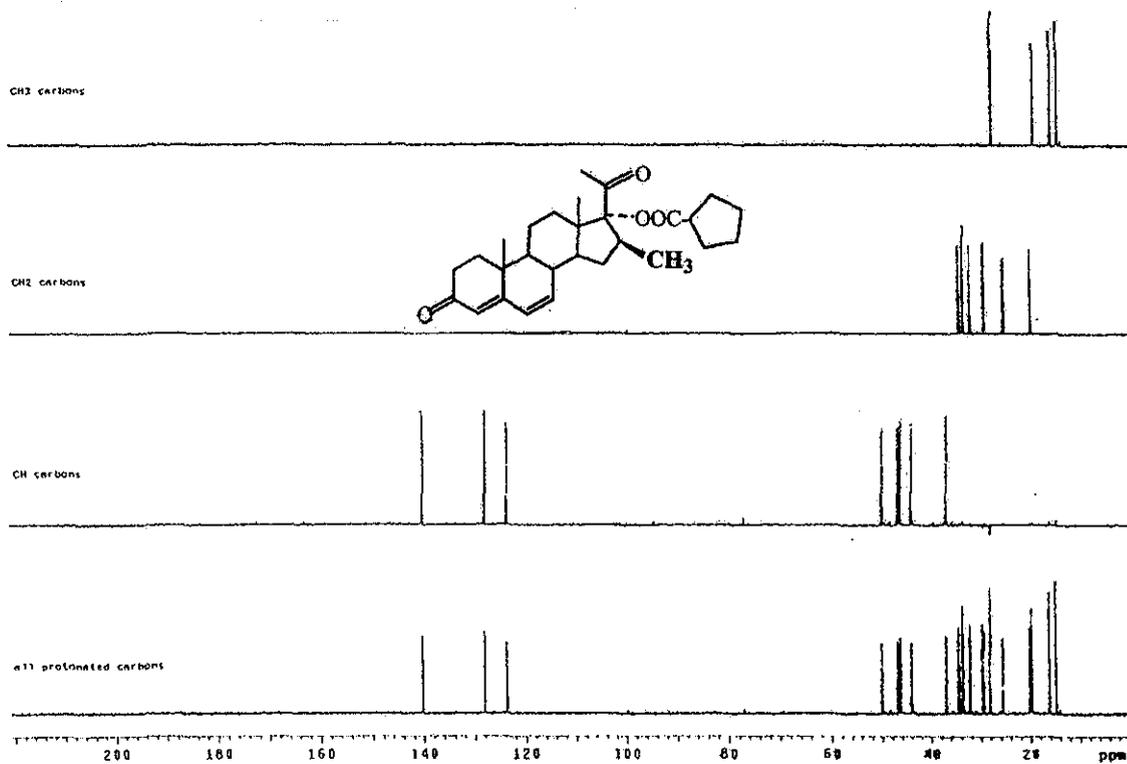
**ESPECTRO 30**

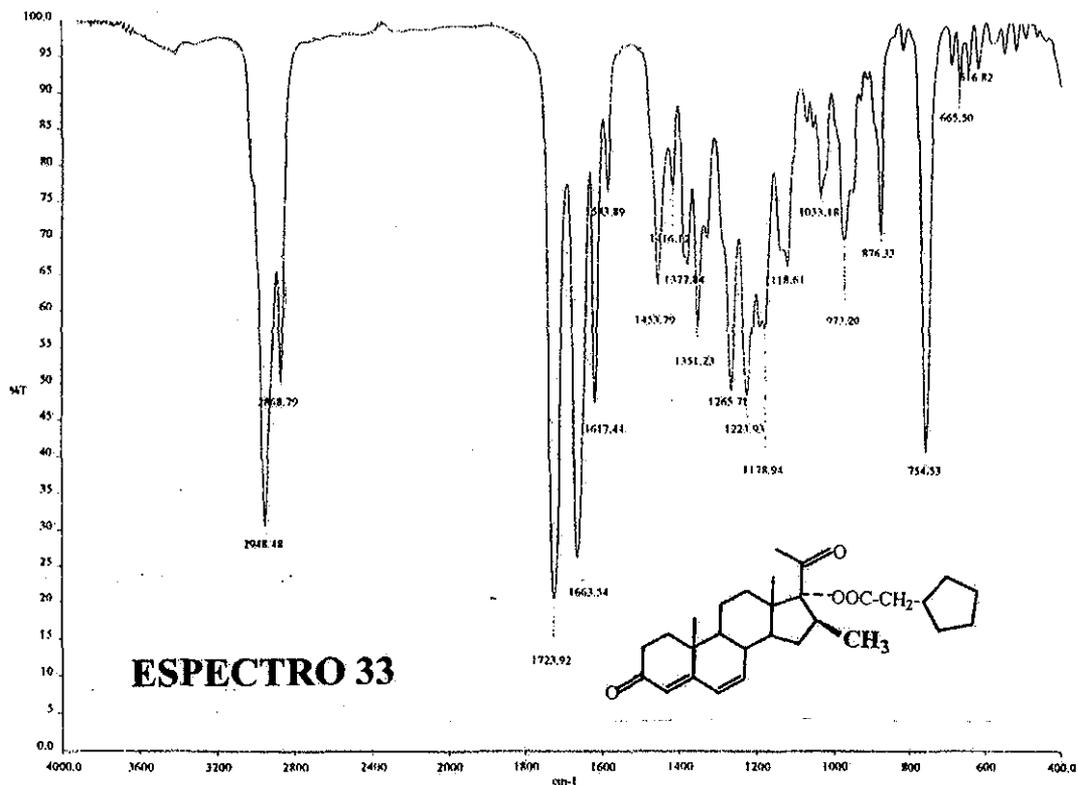


# ESPECTRO 31

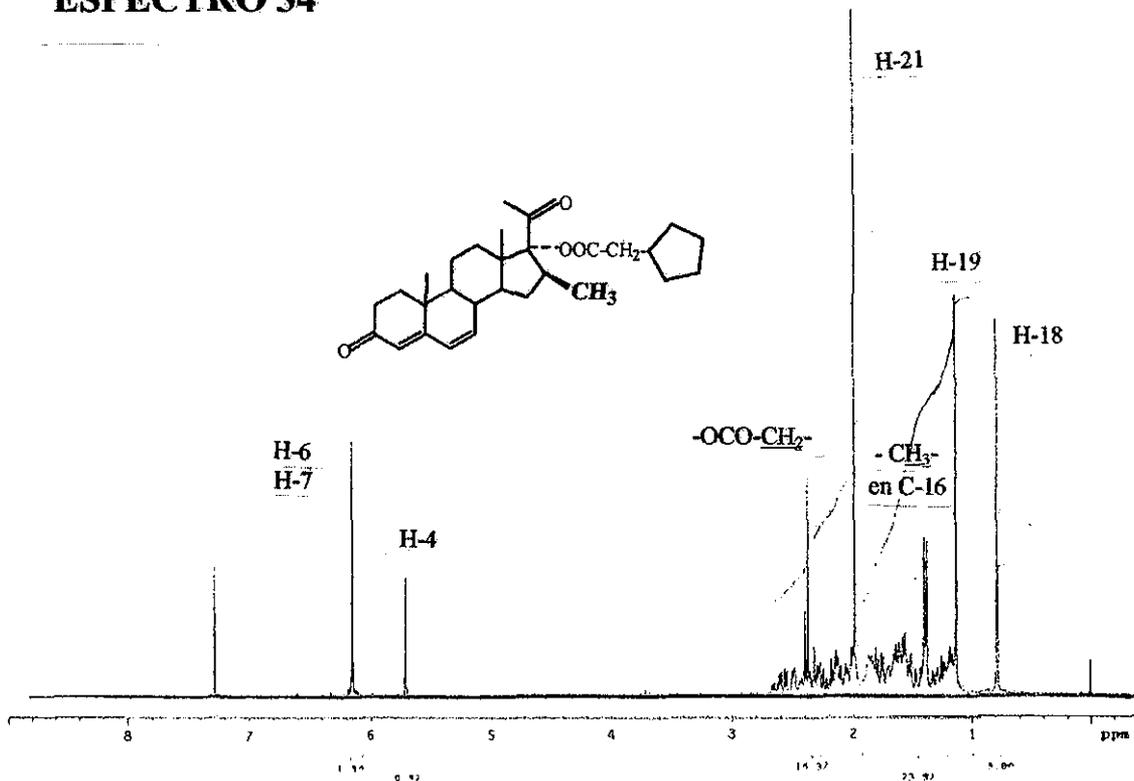


# ESPECTRO 32

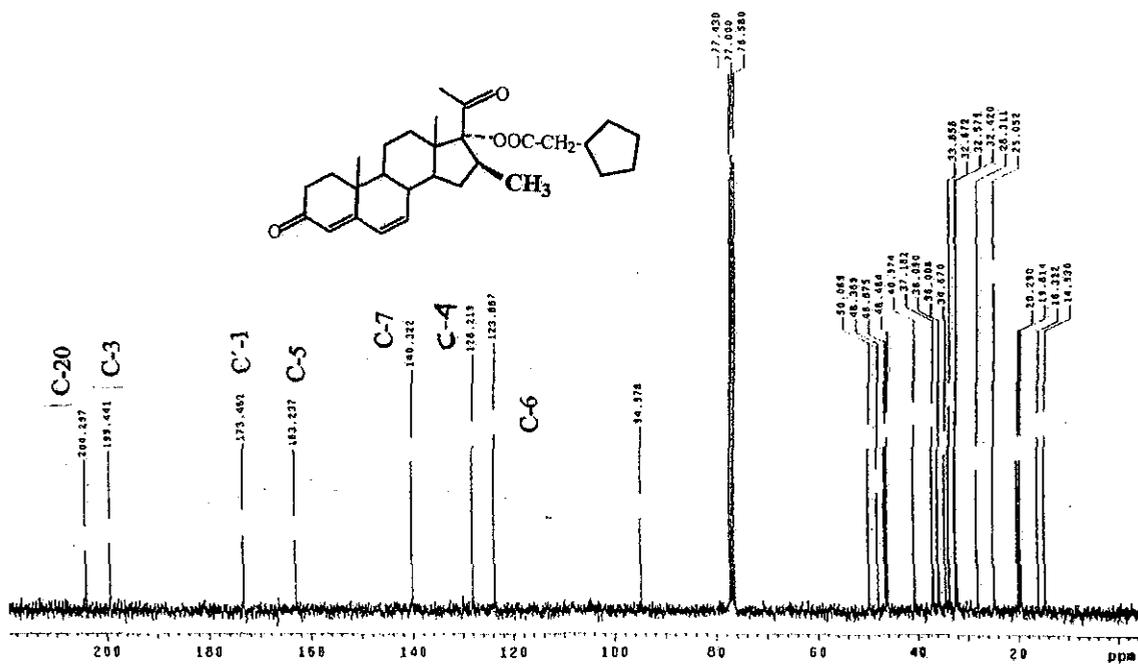




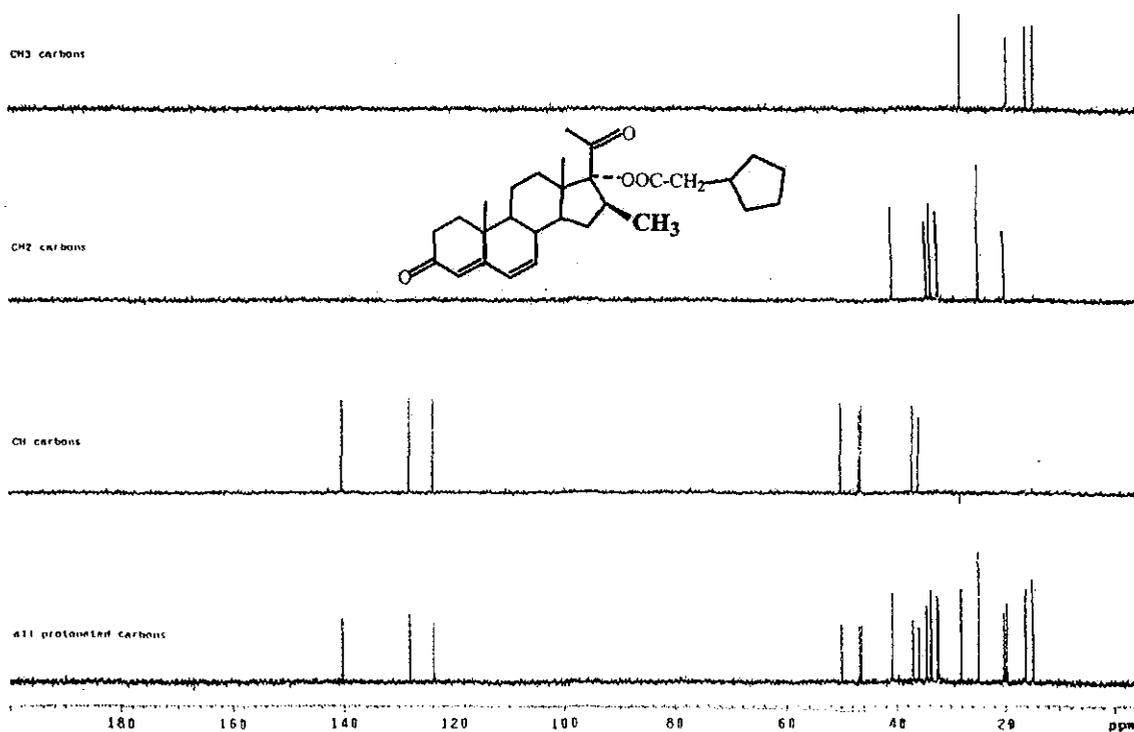
**ESPECTRO 34**

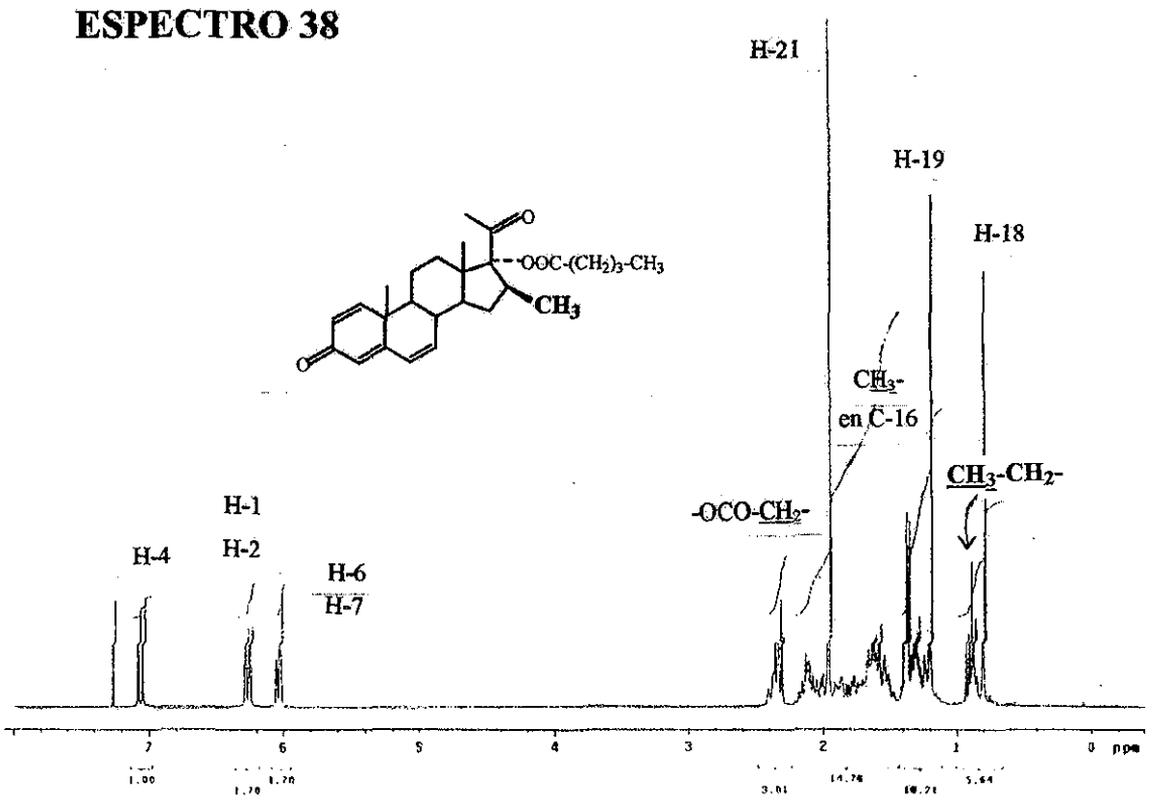
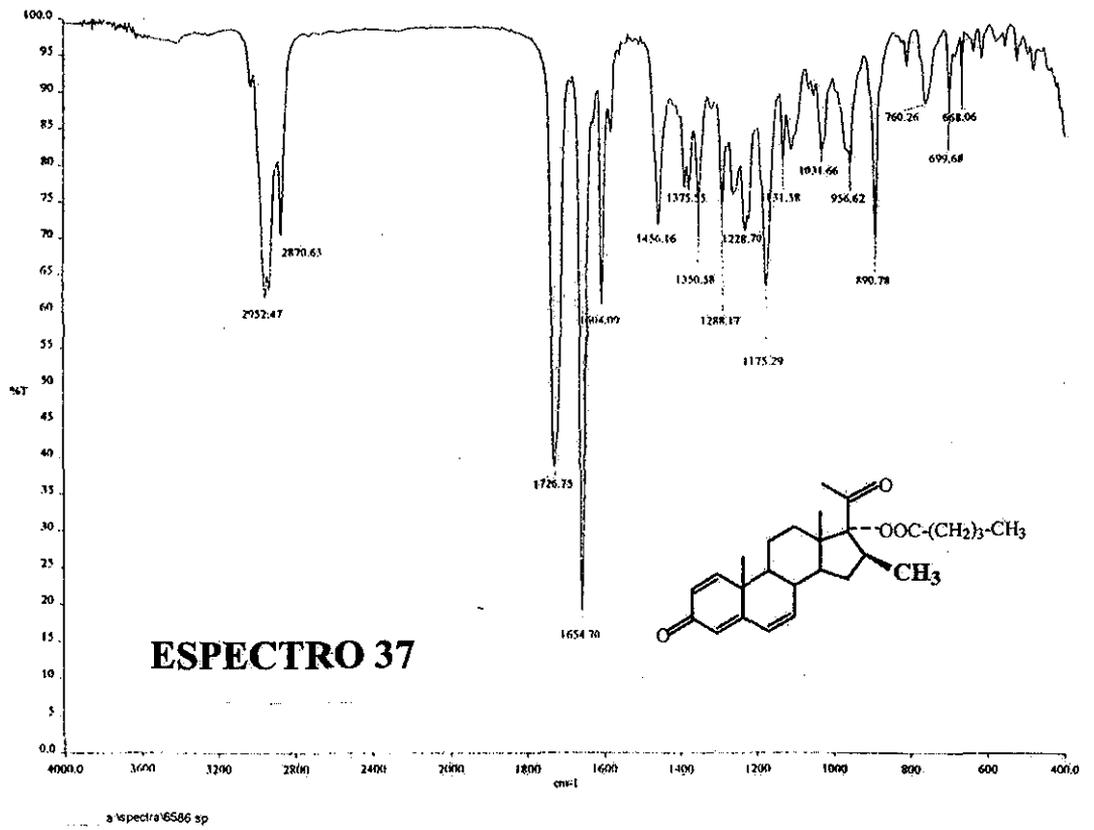


# ESPECTRO 35

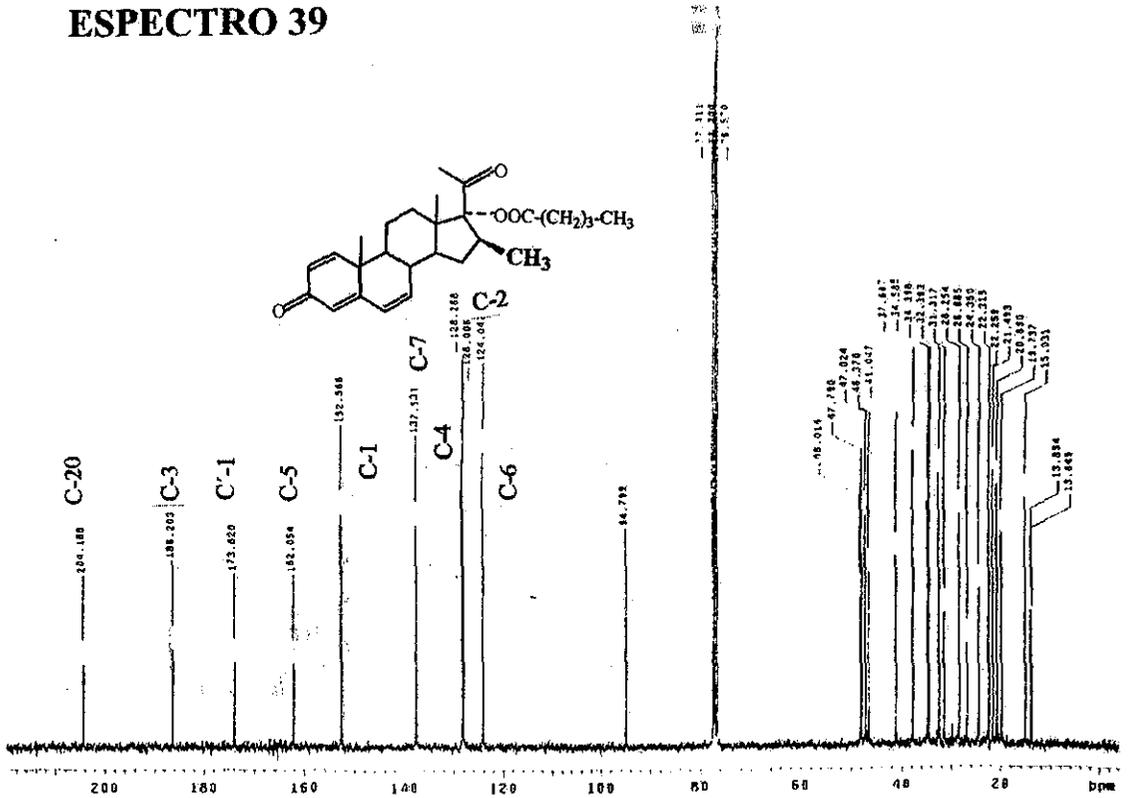


# ESPECTRO 36

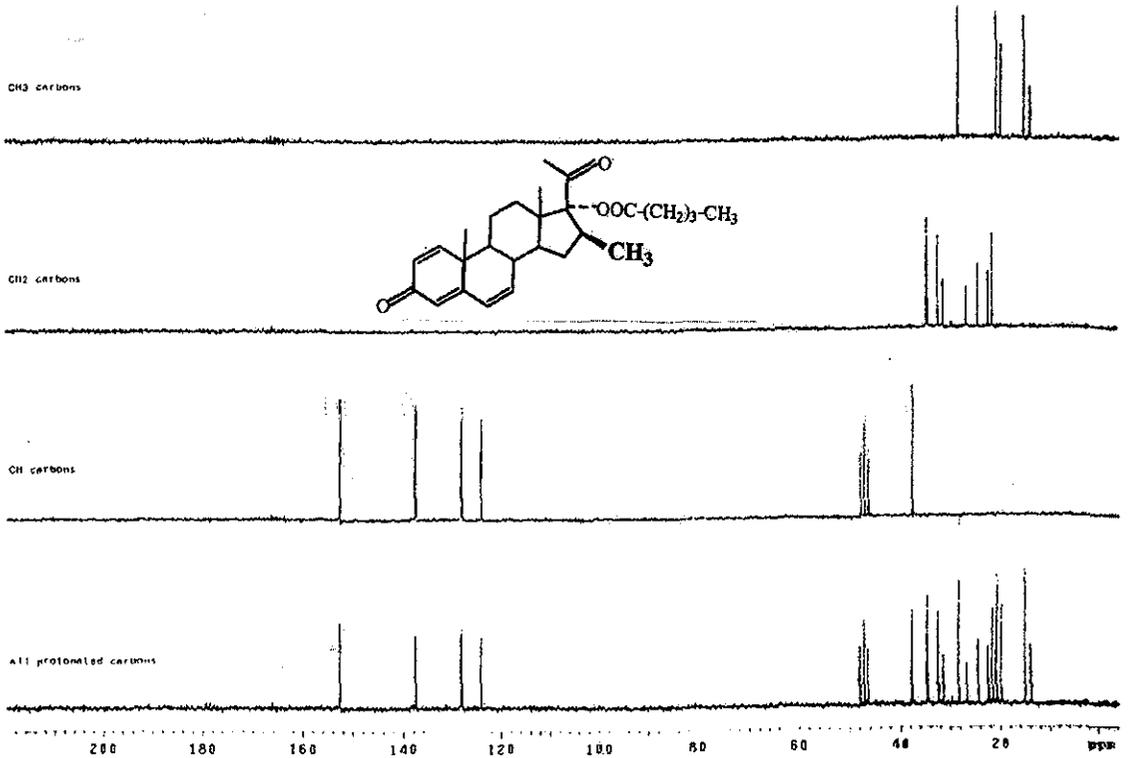


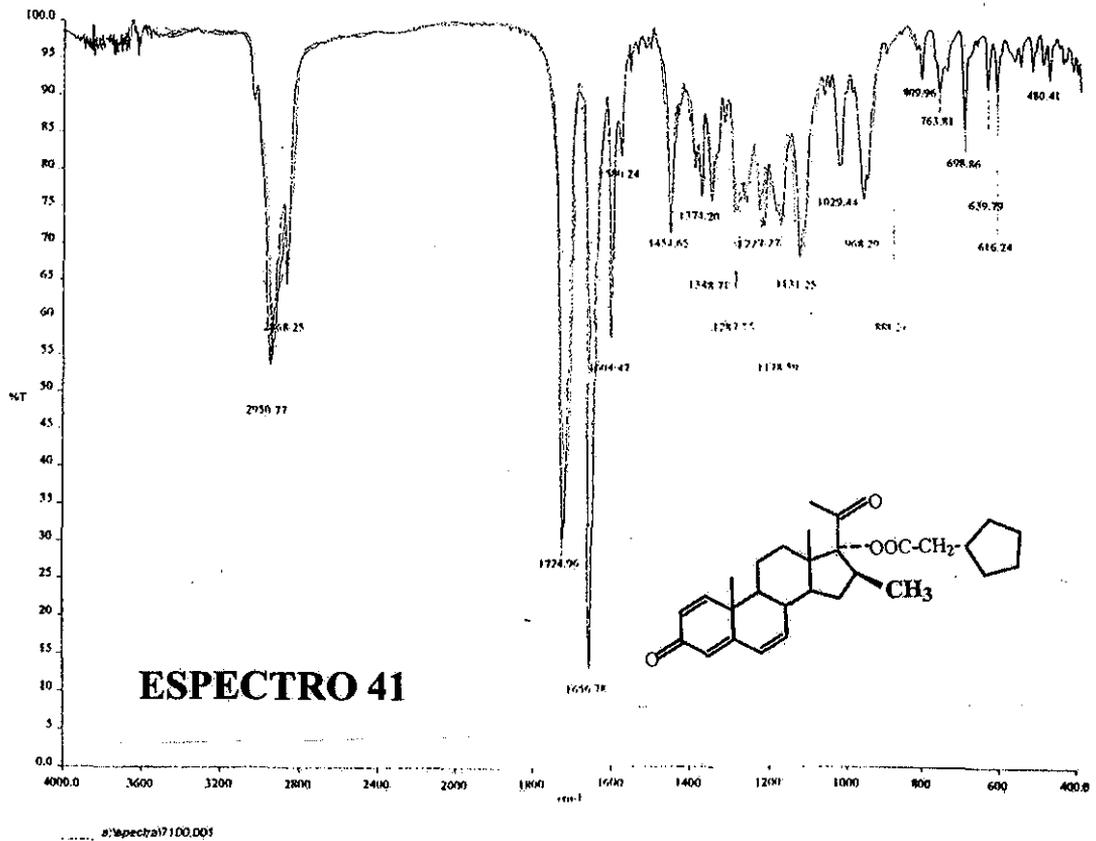


# ESPECTRO 39

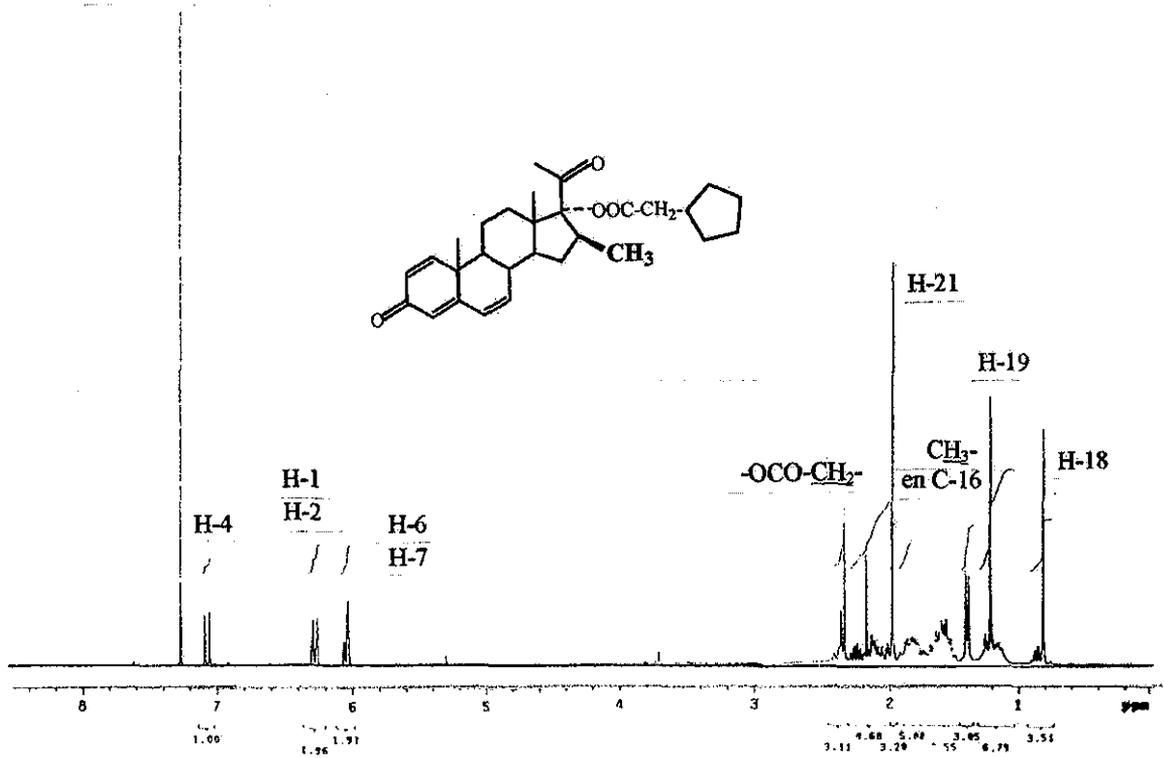


# ESPECTRO 40

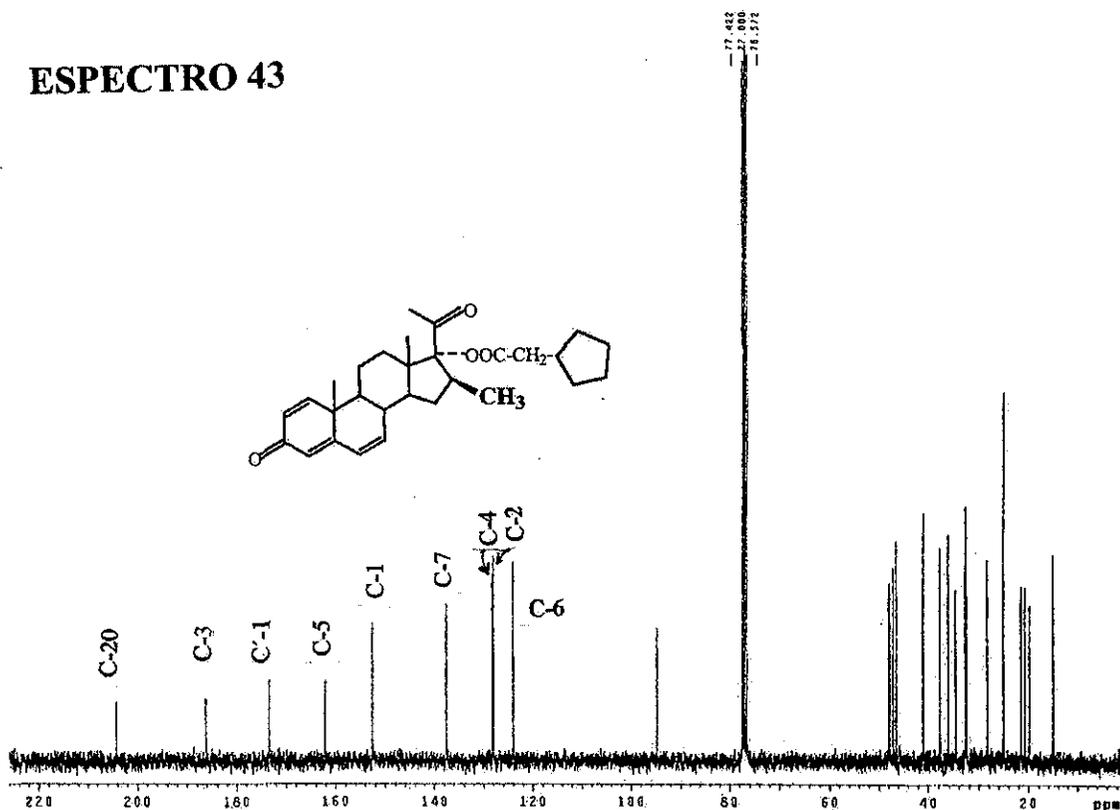




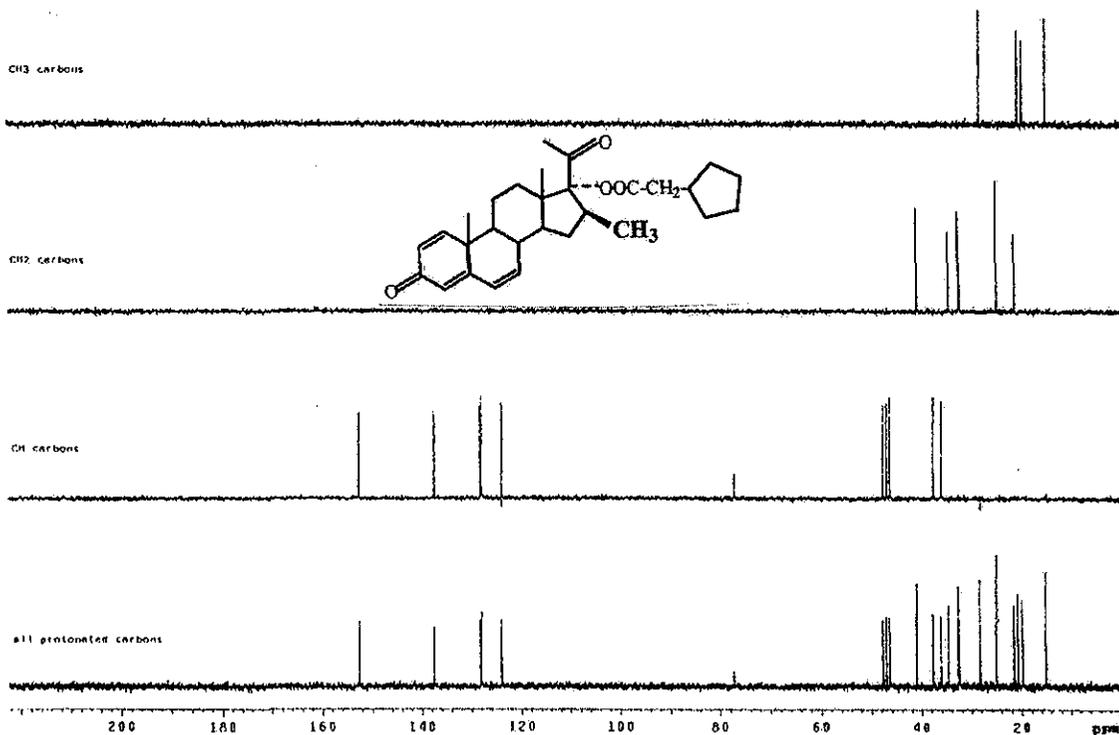
**ESPECTRO 42**

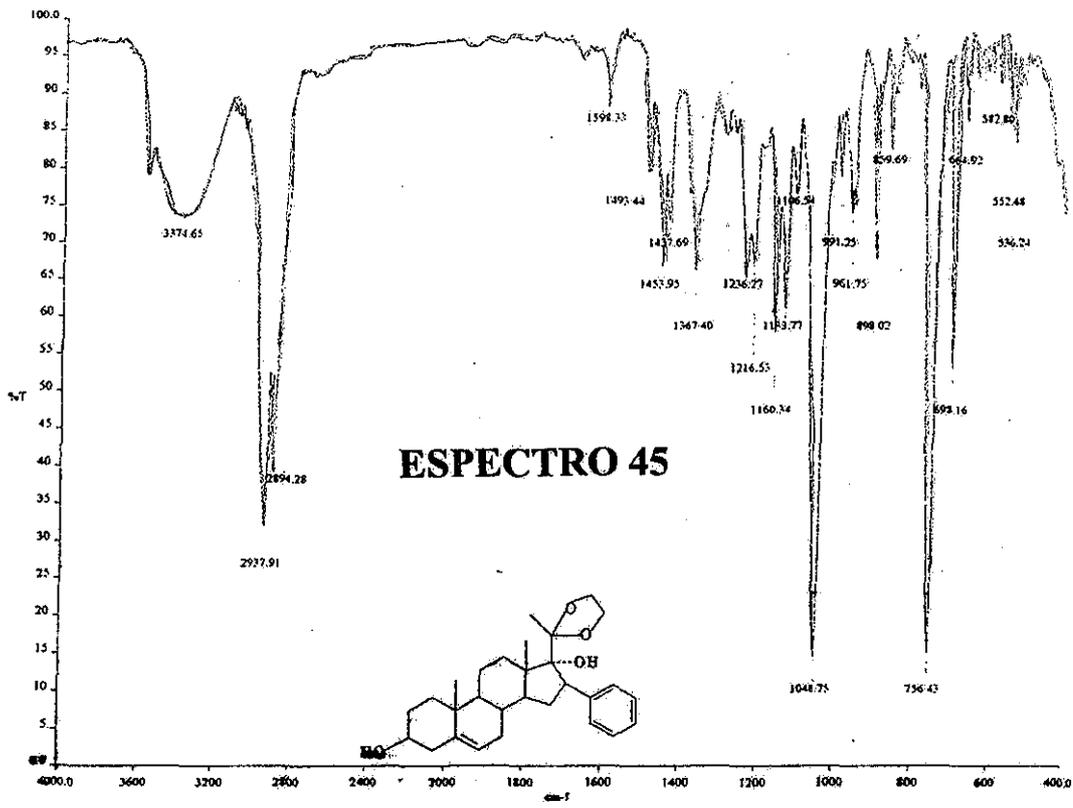


# ESPECTRO 43

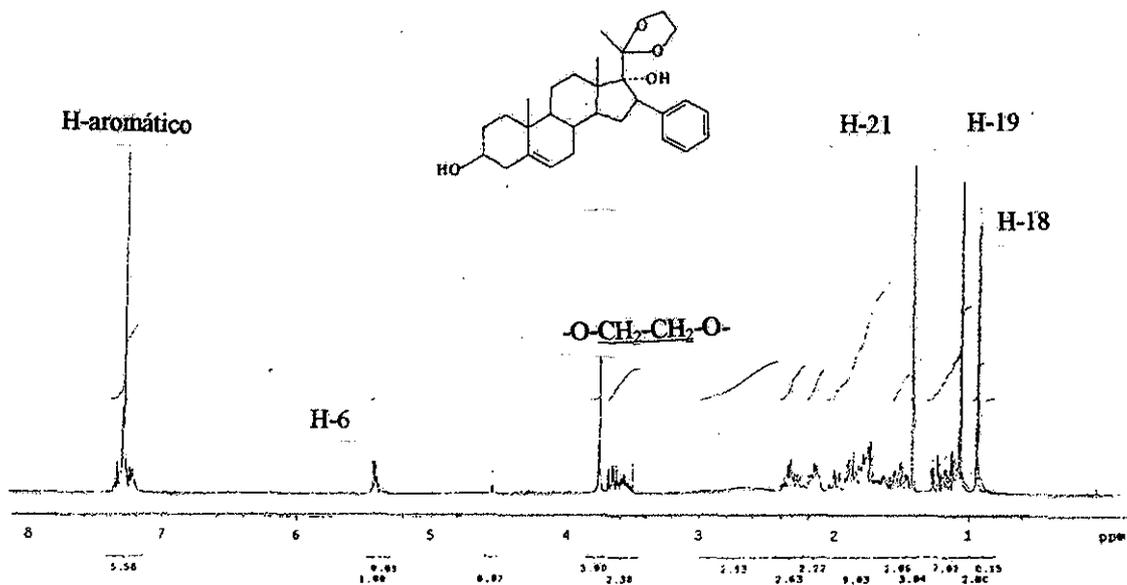


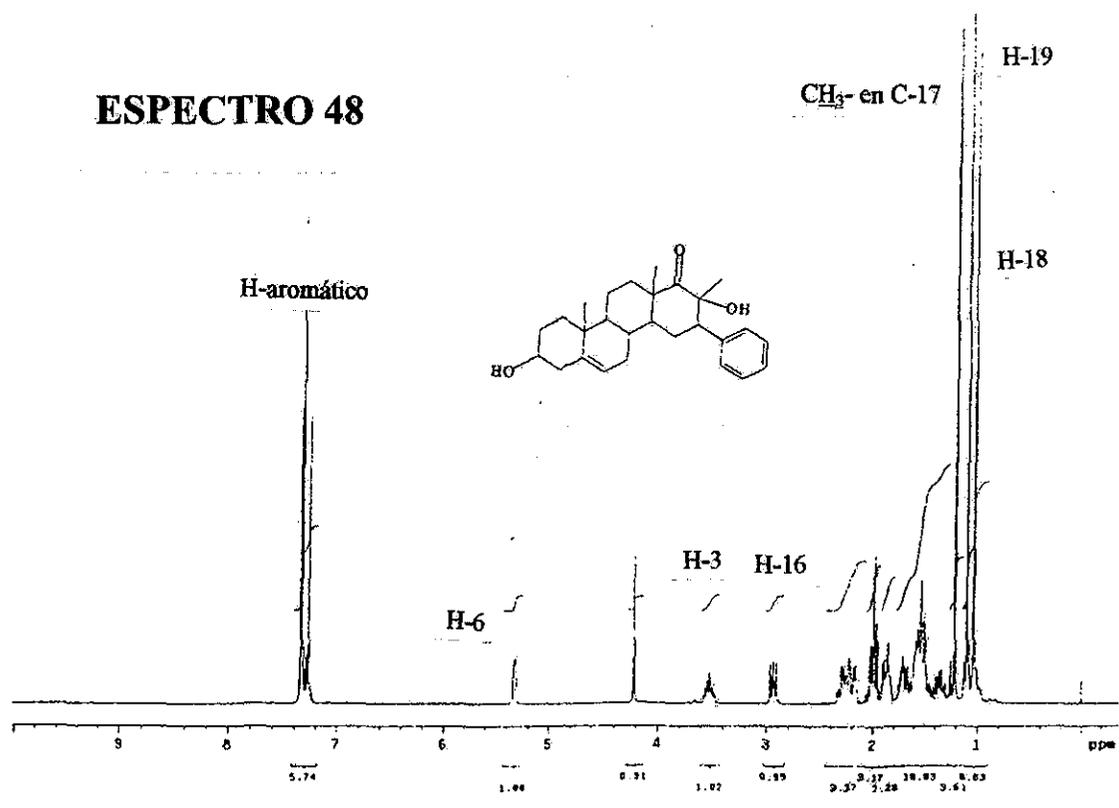
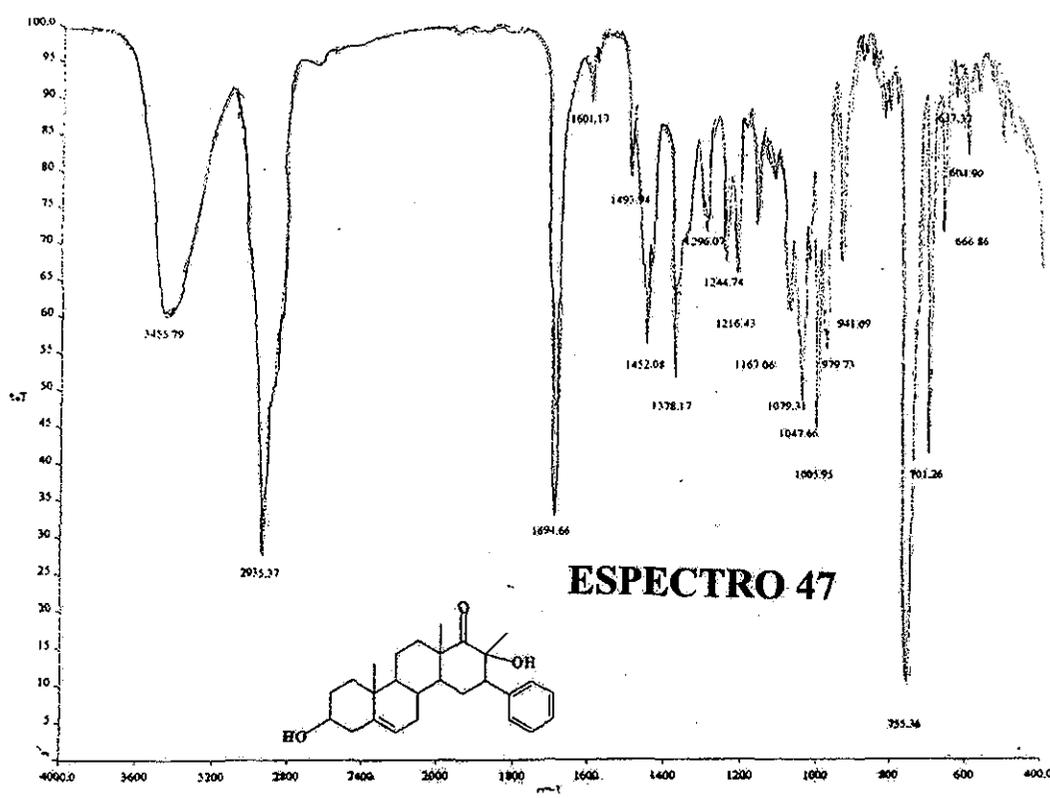
# ESPECTRO 44

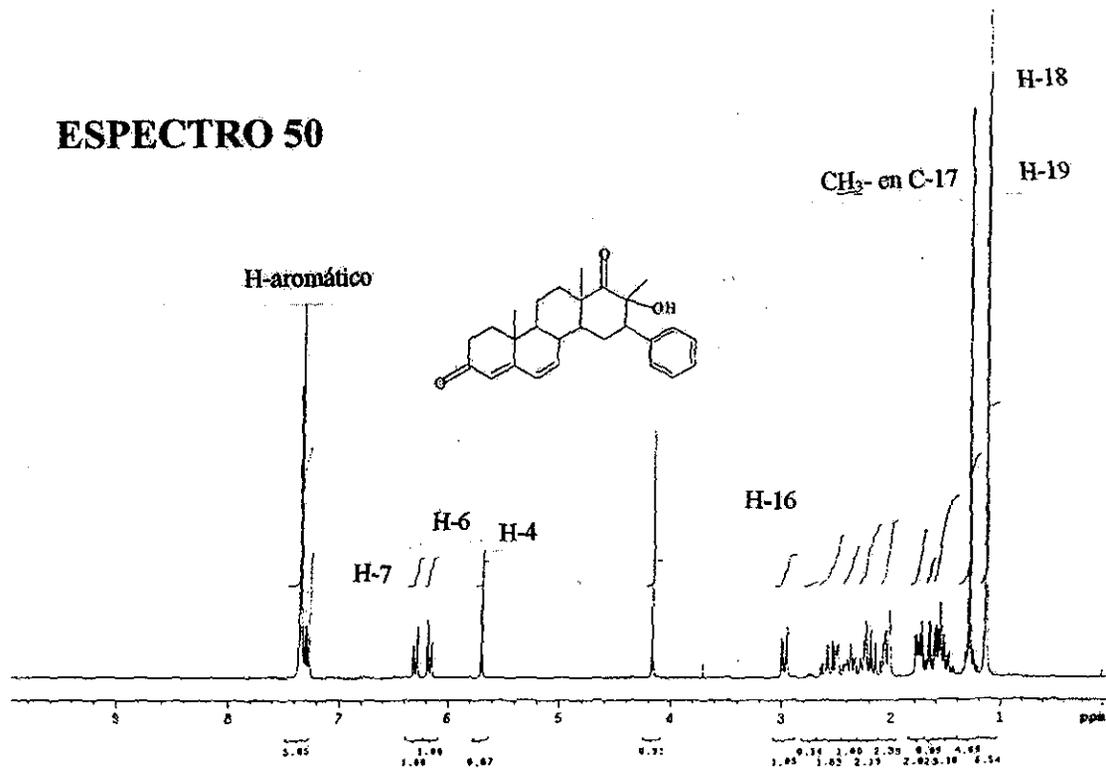
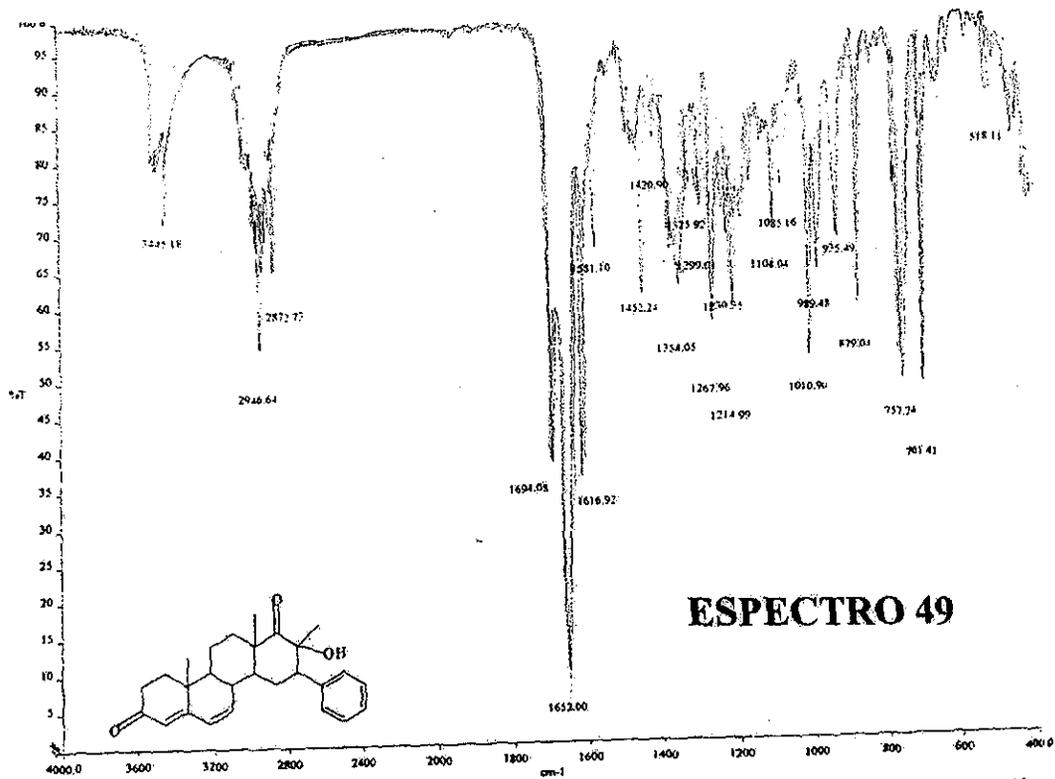


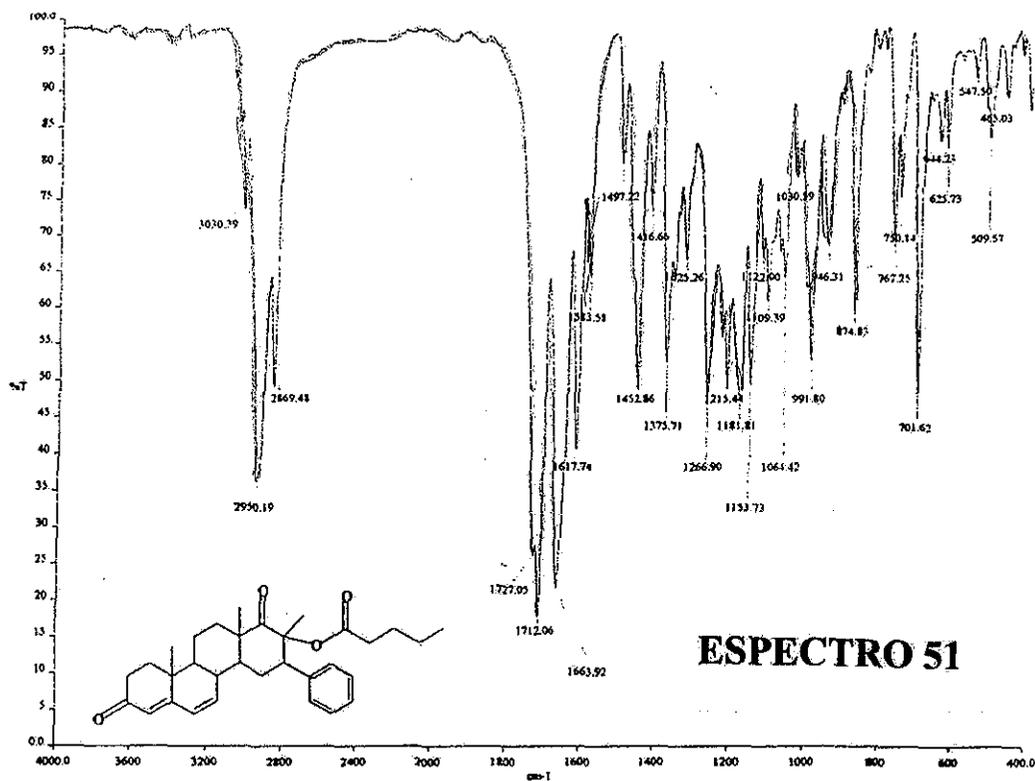


**ESPECTRO 46**

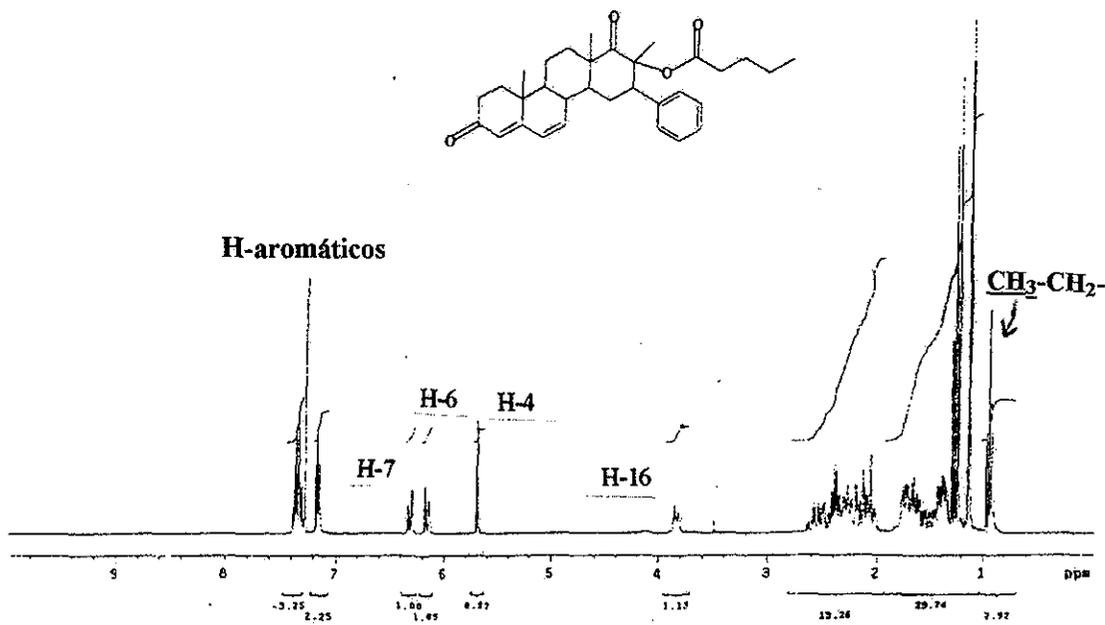




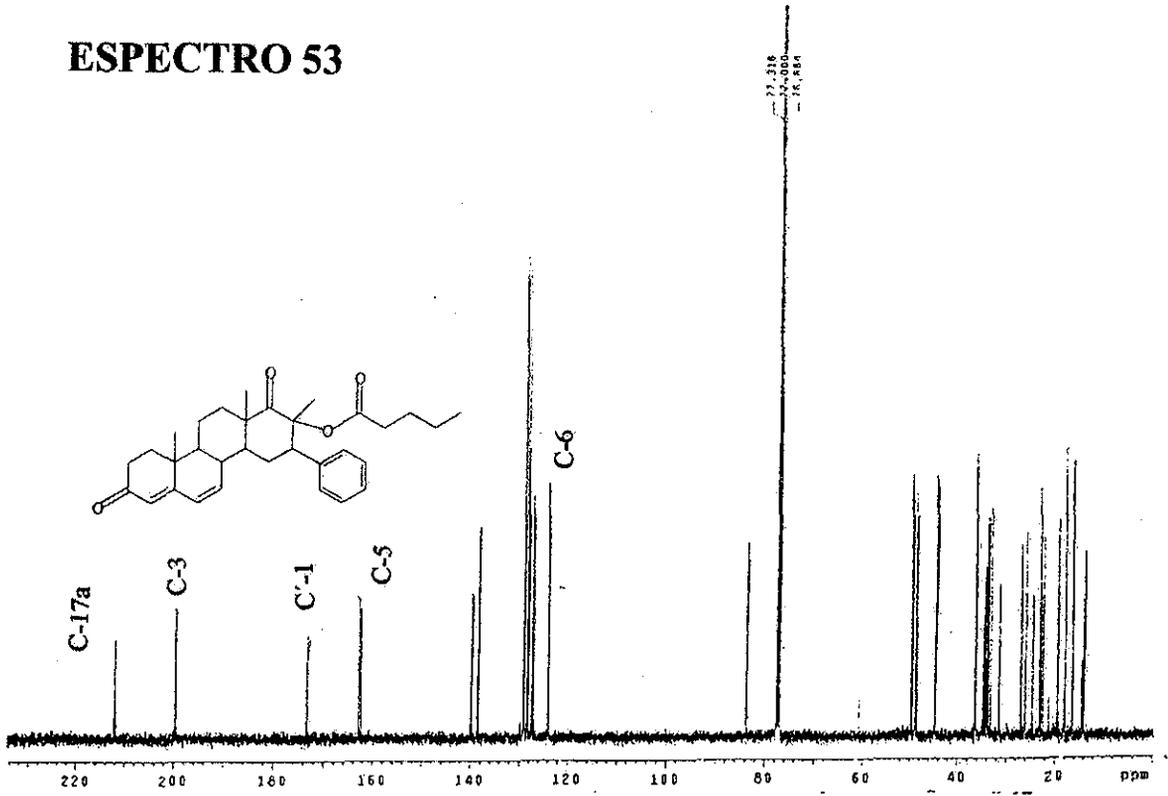




**ESPECTRO 52**



# ESPECTRO 53

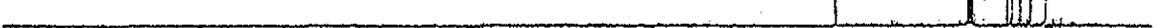


# ESPECTRO 54

CH<sub>2</sub> carbons



CH carbons

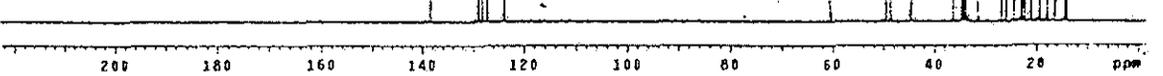


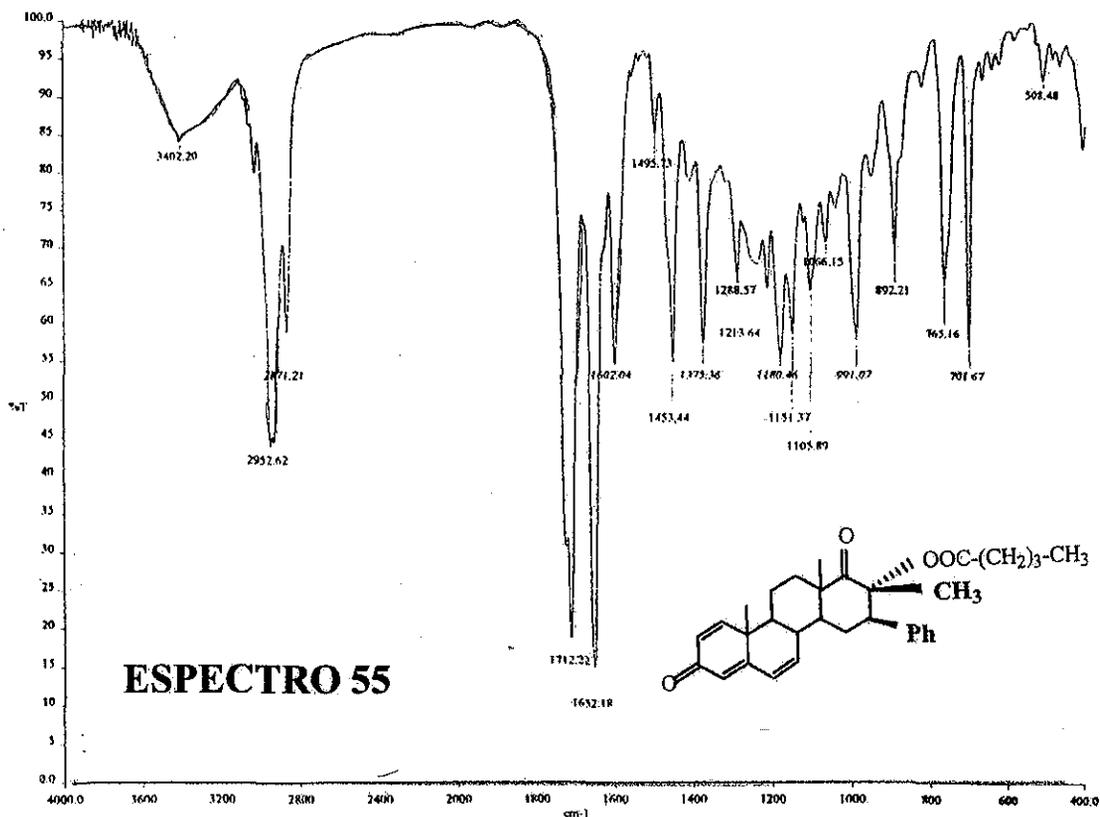
C-aromáticos



CH carbons

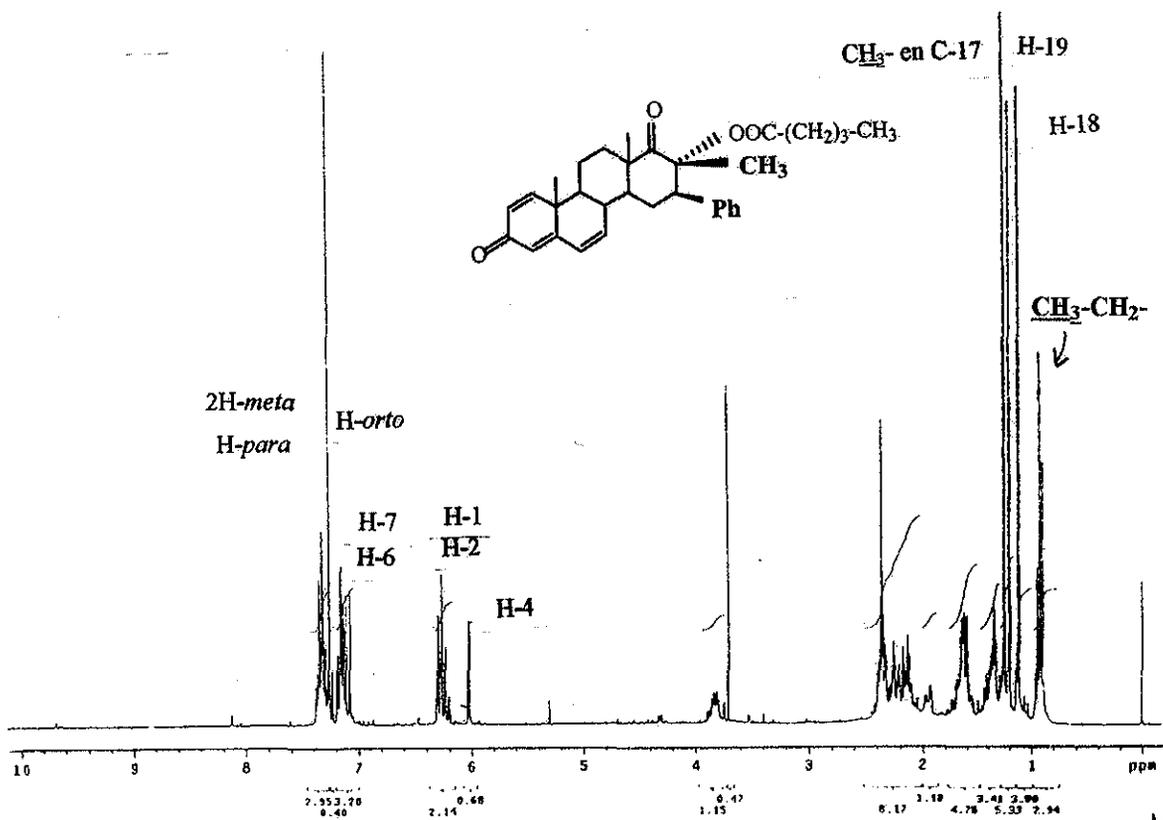
all protonated carbons



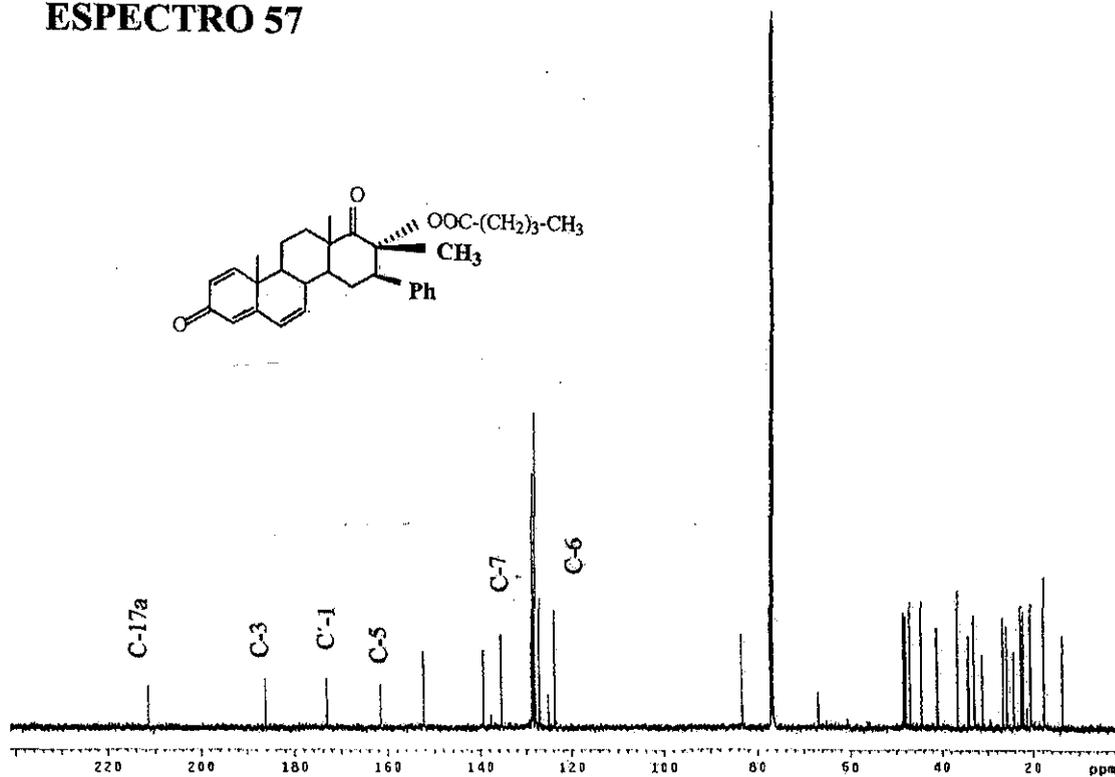


a:\spectra\7234.sp

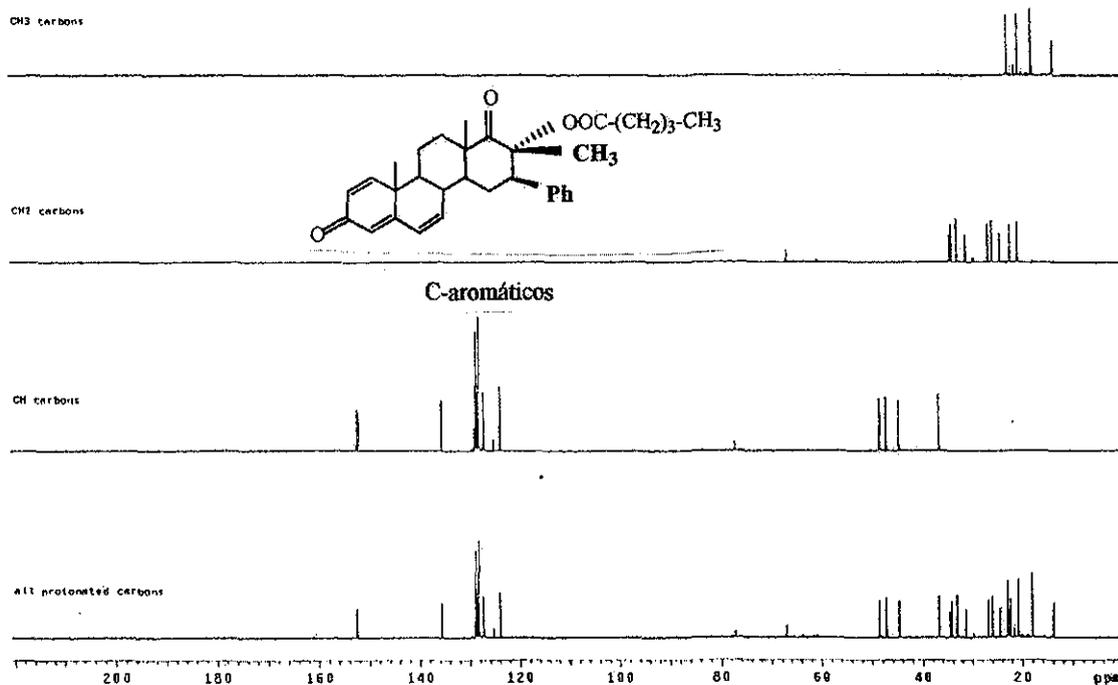
**ESPECTRO 56**

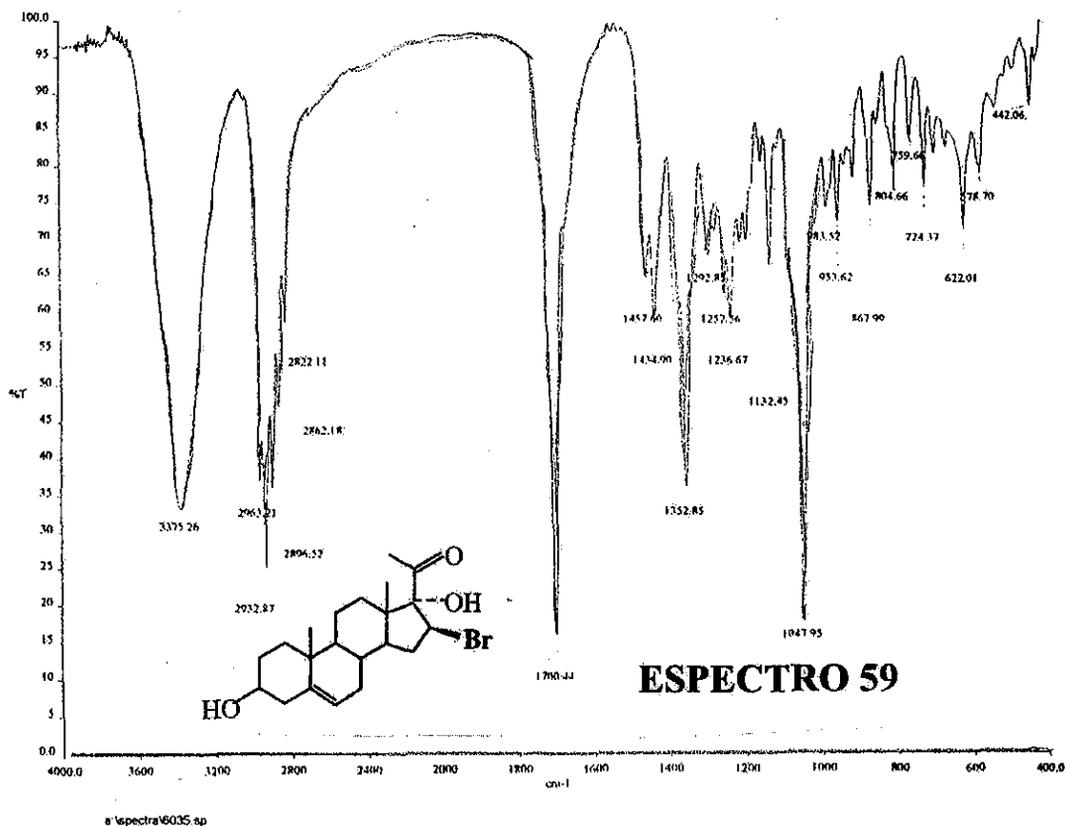


# ESPECTRO 57



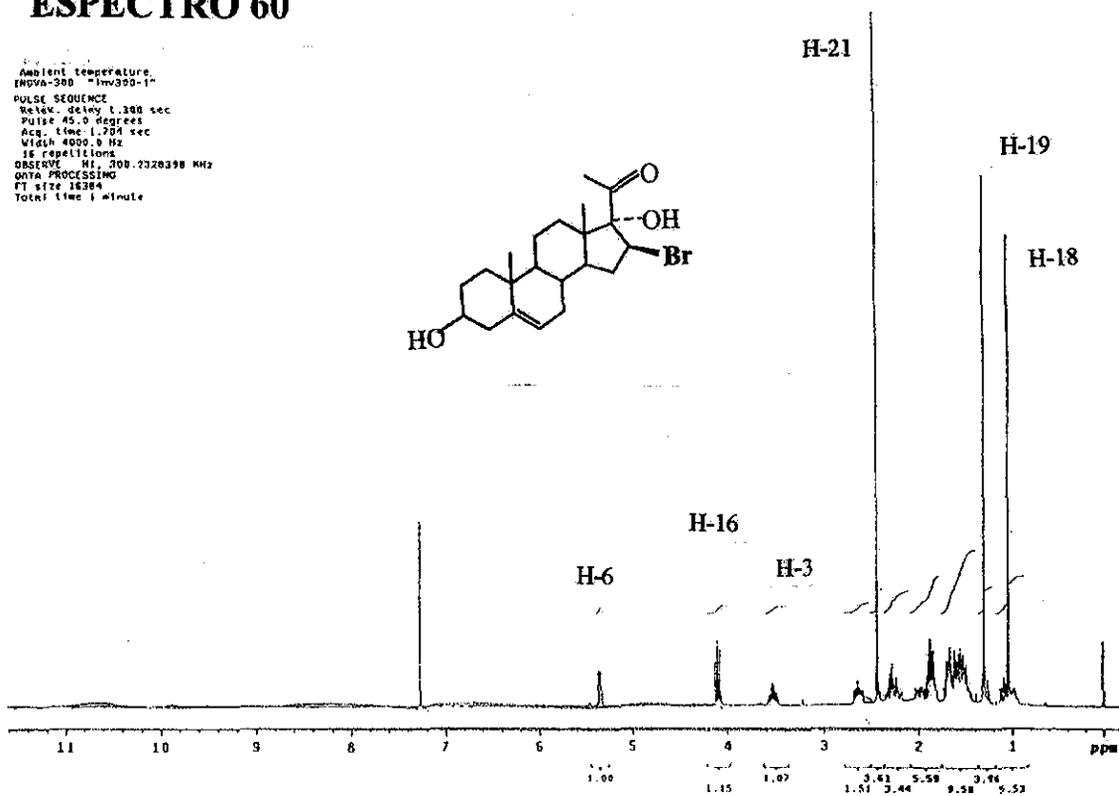
# ESPECTRO 58



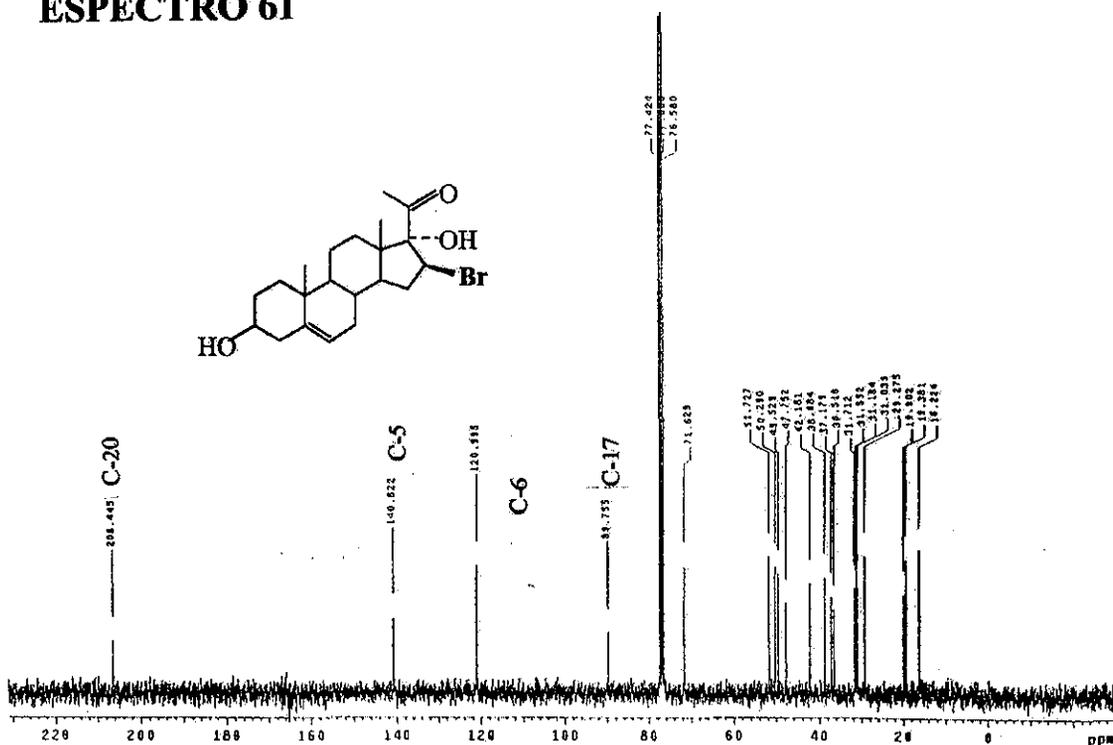


## ESPECTRO 60

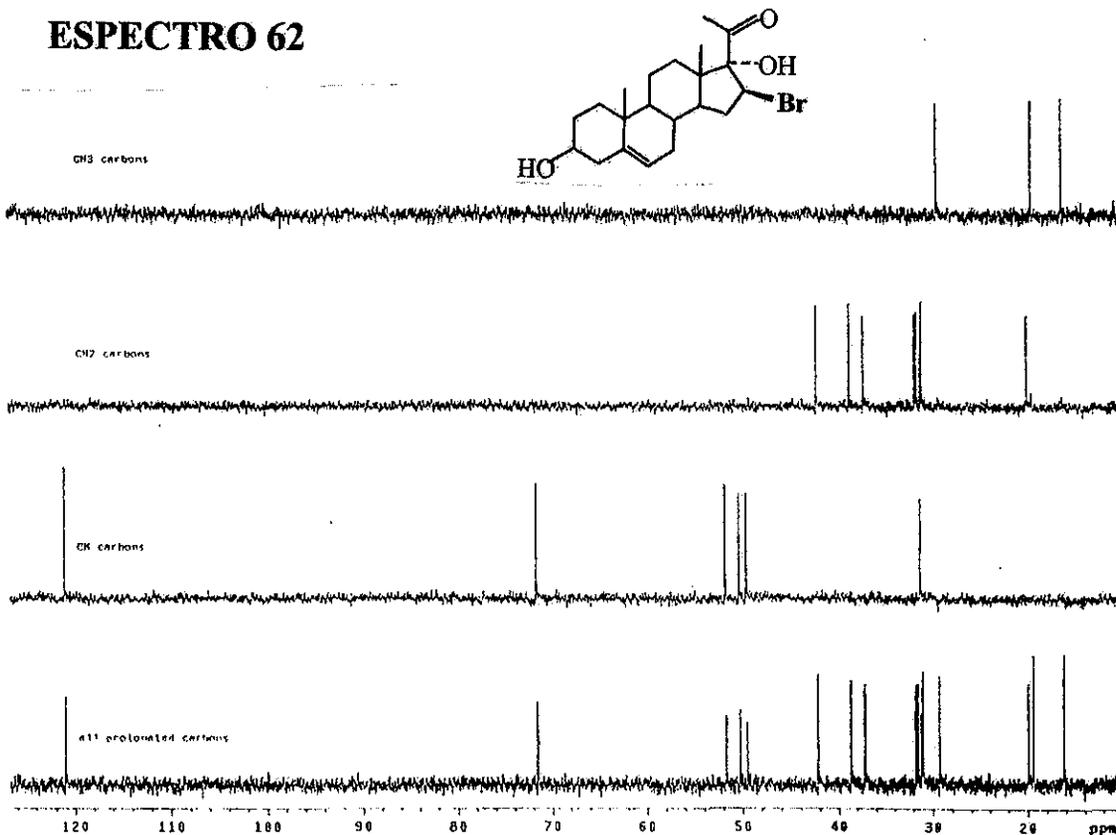
Ambient temperature  
 PPMVA-300 "hw350-1"  
 PULSE SEQUENCE  
 Retav. delay 1.300 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.200 sec  
 Width 4000.0 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE H1, 200.2320398 MHz  
 ORTA PROCESSING  
 FT size 16384  
 Total time 1 minute

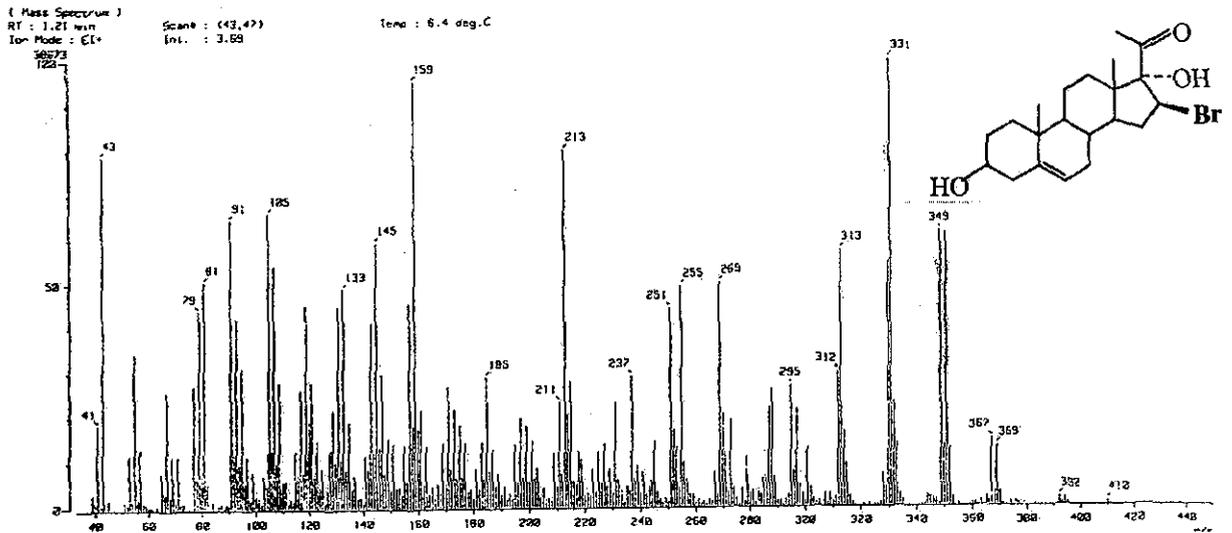


# ESPECTRO 61

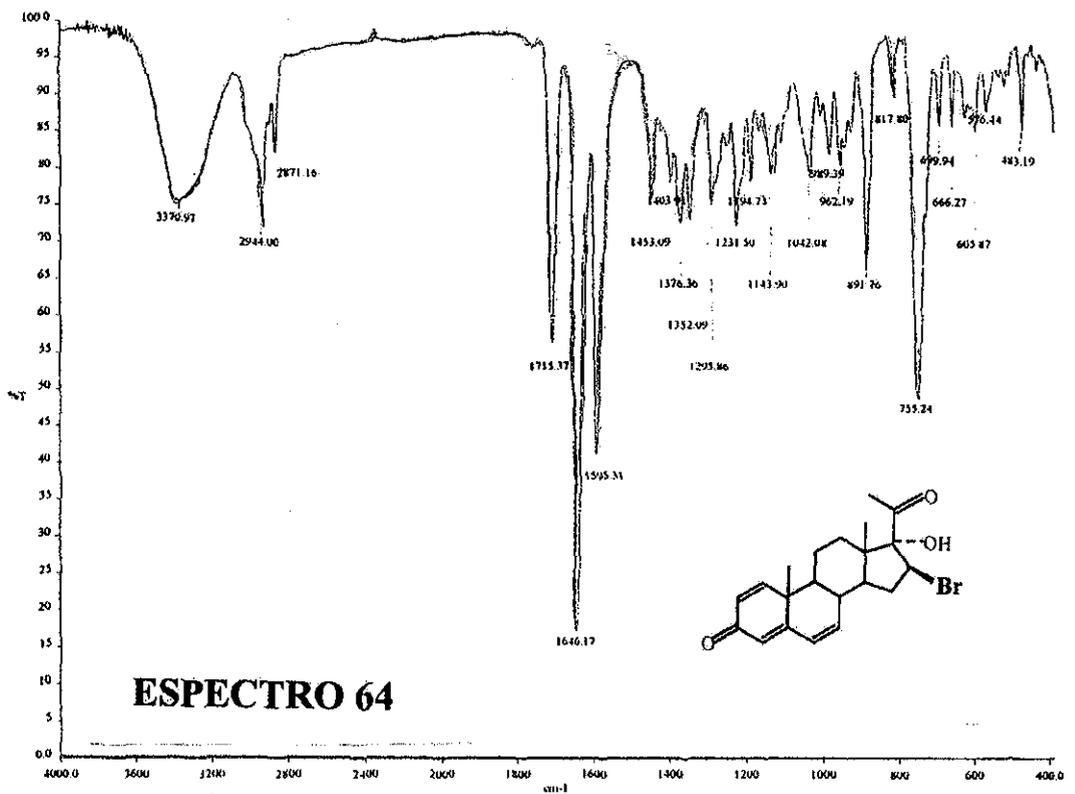


# ESPECTRO 62





**ESPECTRO 63**

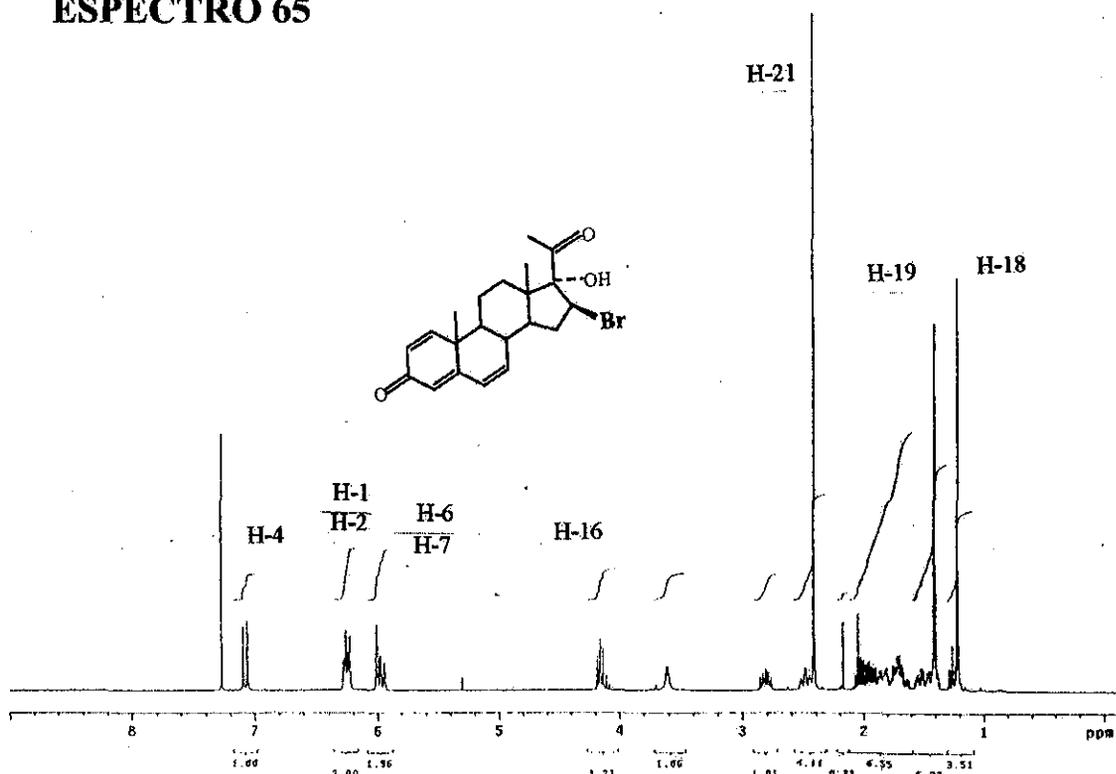


**ESPECTRO 64**

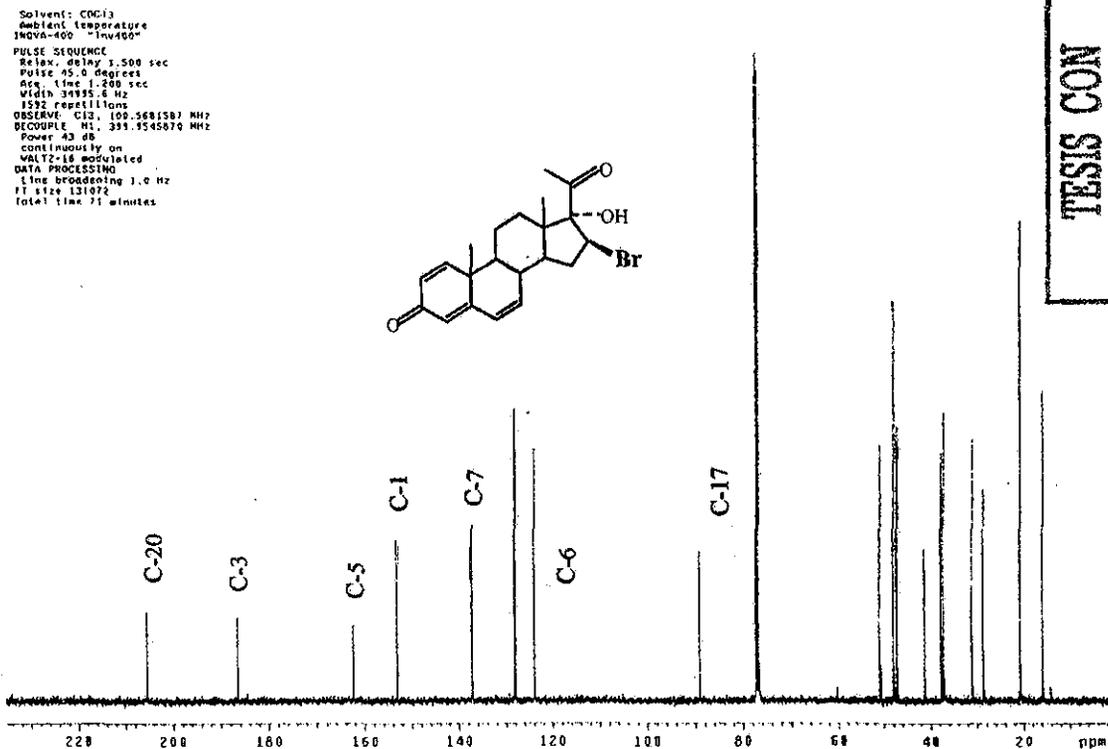
...a:\espectra\6772.sp

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

# ESPECTRO 65



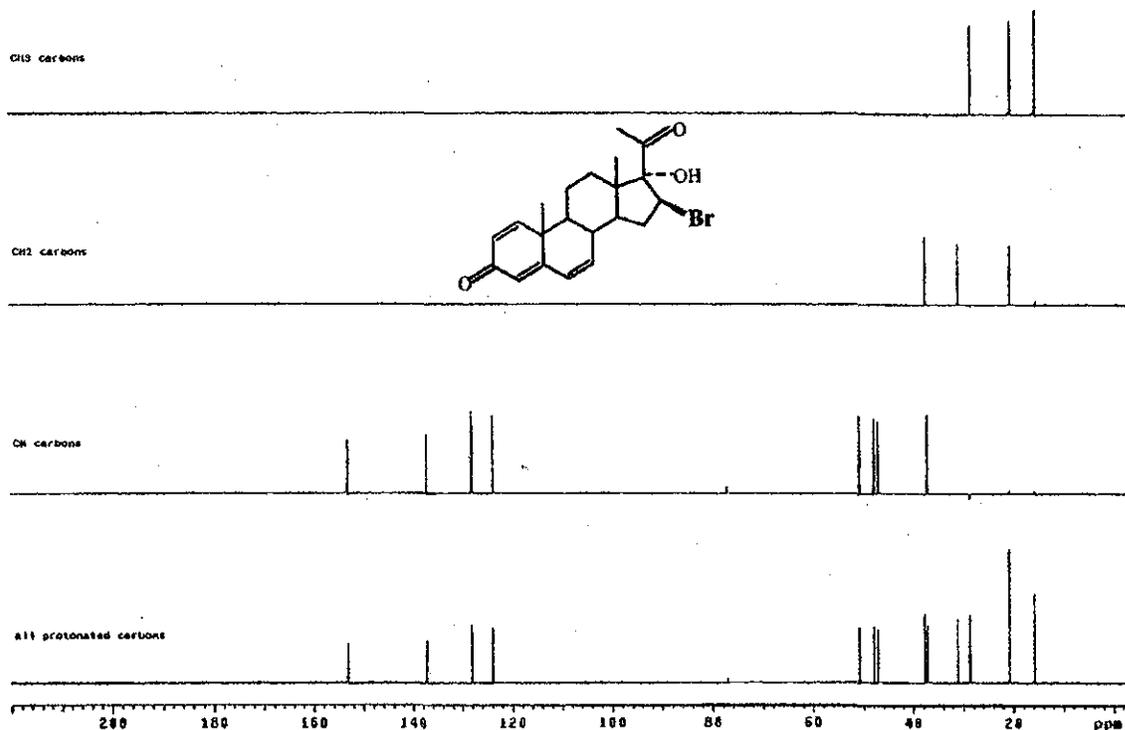
# ESPECTRO 66



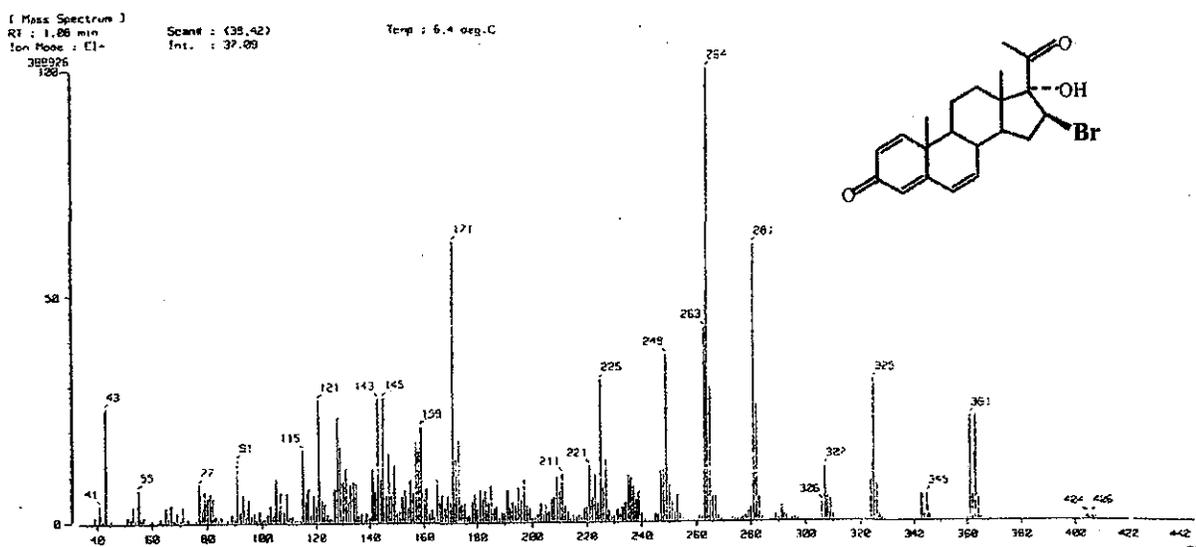
Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
 Ambient temperature  
 INOVA-400 "Inv400"  
 PULSE SEQUENCE  
 Relax. delay 3.500 sec  
 Pulse: 45.0 degrees  
 Acq. time 1.200 sec  
 Width 39935.4 Hz  
 1592 repetitions  
 OBSERVE: C13, (100.628158) MHz  
 DECOUPLE: H1, 399.9545070 MHz  
 Power: 43 dB  
 continuously on  
 VOLTAGE modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FI size 131072  
 Total time 71 minutes

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

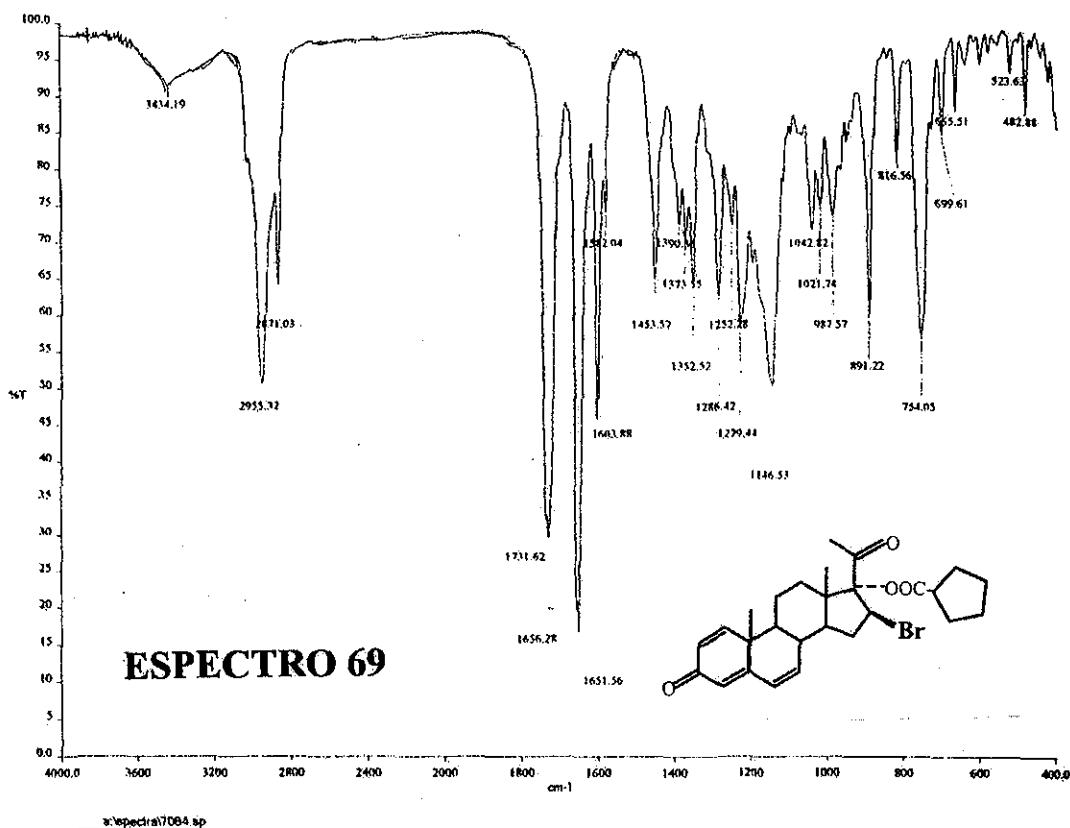
# ESPECTRO 67



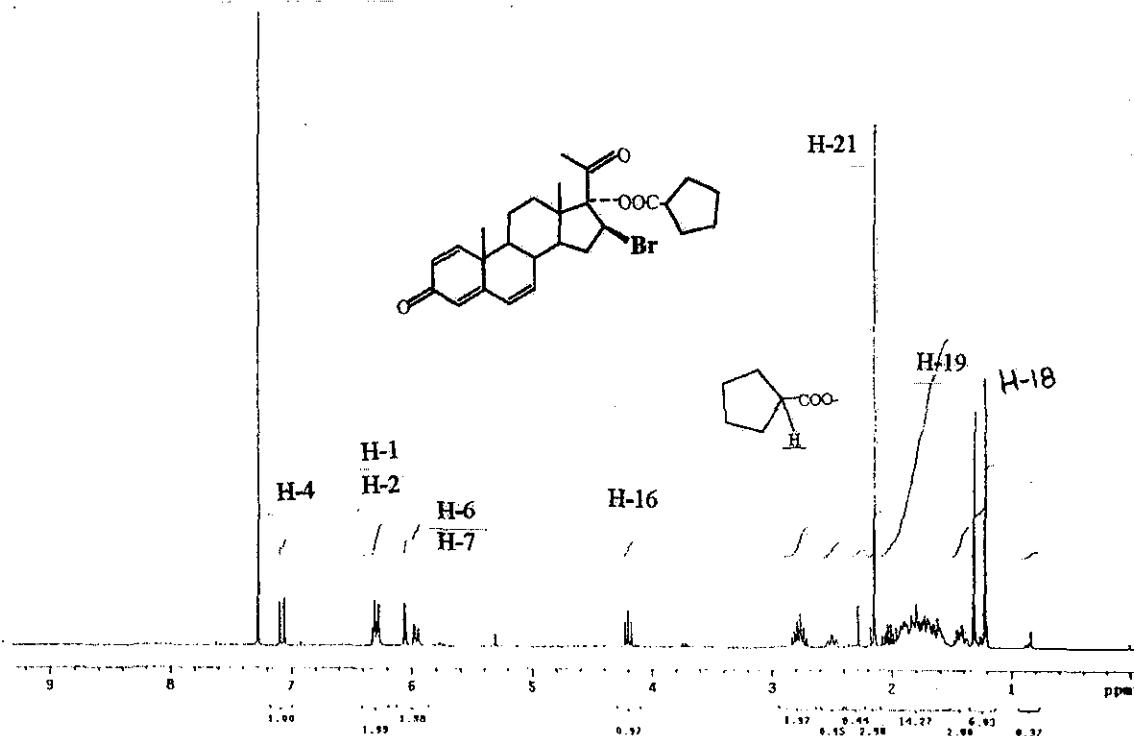
# ESPECTRO 68



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

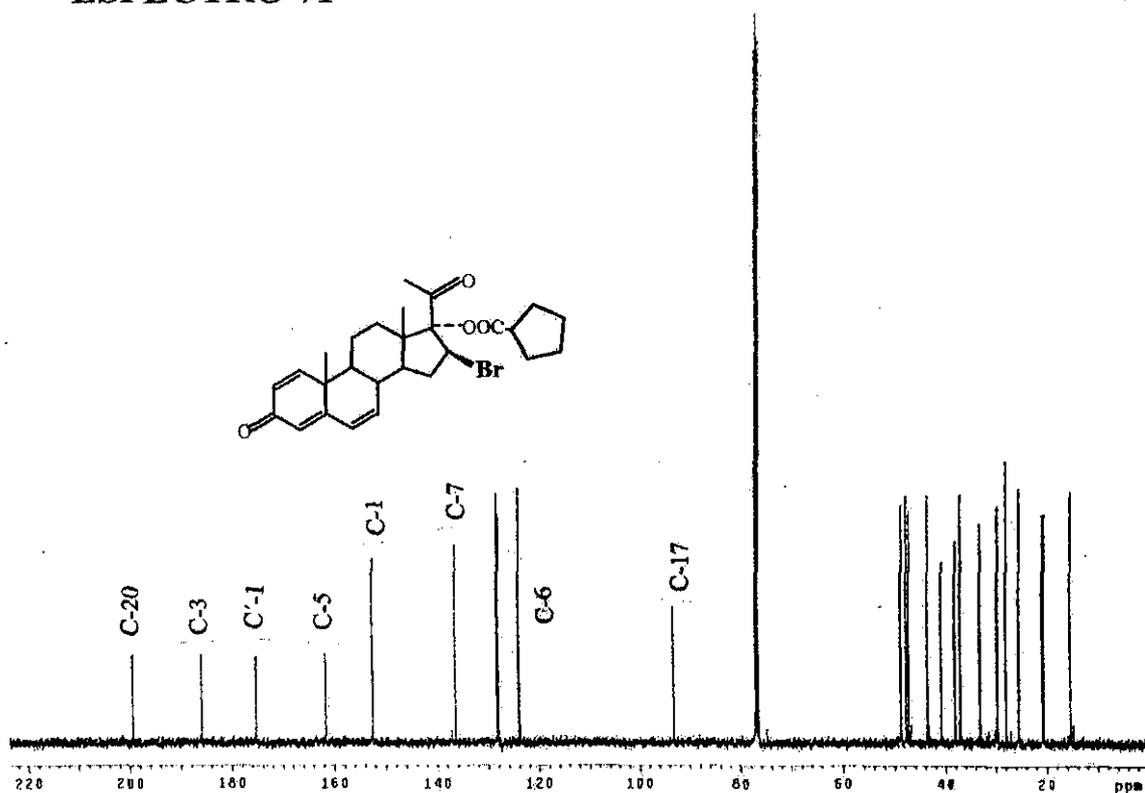


**ESPECTRO 70**

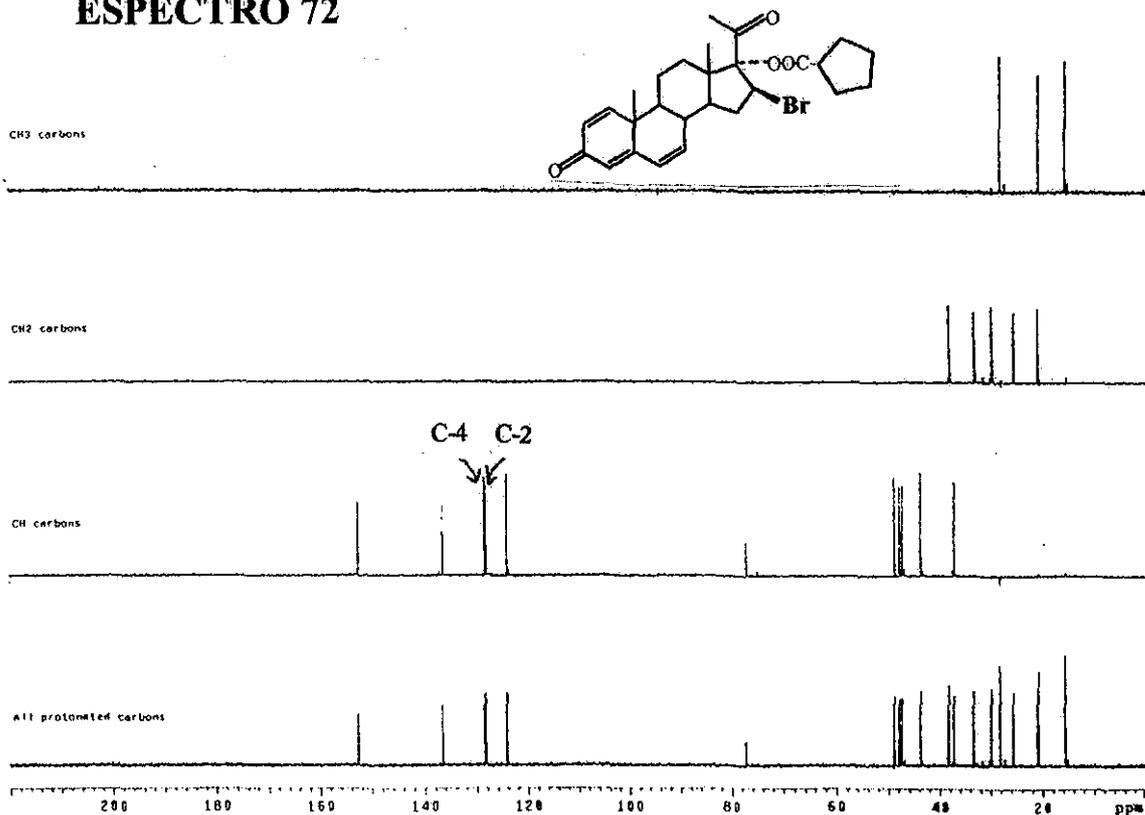


TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# ESPECTRO 71



# ESPECTRO 72



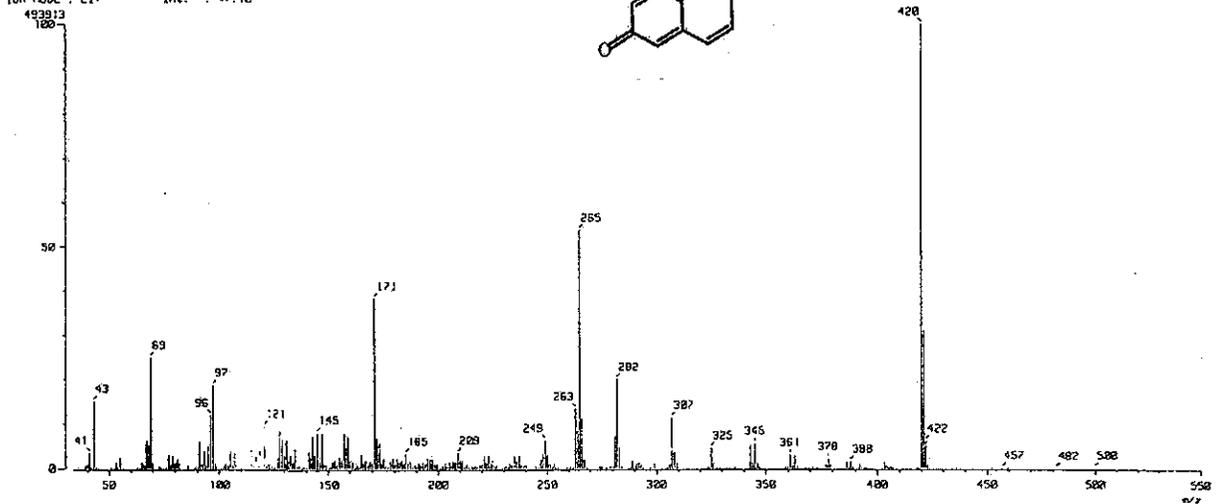
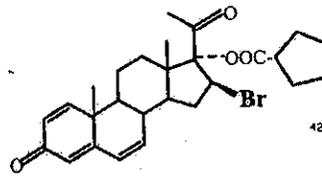
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ESPECTRO 73

( Mass Spectrum )  
RT : 1.00 min  
Ion Mode : EI+

Scan# : (35, 48)  
Int. : 47.12

Temp : 5.4 deg.C



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Synthesis and Pharmacological Evaluation of New 16-Methyl Pregnane Derivatives

Elena RAMIREZ,<sup>a</sup> Marisa CABEZA,<sup>b</sup> Ivonne HEUZE,<sup>b</sup> Edgar GUTIÉRREZ,<sup>b</sup> Eugene BRATOEFF,\*<sup>a</sup> Marisol MEMBRILLO,<sup>a</sup> and Alfonso LIRA<sup>a</sup>

Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry<sup>a</sup> UNAM, Ciudad Universitaria 04510 Mexico D.F. Mexico and Department of Biological Systems and Animal Production Metropolitan University<sup>b</sup> Mexico D.F. Mexico

Received June 4, 2001; accepted August 20, 2001

The pharmacological activity of several new pregnane derivatives 15–19 were determined on gonadectomized male hamster flank organs, seminal vesicles and *in vitro* conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT) as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors. Steroids 15–19 decreased the diameter of the pigmented spot in the flank organs as compared to the T treated animals; in this model, steroids 16 and 19 showed a higher activity than the commercially available finasteride 3. Injection of T increased the weight of the seminal vesicles. Compounds 15–19 when injected together with T decreased the weight of the seminal vesicles thus showing an antiandrogenic effect. The trienone 19 exhibited a considerably higher activity than finasteride. Steroids 15–19 inhibited the *in vitro* metabolism of [<sup>3</sup>H]T to [<sup>3</sup>H]DHT in seminal vesicles homogenates of gonadectomized male hamsters. Compounds 18 and 19 showed a much higher antiandrogenic effect than finasteride. This enhancement of the biological activity could probably be attributed to the coplanarity of the steroidal skeleton as previously observed by our group. The high antiandrogenic activity of the epoxy compound 16 is probably the result of the ring opening of the oxiran ring with the nucleophilic part of the enzyme 5 $\alpha$ -reductase thus leading to a stable adduct with concomitant deactivation of this enzyme.

**Key words** flank organ; seminal vesicle; 5 $\alpha$ -reduction; testosterone conversion; C-16 substituent

The androgen metabolism of human prostate is regulated by a variety of androgen metabolizing enzymes.<sup>1</sup> Among those, the 5 $\alpha$ -reductase enzyme possesses the highest potential activity.<sup>2</sup> It converts testosterone (T) **1** (Fig. 1) into the more potent androgen dihydrotestosterone (DHT) **2**.<sup>3</sup> Thus 5 $\alpha$ -reductase dictates the cellular availability of DHT and consequently the androgen responsiveness of the human prostate. As a result of this, several new clinically useful inhibitors for the treatment of benign prostatic hyperplasia and male pattern baldness were developed shortly after the discovery of the enzyme 5 $\alpha$ -reductase.

Recently several new inhibitors of 5 $\alpha$ -reductase were described as potential clinical candidates for the treatment of benign prostatic hyperplasia. These compounds (Fig. 1) include finasteride **3**,<sup>4,5</sup> epristeride **4**,<sup>6</sup> cyproterone acetate **5**,<sup>7</sup> BOMT **6**<sup>8</sup> and FCE 282607 **7**.<sup>9</sup> Finasteride **3** inhibits the conversion of T **1** to DHT **2** in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia.<sup>10</sup> This steroid has a greater affinity for 5 $\alpha$ -reductase type 2 than for the type 1 enzyme,<sup>11</sup> both present in the human prostate.<sup>12</sup> The type 2 isozyme, is the dominant form in genital tissue, however, the exact physiological roles of these enzymes has yet to be fully elucidated.

In this study we evaluated the following new steroidal compounds as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors: 15–19 (Figs 2, 3). The pharmacological evaluation was determined in flank organs, seminal vesicles and the effect of the new steroidal compounds on the *in vitro* metabolism of [<sup>3</sup>H]T to [<sup>3</sup>H]DHT in seminal vesicle homogenates of gonadectomized male hamsters.<sup>13</sup>

Flank organs are pilosebaceous structures androgen dependent. In males, these glands measure 8 mm and shrink upon castration,<sup>13,14</sup> until they look as those of females; however daily injections of **1** or **2** restores their original size.<sup>13–16</sup> The presence of 5 $\alpha$ -reductase in flank organs as well the in-

hibition of this enzyme by finasteride has been demonstrated several years ago.<sup>13,16–18</sup> Many steroidal and non steroidal compounds have been evaluated as antiandrogens using the flank organs as a model.<sup>16</sup>

Seminal vesicles are male accessory glands that are also androgen dependent. These organs are capable of reducing **1** to **2** in both intact and gonadectomized animals and have also been used for evaluation of steroidal and non-steroidal compounds as antiandrogens.<sup>13,17</sup>

### Chemistry

**Synthesis of Steroids 15–19** Steroids 15–19 were prepared from the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate **8**. Epoxidation of the double bond at C-16 in **8** with hydrogen peroxide and sodium hydroxide afforded the epoxy derivative **9** (Fig. 2). Acetylation of **9** in the usual manner yielded the acetoxy compound **10**. The protection of the carbonyl group in **10** was effected with ethylene glycol, trimethyl orthoformate and *p*-toluenesulfonic acid (PTS). The resulting dioxolane derivative **11** was allowed to reflux with methylmagnesium chloride in tetrahydrofuran (THF); this reaction afforded the 16-methyl substituted dioxolane derivative **12** (Fig. 2). Hydrolysis of the dioxolane ring in **12** to recover the carbonyl moiety was carried out with PTS in acetone thus forming the carbonyl derivative **13**. The oxidation of the hydroxyl group at C-3 in **13** was effected with lithium carbonate, lithium bromide and bromine in *N,N*-dimethylformamide (DMF) thus affording the 4,6-diene-3,20-dione moiety **14**. Esterification of the hydroxyl group in **14** with trifluoroacetic anhydride and valeric acid yielded the desired valeroyloxy derivative **15**.

Treatment of **13** with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) in dioxan (Fig. 3) afforded the triene-dione compound **18**, which upon esterification with valeric acid yielded the ester **19**.

\* To whom correspondence should be addressed e-mail: eugene@servidor.unam.mx

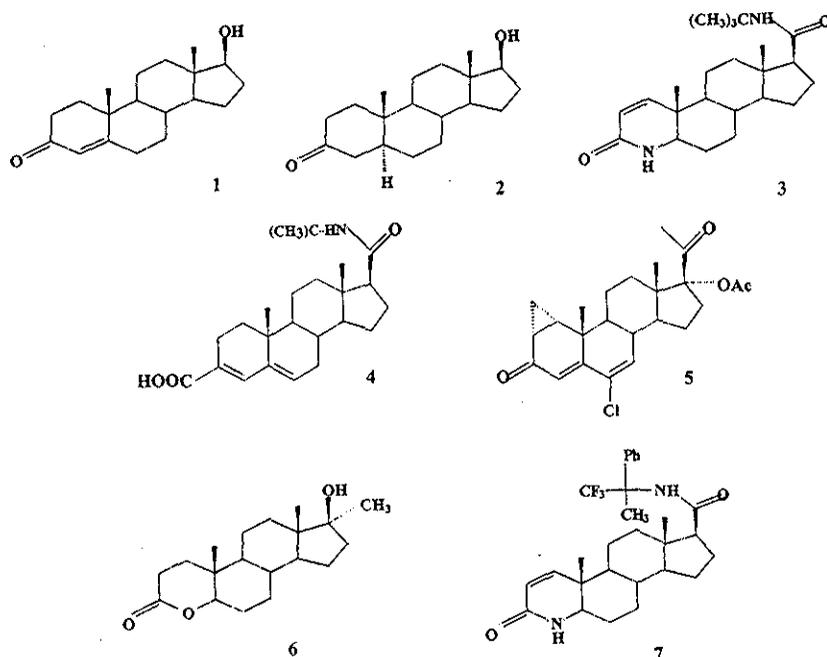


Fig 1 Steroids Structures

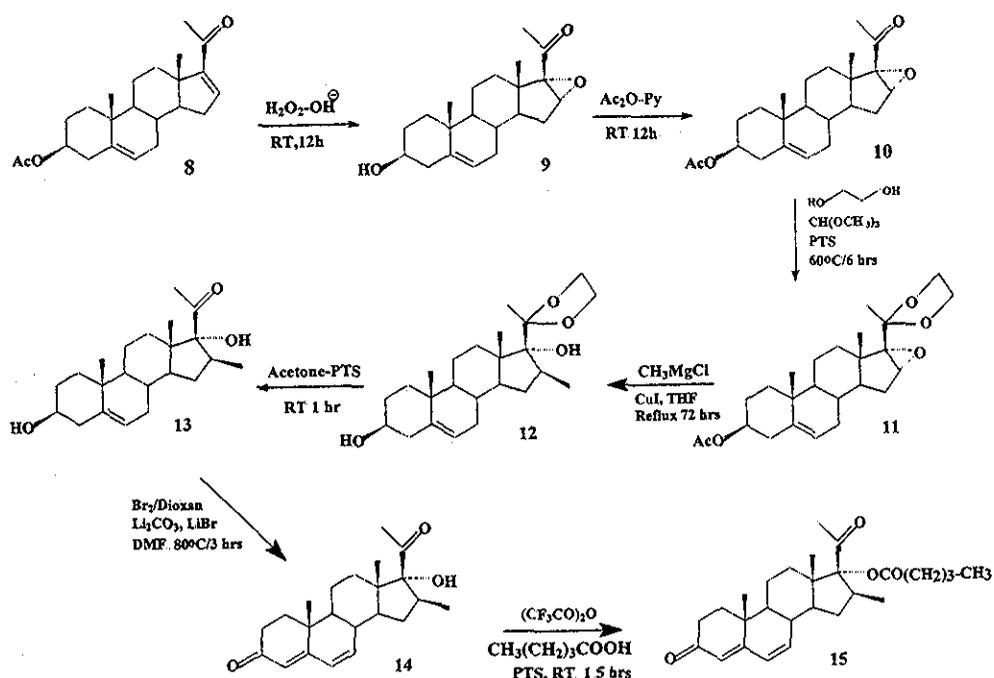


Fig 2 Synthesis of New Steroids

The epoxidation of the double bond at C-6 in 15 (Fig. 3) was carried out with *m*-chloroperbenzoic acid in chloroform. The resulting epoxy compound 16 was treated with hydrobromic acid in acetic acid to give the desired 6-bromo derivative 17.

#### Biological Activity

The biological activity of steroids 15—19 was determined in gonadectomized male hamsters divided in several groups. The animals in the control group were injected with the vehicle (sesame oil); in the other groups the hamsters were treated with 1<sup>(17)</sup> a combination of I with finasteride 3 or I with the new steroids. After 6 d of treatment, the animals

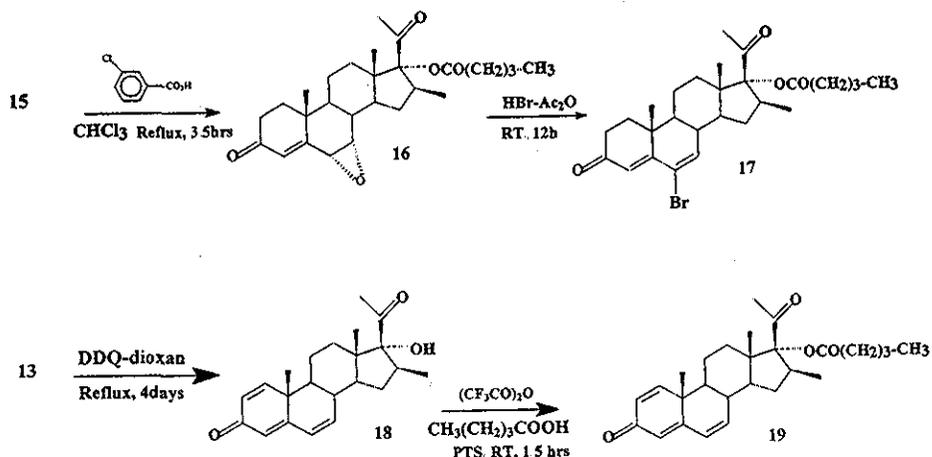


Fig 3. Synthesis of New Steroids

Table 1 The Diameter of Flank Organs and the Weight of Seminal Vesicles Were Measured from Animals That Received sc Treatments of C-16 Substituted Steroids

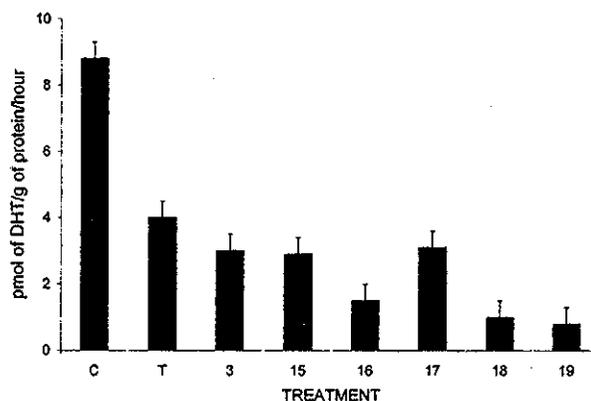
	Treatment (mg)	Diameter of the pigmented spot (mm)	Weight of seminal vesicles (mg)
Control		2.75 ± 0.05	177.45 ± 30.7
T	0.2	4.25 ± 0.50	317.83 ± 30.1
T+3	0.2	3.00 ± 0.02	216.00 ± 27.8
T+15	0.2	3.00 ± 0.00	265.15 ± 30.4
T+16	0.2	2.00 ± 0.00	208.75 ± 24.5
T+17	0.2	3.00 ± 0.50	246.00 ± 49.1
T+18	0.2	3.00 ± 0.50	231.25 ± 35.2
T+19	0.2	1.80 ± 0.50	202.00 ± 30.1

The results are given mean ± standard deviation

were anesthetized with ether and sacrificed.

**Flank Organs** The diameter of the pigmented spot on the flank organs of the control animals (vehicle treated), T, 1, finasteride 3 and with the new steroids treated animals is shown in Table 1. T significantly increased ( $p < 0.05$ ) the diameter of the pigmented spot (4.25 mm) whereas finasteride decreased it ( $p < 0.005$ ) (3 mm). The new steroids 15–19 decreased the diameter of the pigmented spot as compared to T, thus suggesting an inhibitory effect on the enzyme  $5\alpha$ -reductase and also the presence of an antiandrogenic effect. The most effective compound in this model was steroid 19 which reduced the diameter of the pigmented spot on the flank organs to 1.8 mm.

**Seminal Vesicles** After castration, the weight of the seminal vesicles of the male hamsters significantly decreased ( $p < 0.05$ ) as compared to that of the normal glands. Treatment with vehicle alone (control) did not change this condition whereas subcutaneous injection of 200  $\mu$ g of 1 for 6 d significantly increased ( $p < 0.05$ ) the weight of the seminal vesicles in castrated male hamsters (317 mg) (Table 1). When 1 and finasteride 3 were injected together, the weight of the seminal vesicles decreased (216 mg). The injection of steroids 15–19 together with T decreased ( $p < 0.005$ ) the weight of the seminal vesicles as compared to the T treated hamsters thus suggesting an inhibitory effect on  $5\alpha$ -reductase enzyme type

Fig. 4. Effect of Different Synthetic Steroids on *in Vitro* Conversion of  $[^3\text{H}]\text{I}$  to  $[^3\text{H}]\text{DHT}$  in Castrated Male Hamster Flank Organs

2. The most effective compound showing the highest inhibitory effect for  $5\alpha$ -reductase enzyme was steroid 19 having the lowest value of the weight of the seminal vesicles (202 mg).<sup>18,19</sup> In the flank organs, both types of  $5\alpha$ -reductase enzyme are present, however the type 1 enzyme predominates. On the other hand, in the seminal vesicles the predominant enzyme is type 2 and therefore it is not possible to compare rigorously both experiments.

**Conversion of T to DHT** Since the weight of the seminal vesicles depends on the  $5\alpha$ -reduced androgens,<sup>19</sup> it was important to determine the effect of the new steroids 15–19 on the conversion of 1 to 2 *in vitro* metabolism of  $[^3\text{H}]\text{I}$  to  $[^3\text{H}]\text{DHT}$  in seminal vesicles homogenates of castrated male hamsters.

The extracts from castrated male hamster seminal vesicles were subjected to TLC analysis. The zone corresponding to the 2 standard ( $R_f$  value 0.34) of each experimental chromatogram was eluted and the radioactivity determined. The results obtained from two separate experiments, performed in duplicate (Fig 4) demonstrated a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the conversion of  $[^3\text{H}]\text{I}$  to  $[^3\text{H}]\text{DHT}$  in the T plus finasteride 3-treated animals expressed as pmol of DHT/g of protein/h, thus indicating that finasteride 3 is a

good inhibitor for the conversion of T 1 to DHT 2 at pH 6

The effect of different steroidal structures on the rate of DHT formation is given in Fig. 4. Compounds 15 and 17 showed a higher *in vitro* conversion of 1 to 2 ( $p < 0.05$ ) than the other steroids. On the other hand, compounds 16, 18 and 19 exhibited a lower DHT conversion than the 1 plus finasteride 3 treated animals thus showing a high  $5\alpha$ -reductase inhibitory activity.

### Discussion

This study reports the  $5\alpha$ -reductase inhibitory effect of  $16\beta$ -methyl substituted-4,6-pregnadiene-3,20-dione derivative 15, a 6,7-epoxy- $16\beta$ -methyl substituted 4-ene-3,20-dione derivative 16, a 6-bromo- $16\beta$ -methyl- $17\alpha$ -valeroyloxy-pregnadiene-3,20-dione compound 17 and the triene-dienone derivatives 18 and 19.

As can be seen in Table 1 (diameter of the pigmented spot on the flank organs), finasteride decreases the diameter of the spot (3 mm) and thus shows a high inhibitory effect for the enzyme  $5\alpha$ -reductase type 2, a fact previously reported by other authors.<sup>18</sup> Furthermore, this compound has also been shown to inhibit hair loss and improves hair growth.<sup>19,20</sup> These results could be related to the presence of  $5\alpha$ -reductase enzyme type 2 in the hair follicles as previously reported.<sup>21</sup> Compounds 15—19 decreased also the diameter of the pigmented spot, and this fact indicates that these compounds are also efficient inhibitors for the  $5\alpha$ -reductase enzyme present in the flank organs. The triene-dione ester 19 exhibited the highest activity probably due to the presence of the 3 double bonds and the C-17 ester group.

Table 1 also shows the  $5\alpha$ -reductase inhibitory effect of steroids 15—19 related to the weight of the seminal vesicles of castrated male hamsters treated with 1 and a combination of 1 with finasteride 3. These data clearly indicate that compounds 15—19 decreased the weight of the seminal vesicles as compared to the T treated hamsters, thus showing an antiandrogenic effect; steroids 16, 18 and 19 exhibited the highest activity. The high antiandrogenic effect of 16, 18 and 19 could also involve inhibition of the synthesis and/or release of pituitary gonadotropins.<sup>22</sup>

Figure 4 shows the conversion of [ $^3$ H]T to [ $^3$ H]DHT expressed as pmoles of protein per hour. In the control animals (C) (vehicle treated), the weight of the seminal vesicles decreased after 15 d of castration thus showing the effect of orchidectomy.

As can be seen from Fig. 4, the trienones 18 and 19 and the epoxy compounds 16 showed a higher antiandrogenic effect than the corresponding dienones 14 and 15.<sup>13,23–25</sup> Several years ago, we carried out a theoretical computer assisted study<sup>26</sup> with similar compounds. The results from this study indicated that the first step in the inhibition of the enzyme  $5\alpha$ -reductase consists in the formation of an enzyme-antiandrogen activated complex. In a subsequent step, the nucleophilic portion of the enzyme (amino group) attacks the conjugated double bond of the steroid in a Michael type addition reaction to form an irreversible adduct. This explains very well the higher biological activity of the trienones 18 and 19 as compared to the dienones 14 and 15. The trienones having a more coplanar structure react faster with the nucleophilic portion of the enzyme in a Michael type addition reaction than the dienones.

This hypothesis explains also the fact that  $17\alpha$ -acetoxy-6-methylenepregn-4-ene-3,20-dione has much higher antiandrogenic activity than the corresponding  $17\alpha$ -acetoxy-pregna-4,6-diene-3,20-dione, both compounds previously synthesized by Petrow.<sup>27</sup> The 6-methylene compound having an exocyclic double bond can react much easier with the nucleophilic part of the enzyme than the corresponding endocyclic 4,6-dienone.

In the case of the active compound 16, it is also possible that the nucleophilic portion of the enzyme reacts with the electrophilic carbon C-7 of the oxiran ring with a subsequent opening of the epoxy ring with the concomitant formation of a stable steroid-enzyme adduct. As a result of this, the enzyme  $5\alpha$ -reductase is inhibited; this reaction explains the high pharmacological activity of the epoxy compound 16.

At the present time, we are synthesizing several new exocyclic and endocyclic dienones and trienones with the purpose of clarifying this hypothesis. The intermediates 9—14 as well as starting material 8 showed a low pharmacological activity.

### Experimental

**Chemical and Radioactive Material** Solvent were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher John's melting point apparatus and are uncorrected.  $^1$ H- and  $^{13}$ C-NMR spectra were taken on Varian Gemini 200 and VRX-300 spectrometers respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me<sub>4</sub>Si ( $\delta = 0$ ) in CDCl<sub>3</sub>. The abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. High resolution mass spectra were recorded on a HP5985-B spectrometer. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer 549-B and the UV spectra on a Perkin Elmer 200s spectrometers. Finasteride was obtained from the commercially available Proscar. The tablets were crushed, extracted with chloroform and the solvent was eliminated in vacuum; the crude product was purified by silica gel column chromatography.

(1,2,6,7- $^3$ H) T ([ $^3$ H]T, specific activity: 95 Ci/mmol) was provided by New England Nuclear Co (Boston MA U.S.A.). Radioinert T and  $5\alpha$ -DHT were supplied by Steraloids (Wilton NH U.S.A.). Sigma Chemical Co supplied NADPH\*.

**Animals and Tissues** Adult male Syrian Golden hamsters (150–200 g) were obtained from the Metropolitan University-Xochimilco of Mexico. The animals were kept in a room with controlled temperature (22°C) and light-dark periods of 12 h. Food and water were provided *ad libitum*.

Gonadectomies were performed under light ether anesthesia 30 d before treatments. Animals were sacrificed by ether anesthesia. The seminal vesicles were immediately removed, blotted and weighed prior to their use. Tissues used in the metabolic experiment were homogenized with a tissue homogenizer (model 985-370; variable speed 5000–30000 rpm. Biospec Products Inc).

**Flank Organ Test** The flank organ test was performed as previously reported.<sup>16</sup> The effect of the new steroids on the flank organs of male hamsters, which were gonadectomized 30 d before the experiments was determined on 8 groups of 4 animals/experiment selected at random.

Daily subcutaneous injections of 200  $\mu$ g of the steroids 15—19 dissolved in 200  $\mu$ l of sesame oil were administered for 6 d together with 200  $\mu$ g of T. Three groups of animals were kept as control, one was injected with 200  $\mu$ l of sesame oil the second with 200  $\mu$ g of T for 6 d and the third with T plus finasteride. After this treatment, the animals were sacrificed by ether anesthesia. Both flank organs of the animals were shaven and the diameter of the pigmented spot was measured. The results were analyzed using one way of variance with Epistat software.

**Seminal Vesicles Test** The effect of the synthesized steroids on the seminal vesicles from castrated male hamsters was determined. After the sacrifice, the seminal vesicles were dissected out and weighed on a balance. Two separate experiments were performed for each group of steroid-treated animals. The results were analyzed using one way of variance with Epistat software.

**In Vitro Metabolic Studies with Seminal Vesicles** Homogenates from male hamsters seminal vesicles (around 29 mg of protein) were prepared from castrated adult male animals using Krebs-Ringer buffer solution at pH of 6. Tissue preparations were incubated<sup>13</sup> in duplicate with 2.3  $\mu$ Ci [ $^3$ H]T in

the presence of 1 mM NADPH, 8.7  $\mu$ M of finasteride 3 and compounds 15–19 in a Dubnoff metabolic incubator at 37 °C for 60 min in the presence of air. The final incubation volume was 3 ml. Incubations without tissues were used as controls. Incubation was terminated by addition of dichloromethane and the [<sup>3</sup>H]steroid was extracted (4X) using 3 vol of dichloromethane. The protein content of the homogenates was determined by the Bradford's dye-binding method<sup>28</sup> using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

The isolated compound was purified with steroid carriers (T, DHT) in a thin-layer chromatographic system (chloroform–acetone, 9:1). The non-radioactive steroid carriers were located by ultraviolet lamp (254 nm) and by spraying with phosphomolybdic acid reagent 8% in methanol followed by heating. The region containing DHT was scraped off the TLC plate, eluted with methanol and the solvent evaporated under N<sub>2</sub> atmosphere. The extract was resuspended in 1 ml of methanol and aliquots were taken to determine the radioactivity in a Packard 3255 liquid scintillation spectrometer, using Ultima Gold (Packard, Downers Grove, IL, U.S.A.) as the counting solution. The counting efficiency of <sup>3</sup>H was 47%. The loss of radioactivity during the procedure was calculated in agreement with the results obtained from control experiment without tissue. The formation of DHT was calculated and expressed as pmol of DHT/g protein/h.

**Synthesis of the Steroidal Compounds** The synthesis of the intermediates 9–14 (Fig. 2) is given in refs. 23 and 24. The preparation of the new compounds 15–19 is briefly described below.

**16 $\beta$ -Methyl-17 $\alpha$ -valeroloxypregna-4,6-diene-3,20-dione 15** A solution containing steroid 14 (1 g, 2.82 mmol), PTS (10 mg), trifluoroacetic anhydride (8.92 g, 42.48 mmol) and valeric acid (1.41 g, 13.79 mmol) was stirred for 1.5 h at room temperature (nitrogen atmosphere). The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to a pH of 7 and diluted with chloroform (10 ml). The organic phase was separated and dried over anhydrous sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum and the crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane–ethyl acetate (8:2) eluted 0.84 g, 1.97 mmol (70%) of pure product 15. mp 147–149 °C. UV (nm): 283 ( $\epsilon$ =23200). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1726, 1710, 1665, 1618. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.87 (3H, s), 0.95 (3H, t,  $J$ =4 Hz), 1.10 (3H, s), 1.37 (3H, d,  $J$ =6 Hz), 1.66 (4H, m), 1.99 (3H, s), 2.44 (2H, t,  $J$ =3 Hz), 6.21 (2H, dd,  $J_1$ =4 Hz,  $J_2$ =2 Hz), 6.28 (1H, s). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 15.0 (CH<sub>3</sub> at C-16), 16.3 (C-18), 19.9 (C-19), 22.2 (C-21), 124.1 (C-4), 128.3 (C-6), 141.2 (C-7), 163.3 (C-5), 173.3 (ester carbonyl), 200.3 (C-3), 204.6 (C-20). MS ( $m/z$ ): 426 (M<sup>+</sup>).

**(6R,7S)-Epoxy-16 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -valeroloxypregna-4-ene-3,20-dione 16** A solution of steroid 15 (1 g, 2.35 mmol) and *m*-chloroperbenzoic acid (1.5 g, 8.69 mmol) in chloroform (40 ml) was allowed to reflux for 4 h. The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to pH of 7. The organic phase was separated and dried over anhydrous sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum and the crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane–ethyl acetate (7:3) eluted 0.73 g, 1.65 mmol (70%) of the pure product 16. mp 158–160 °C. UV (nm): 240 ( $\epsilon$ =14800). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1728, 1706, 1678. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.71 (3H, s), 0.99 (3H, t,  $J$ =4 Hz), 1.12 (3H, s), 1.40 (3H, d,  $J$ =5 Hz), 1.56 (4H, m), 1.93 (3H, s), 2.37 (2H, t,  $J$ =3 Hz), 3.38 (1H, dd,  $J_1$ =4 Hz,  $J_2$ =3 Hz), 3.44 (1H, d,  $J$ =4 Hz), 6.17 (1H, s). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 15.4 (CH<sub>3</sub> at C-16), 17.3 (C-18), 20.0 (C-19), 28.5 (C-21), 62.2 (C-6), 72.3 (C-7), 131.8 (C-4), 162.2 (C-5), 175.2 (ester carbonyl), 199.8 (C-3), 205.3 (C-20). MS ( $m/z$ ): 443 (M<sup>+</sup>).

**6-Bromo-16 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -valeroloxypregna-4,6-diene-3,20-dione 17** A solution of steroid 16 (1 g, 2.26 mmol) and hydrobromic acid (4.16 ml, 48%) in acetic anhydride (6.6 ml) was stirred at room temperature for 24 h. To the reaction mixture was added ice and the precipitated product was filtered off; it was purified by silica gel column chromatography. Hexane–ethyl acetate (7:3) eluted 0.81 g, 1.60 mmol (71%) of the pure product 17. mp 170–172 °C. UV (nm): 285 ( $\epsilon$ =22900). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1726, 1702, 1679, 590. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.78 (3H, s), 0.9 (3H, t,  $J$ =4 Hz), 1.0 (3H, s), 1.3 (3H, d,  $J$ =6 Hz), 1.6 (4H, m), 1.9 (3H, s), 2.4 (2H, t,  $J$ =4 Hz), 6.3 (1H, s), 6.6 (1H, m). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 15.5 (C-18), 16.5 (CH<sub>3</sub> at C-16), 19.2 (C-19), 28.5 (C-21), 127.5 (C-4), 147.5 (C-7), 159.6 (C-6), 161.8 (C-5), 175.6 (ester carbonyl), 199.6 (C-3), 202.6 (C-20). MS ( $m/z$ ): 505 (M<sup>+</sup>).

**17 $\beta$ -Hydroxy-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4,6-triene-3,20-dione 18** A solution of steroid 13 (1 g, 2.82 mmol) and DDQ (2.2 g) in dioxan (50 ml) was allowed to reflux for 4 d. Upon cooling, the precipitated 2,3-dichloro-5,6-dicyanohydroquinone was filtered off. To the filtrate was added 3% aqueous sodium hydroxide solution (100 ml) and chloroform (100 ml); the mixture was stirred for 5 min. The organic phase was washed 3 times with 3% aqueous sodium hydroxide solution and water. It was dried over anhydrous

sodium sulfate and the solvent removed in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane–ethyl acetate (6:4) eluted 640 mg, 1.88 mmol (65%) of the pure product 18. mp 198–200 °C. UV (nm): 222, 255, 298 ( $\epsilon$ =14900, 12700, 17900 respectively). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3387, 1705, 1656, 1602. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.78 (3H, s), 1.1 (3H, s), 1.3 (3H, d,  $J$ =4 Hz), 2.0 (3H, s), 6.0 (1H, s), 6.2 (1H, d,  $J$ =2 Hz), 6.4 (1H, d,  $J$ =3 Hz), 6.6 (1H, d,  $J$ =3 Hz), 7.1 (1H, d,  $J$ =2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 15.0 (C-18), 16.2 (CH<sub>3</sub> at C-16), 20.5 (C-19), 26.5 (C-21), 78.2 (C-17), 186.2 (C-3), 217.0 (C-20). MS ( $m/z$ ): 340 (M<sup>+</sup>).

**16 $\beta$ -Methyl-17 $\alpha$ -valeroloxypregna-1,4,6-triene-3,20-dione 19** A solution containing steroid 18 (1 g, 2.94 mmol), PTS acid (10 mg), trifluoroacetic anhydride (8.92 g, 42.48 mmol) and valeric acid (1.41 g, 13.79 mmol) was stirred for 1.5 h at room temperature (nitrogen atmosphere). The reaction mixture was neutralized with an aqueous sodium bicarbonate solution to a pH of 7 and diluted with chloroform (10 ml). The organic phase was separated and dried over anhydrous sodium sulfate; the solvent was eliminated in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography. Hexane–ethyl acetate (8:2) eluted 840 mg, 2.03 mmol (69%) of the pure product 19. mp 149–149 °C. UV (nm): 221, 255, 300 ( $\epsilon$ =14600, 12400, 17300 respectively). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1720, 1707, 1664, 1604. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.8 (3H, s), 1.0 (4H, m), 1.3 (3H, s), 1.5 (3H, d,  $J$ =4 Hz), 1.7 (3H, t,  $J$ =4 Hz), 2.0 (3H, s), 2.3 (2H, t,  $J$ =3 Hz), 6.1 (1H, s), 6.2 (1H, d,  $J$ =2 Hz), 6.4 (1H, d,  $J$ =3 Hz), 6.6 (1H, d,  $J$ =3 Hz), 7.1 (1H, d,  $J$ =2 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 15.7 (CH<sub>3</sub> at C-16), 17.6 (C-18), 20.6 (C-19), 83.9 (C-17), 165.3 (C-5), 172.6 (ester carbonyl), 182.2 (C-3), 211.6 (C-20). MS ( $m/z$ ): 424 (M<sup>+</sup>).

**Acknowledgements** We gratefully acknowledge the financial support of DGAPA and Conacyt for the projects IN 204198 and G33450-M.

## References

- Krieg M, Tunn S. Testosterone Action, Deficiency, Substitution, ed by Nieschlag, Behre H. M., Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/London/Paris/Tokyo/Hong Kong/Barcelona, 1990, pp 219–244.
- Krieg M., Weiser H., Tunn S. *J. Steroid Biochem Molec Biol.* **53** 395–400 (1995).
- Tunn S., Hochstrate H., Grunwald I., Flucher S. T. H., Krieg M. *J. Clin Endocrinol. Metab.*, **67** 979–985 (1988).
- Liang T., Cascieri M., Cheung A., Reynolds G., Rasmussen G. *Endocrinology*, **117**, 571–579 (1985).
- Gormley G. J., Stoner E., Bruskevitz R. C., Imperato-McGinley J., Walsh P. C., McConnel J. D., Ariole G. L., Geller J., Bracken B., Tenover J. S., Baughan E. D., Pappas F., Taylor A., Binkowitz B. Ng J., Group F. S. *N. Engl. J. Med.* **327** 1185–1191 (1992).
- Levy M. A., Brandt M., Heys R., Holt D. A., Metclaff B. W., *Biochemistry*, **29**, 2815–2824 (1990).
- Horton R., Kato M., Sherino R., *Steroids*, **10**, 245–249 (1967).
- Clark C., Nowell N. *Steroids*, **34** 139–149 (1979).
- Giudici D., Briatico G., Cominato C. *J. Ster. Biochem Mol Biol* **58** 299–305 (1996).
- Weisser H., Tunn S., Debus M., Krieg M. *Steroids*, **59** 616–620 (1994).
- Andersson S., Berman D. M., Jenkins E. P., Russel D. W. *Nature* (London), **54**, 159–161 (1991).
- Thigpen A., Russel D. W. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8577–8583 (1992).
- Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G., Ramirez E., *Steroids* **64** 413–421 (1999).
- Takayasu S., Adachi K., *Endocrinology*, **90** 73–80 (1972).
- Hisoaka H., Ideta R., Seki T., Adachi K., *Arch Dermatol Res* **283** 269–273 (1991).
- Vermorken A. J. M., Goos C. M. A., Wirtz P. *British J. Dermatol* **106** 99–101 (1982).
- Cabeza M., Quiroz A., Bratoeff E., Murillo E., Ramirez E., Flores G. *Chem Pharm Bull* **47**, 1232–1236 (1999).
- Chen C., Puy L. A., Semard S. M., J., Li X., Singh S., Labrie F. *J. Invest Dermatol*, **105**, 678–682 (1995).
- Bruchowski N., Wilson J. D. *J. Biol. Chem.* **243**, 2012–2021 (1968).
- Kaufman K. D., Olsen E. A., Whiting D., Savin R., Bergfeld W., Price V. H., Van Neste D., Roberts J. L., Shapiro J., Binkowitz B., Gormley G. J. *J. Am Acad Dermatol*, **39**, 578–589 (1998).
- Bayne E. K., Flanagan J., Einstein M., Ayala J., Chang B., Azzolina B., Whiting D. A., Mumford R. A., Thiboutot D., Singer I. L., Harris G. *British J. Dermatol*, **141**, 481–491 (1999).
- Kumar N., Didolkar A. K., Monder C., Bardin W. C., Sundram M. *En-*

- ocrinology* 130, 3677--3683 (1993)
- 23) Cabeza M., Heuze I. Bratoeff E., Ramirez E., Martínez R. *Chem Pharm. Bull.* 49, 525--530 (2001)
- 24) Bratoeff E., Herrera H., Ramirez E., Solorzano K., Murillo E., Quiroz A., Cabeza M. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1249--1255 (2000).
- 25) Bratoeff E., Ramirez E., Murillo E., Flores G., Cabeza M., *Curr. Med Chem.* 6, 1107--1123 (1999)
- 26) Bratoeff E., Rubio M., Ramirez E., Garcia J., Ramirez G. *Chemistry Today*, 16, 33--35 (1998).
- 27) Petrow V., Yueh-sha Wang, Lack L., *Steroids*, 38, 121--140 (1981)
- 28) Bradford M. M. *Anal. Biochem.* 72, 248--254 (1986)