

00582
12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

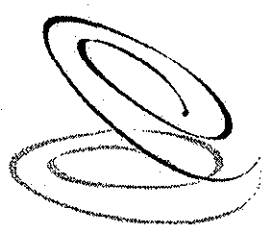
SÍNTESIS DE ÉSTERES NUEVOS DE PREGNADIENOS Y PREGNATRIENOS SUSTITUÍDOS CON UN GRUPO METILO EN C-16

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

M. en C. EUGENIO ALEJANDRO FLORES OROPEZA



Posgrado
Ciencias
Químicas

MÉXICO, D.F.

Entrego a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Eugenio Alejandro Flores Oropeza

FECHA: 2002-11-19

FIRMA: [Signature]

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Primer vocal	Dr. Raymundo Cruz Almanza
Segundo vocal	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Tercer vocal	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
Secretario	Dr. Benjamín Ortiz Mendoza
Primer suplente	Dr. Carlos Cerda García Rojas
Segundo suplente	Dr. Adrián Covarrubias Zúñiga

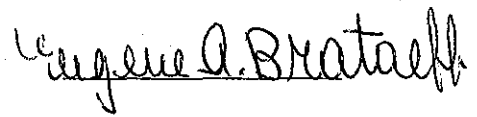
SITIOS DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

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

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

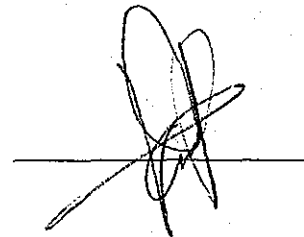
ASESOR:

Dr. Eugene Bratoeff Titeff



ALUMNO:

M. en C. Eugenio Alejandro Flores Oropeza



AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada (No. 86616) para la realización de este doctorado.

Con respeto al Dr. Eugene Bratoeff por el apoyo académico, personal y moral para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas por el apoyo personal y por la determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

A los integrantes del jurado por los comentarios y sugerencias hechas a este trabajo.

Al personal académico de la USAI por la realización de los espectros de UV, IR, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C y Espectrometría de Masas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 125 Edificio E, Facultad de Química UNAM.

A mi esposa Lupita y mis hijos Adrián y Erick. Gracias por su apoyo.

RESUMEN

Primera parte

Se realizó la síntesis de cinco ésteres de tipo **diendiona**: 17α -benzoiloxi, 17α -*p*-fluoro-benzoiloxi, 17α -*p*-cloro-benzoiloxi, 17α -*p*-bromo-benzoiloxi y 17α -(*p*-metil-benzoiloxi)- 16β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona y cinco de tipo **triendiona**: 17α -benzoiloxi, 17α -*p*-fluoro-benzoiloxi, 17α -*p*-cloro-benzoiloxi, 17α -*p*-bromo-benzoiloxi y 17α -(*p*-metil-benzoiloxi)- 16β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona. Todos ellos fueron evaluados en un experimento *in vitro* en vesículas seminales de hamsters machos castrados para determinar su posible actividad inhibitoria sobre la enzima 5α -reductasa, usando como testigo a finasteride que es el medicamento disponible comercialmente. Los resultados muestran que las **triendionas** son más activas que las **diendionas**, ya que son más coplanares y reaccionan más rápido con la porción nucleofílica de la enzima. Las **triendionas** 17α -benzoiloxi, 17α -*p*-cloro-benzoiloxi y 17α -(*p*-metil-benzoiloxi)- 16β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona inhiben en mayor proporción a la enzima en comparación a finasteride. Esta parte del trabajo de investigación fue aceptada para su publicación en *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*.

Segunda parte

Se sintetizaron los siguientes compuestos de tipo **6-metilen**: 17α -(4-ciclohexil)-butiroxi, 17α -(3-ciclohexil)-propionoxi, 17α -(2-ciclohexil)-acetoxi, 17α -(3-ciclopentil)-propionoxi, 17α -(*p*-bromo)-benzoiloxi, 17α -(*p*-metil)-benzoiloxi y 17α -hidroxi-6-metilen-4-pregnen-3,20-diona, los cuales fueron evaluados en comparación a finasteride, en la fracción membranal de próstata de hamsters, para determinar la posible inhibición al 50% sobre la enzima 5α -reductasa. El compuesto 17α -hidroxi-6-metilen-4-pregnen-3,20-diona es el mejor de todos, pues su valor de $I.C._{50} = 19$ nM, es muy cercano al de finasteride $I.C._{50} = 10$

nM. Le siguen en efectividad inhibitoria los ésteres aromáticos y después los alifáticos.

Tercera parte:

En esta última parte se desarrolló la síntesis de tres ésteres de tipo aromático: 17 α -benzoiloxi, 17 α -*p*-metil-benzoiloxi y 17 α -*p*-fluoro-benzoiloxi-4-bromo-4-pregnen-3,20-diona. Este último compuesto fue evaluado biológicamente para determinar la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α -reductasa localizada en cultivos de *Penicillium crustosum* y en la fracción membranal de próstata de hamsters. Los resultados del primer modelo biológico indican que el ester fluorado ($K_i=12.6\pm 2.5$ nM a una concentración de 60 μ M) presenta mayor afinidad por la enzima en comparación a finasterida ($K_i=1.54\pm 0.25$ μ M a una concentración de 60 μ M). Además presenta inhibición competitiva en dos diferentes concentraciones 20 y 60 μ M e inhibición no competitiva en la concentración de 40 μ M. Sin embargo en la fracción membranal, el ester fluorado es el que presenta menor inhibición de la enzima, los valores de I.C.₅₀ son los siguientes: 17 α -benzoiloxi (100 μ M), 17 α -*p*-metil-benzoiloxi (114 μ M) y 17 α -*p*-fluoro-benzoiloxi (0.28mM). Otro objetivo aparte de la síntesis de los ésteres antes mencionados, es la posible sustitución de los modelos biológicos, porque el modelo animal (hámsters), implica el sacrificio de muchos animales. Los resultados obtenidos en la presente investigación aceptada para su publicación en ***Steroids*** no avalan dicha sustitución.

ABSTRACT

The objective of this study was to synthesize new pregnane derivatives and evaluate them as 5α -reductase inhibitors. From the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate, nine new substituted benzoyloxy steroidal compounds were synthesized: 16β -methylpregna-4,6-diene-3,20-diones derivatives (**14b-e**) and 16β -methylpregna-1,4,6-triene-3,20-diones (**5a-e**). These compounds were tested on *in vitro* metabolism of [3 H]T to [3 H]DHT in seminal vesicles homogenates of gonadectomized male hamsters. All trienones (**5a-e**) showed consistently a higher 5α -reductase inhibitory activity than the corresponding dienones (**14b-e**), because the trienones having a more coplanar structure react faster with the enzyme 5α -reductase and the compounds **5a**, **5d** and **5d** inhibited more effectively the DHT synthesis than the control sample finasteride.

In another experiment using 17α -acetoxy-progesterone as the starting material, we synthesized seven new steroidal derivatives 6-methylenepreg-4-ene-3,20-diones (**6a-f** and **19**). These compounds were evaluated in membranous portions of prostate hamsters; this method determined their inhibitory concentration at 50% on the 5α -reductase enzyme. The IC_{50} of the compound **19** (19 nM) is comparable to that of finasteride (10 nM).

From 17α -acetoxy-progesterone there were synthesized also three new *p*-substituted benzoyloxy steroidal compounds: 4-bromo-(*p*-methylbenzoyloxy)(**23a**), 4-bromo-benzoyloxy(**23b**) and 4-bromo-(*p*-fluorobenzoyloxy)(**23c**)-4-pregnene-3,20-diones. Compound **23c** was evaluated in two biologic models: IC_{50} assay and evaluation in *P. crustosum* broths. Derivative **23c** showed a IC_{50} value of 0.28 mM; in the *P. crustosum* model it gave a value of K_i 12.6 ± 2.5 nM whereas the control finasteride exhibited a value of K_i 1.54 ± 0.25 μ M (apparently **23c** showed a much higher antiandrogenic activity than finasteride).

INDICE

Capítulo	Página
Generalidades	1
Antecedentes	3
Relación empírica	8
Hipótesis	10
Objetivos	11
Discusión y Resultados	
Primera parte	14
Conclusiones	25
Parte experimental	26
Espectros	30
Segunda Parte	39
Conclusiones	53
Parte experimental	54
Espectros	59
Tercera parte	70
Conclusiones	78
Parte experimental	80
Espectros	84
Conclusiones Generales	90
Bibliografía	92

Glosario

Ac ₂ O	Anhídrido acético.
APTS	Acido <i>p</i> -toluensulfónico.
ATFA	Anhídrido trifluoroacético.
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1.4-benzoquinona.
DMF	N,N-dimetil-formamida.
OFTM	Ortoformiato de trimetilo.
T A	Temperatura ambiente.

GENERALIDADES

La próstata se localiza en la pelvis, abajo de la vejiga y rodea la porción superior de la uretra. Debido a esto, cualquier afección de la misma obstruye el flujo de la orina causando que la micción se torne difícil y dolorosa. También puede afectar a la vejiga, los uréteres y los riñones a tal grado que puede causar necrosis renal.¹

La próstata participa pasivamente en el proceso de la micción controlando la velocidad a la cual la orina fluye desde la vejiga hasta la uretra. Participa activamente en la actividad sexual produciendo una secreción blanquecina que es vertida en la uretra durante la eyaculación. Esta secreción glandular ayuda a la movilidad del espermatozoides a través de la uretra y constituye una tercera parte del fluido seminal.^{1, 2}

Dos de las principales enfermedades de la próstata son el cáncer de próstata y la Hiperplasia Prostática Benigna (BPH), esta última se caracteriza por el incremento anormal de la glándula con la formación de nódulos voluminosos bien delimitados.^{2, 3}

El cáncer de próstata es el más comúnmente diagnosticado en la población varonil de los Estados Unidos de América y es la segunda causa de mortalidad entre todos los tipos de cáncer. La Sociedad Norteamericana de Cáncer ha estimado que se presentarán 200,000 nuevos casos de este cáncer en Norteamérica y que ocurrirán aproximadamente 38,000 decesos a causa de él. en los próximos dos años^{2, 3}

La detección oportuna del cáncer de próstata y de la hiperplasia prostática benigna es difícil de realizar, porque algunos de sus síntomas pueden ser causados por otras enfermedades o están consideradas como propias y

características de la edad avanzada. Otro gran problema de este cáncer es que en ocasiones no presenta síntomas, incluso teniendo desarrollada la enfermedad durante varios años. Lo anterior distingue a este mal, sobre todo si se le compara con el cáncer de mama y el cáncer testicular, en los cuales la auto exploración es muy importante en la detección temprana de la enfermedad ⁴.

También existen varios factores de riesgo del cáncer de próstata como los siguientes: historia clínica familiar, ⁵ raza, ⁶ tabaquismo, ⁷⁻¹⁰ dieta alimenticia ¹¹⁻¹⁶ y edad avanzada. ¹⁷⁻¹⁹

Los métodos disponibles en la actualidad para el tratamiento del cáncer de próstata son: prostatectomía, orquiectomía bilateral, tratamientos con laser como el ILC (Intertitial Laser Coagulation), terapias con microondas como TUMT (Transurethral Microwave Therapy of the Prostate) y las terapias hormonales que incluyen compuestos esteroidales y no esteroidales que actuan como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa o como antiandrógenos. ^{2, 20}

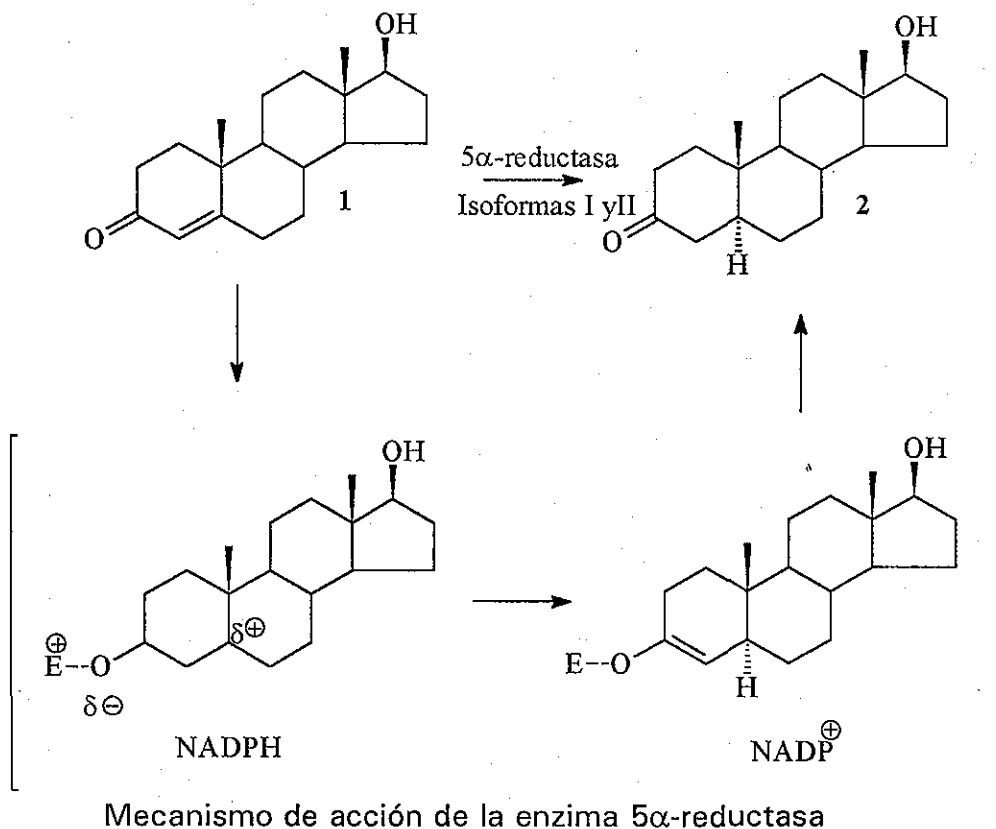
Estos últimos también están considerados como un medicamento potencial para el tratamiento de enfermedades dependientes o causadas por andrógenos como son: seborrea, alopecia y pubertad precoz. ²¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

Los andrógenos son compuestos esteroideos responsables de las características sexuales primarias y secundarias en los varones, además tienen actividad anabólica que causa la aceleración del crecimiento esquelético, incremento en la masa muscular, así como el metabolismo de la grasa subcutánea. La testosterona **1** es el andrógeno predominante en el varón y se produce principalmente (95 %) en los testículos. Su síntesis y liberación se inicia cuando el hipotálamo secreta la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (HLG), su nombre específico es Factor de Liberación de la Hormona Luteinizante, el cual estimula la secreción de la Hormona Estimulante de las células Intersticiales (HSCI) y de la Hormona Folículo Estimulante (HFS) en el lóbulo anterior de la Hipófisis. Finalmente se produce **1** en los testículos bajo la influencia de HSCI y HFS por las células intersticiales de Leydig.¹

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna están relacionadas con la transformación de **1** a su metabolito secundario **2** (5 α -dihidrotestosterona) en presencia de la enzima 5 α -reductasa (EC 1.3.99.5). Esta enzima está unida a la membrana celular y es dependiente del NADPH para realizar la reducción irreversible de los esteroides que posean una funcionalidad **4-en-3-oxo**. En particular actúa sobre la testosterona **1** para producir el compuesto reducido **2**, el cual es un andrógeno más potente que **1**. Dos isoenzimas de 5 α -reductasa, denominadas 5 α -R1 y 5 α -R2, han sido clonadas, expresadas y caracterizadas. La isoenzima 5 α -R1 se localiza principalmente en las glándulas sebáceas de la piel (incluyendo el cuero cabelludo) y en el hígado, mientras que la 5 α -R2 se localiza en la próstata, piel genital, folículo capilar, vesículas seminales, epidídimo e hígado.²⁰⁻²³



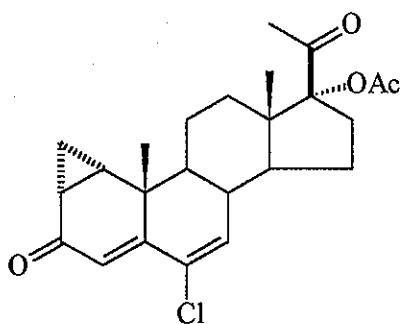
Las patologías asociadas con la producción de 2 y la importancia relativa de las dos isoenzimas han sido identificadas y clarificadas mediante el estudio de los efectos fisiológicos ocasionados por la deficiencia genética de la enzima 5 α -reductasa en varones.²²

Los andrógenos constituyen una parte importante en la fisiología de hombres y mujeres. En el caso de las mujeres, cuando los andrógenos son secretados en exceso ocasionan hirsutismo (crecimiento excesivo del vello en todo el cuerpo). Cuando el exceso sucede en los hombres, ocurren varias enfermedades, por ejemplo, cuando se combinan con una susceptibilidad genética, el paciente padece alopecia (pérdida anormal del cabello) y cuando se combinan simultáneamente con mutaciones en los receptores androgénicos se

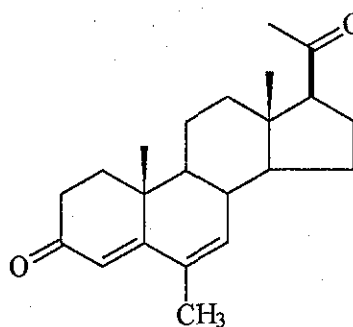
desarrolla el cáncer de próstata. Por otra parte también se presenta el crecimiento benigno de la próstata (hiperplasia prostática benigna) que oprime a la uretra ocasionando la disminución de la velocidad del flujo urinario. El tratamiento farmacológico de estas enfermedades indica la utilización de antiandrógenos (compuestos que bloquean el receptor androgénico) que pueden impedir la unión de **1** y / o **2** y el receptor androgénico; y el uso de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa para disminuir la concentración de **2** en el plasma sanguíneo. Incluso se ha pensado en la inhibición selectiva, por ejemplo en el caso del hirsutismo se recomienda la inhibición sobre la isoenzima 5 α -R1.²²

Los primeros antiandrógenos e inhibidores fueron diseñados y desarrollados a partir de la modificación de los anillos A, B y D de esteroides de fuentes naturales, aunque también hay de tipo no esteroidal. A continuación se muestran las estructuras de algunos de ellos.²⁴⁻²⁵

Antiandrógenos de tipo esteroidal y no esteroidal

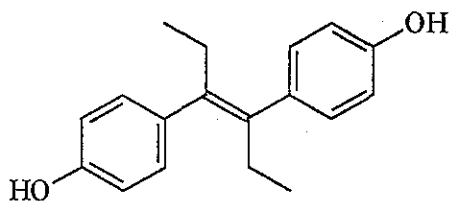


Acetato de ciproterona

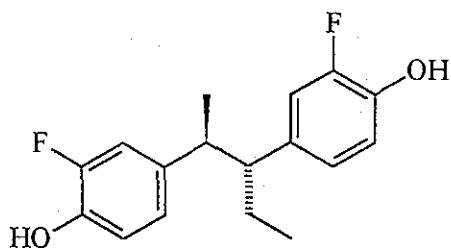


Medrogesterona

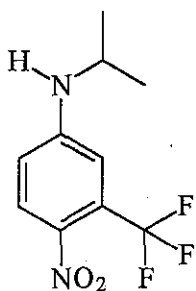
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



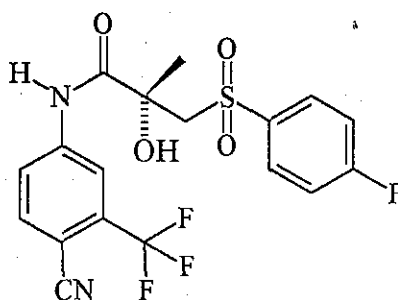
Dietilestilbestrol



Bifluranol



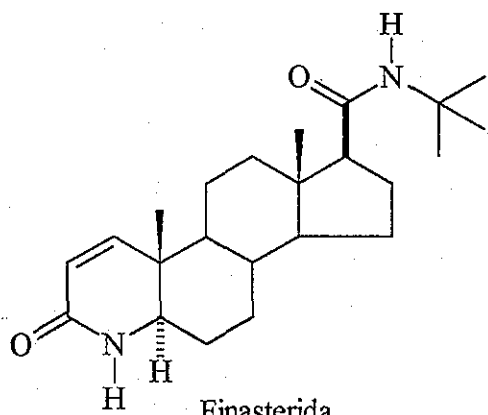
Flutamida



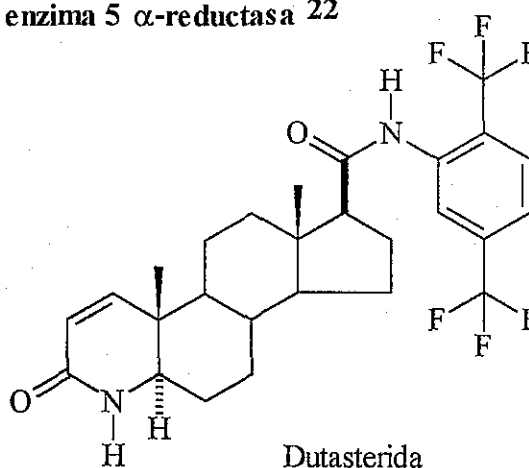
Bicalutamida

A continuación se muestran las estructuras de algunos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa:^{22, 26}

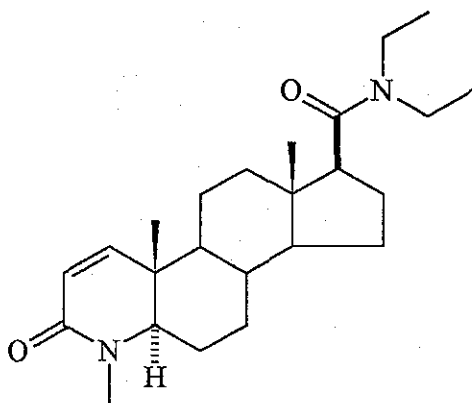
Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa ²²



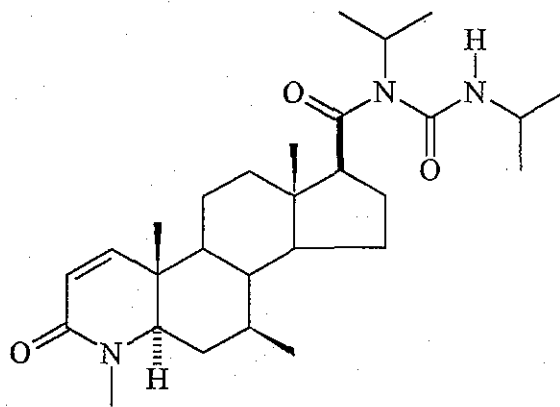
Finasterida
(Merck)



Dutasterida
(Glaxo)



4-MA
(Merck)



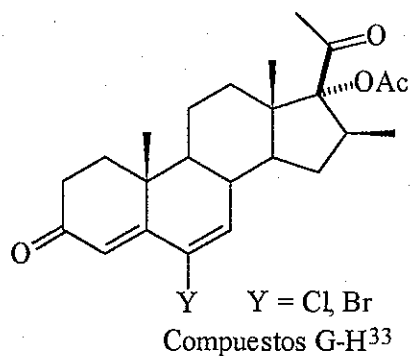
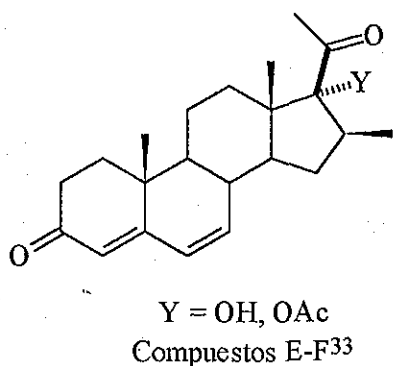
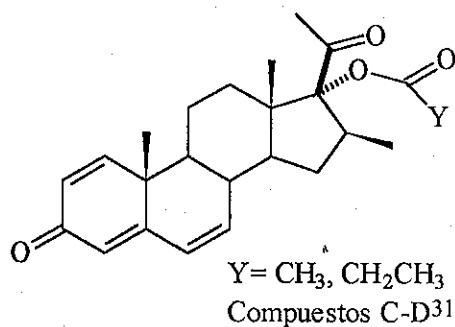
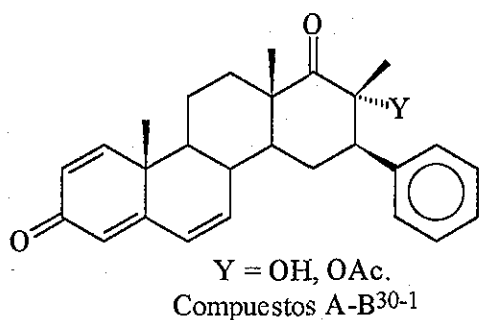
Turosterida
(Pharmacia and Upjohn)

El desarrollo de agentes hormonales antiandrogénicos se ha incrementado debido a la gran aplicación que han tenido en la terapia médica, pues se utilizan en el tratamiento del cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, pubertad precoz en niños, hirsutismo, alopecia, tratamiento del acné.²⁷ Sin embargo, a pesar de su gran aplicación, su utilización está restringida debido a los efectos secundarios que presentan, como alteraciones hormonales, retención de líquidos, efectos hepatotóxicos severos y pérdida del deseo sexual por mencionar algunos.²⁸

Los aspectos positivos y negativos de los antiandrógenos representan un estímulo en la búsqueda y síntesis de nuevos compuestos que optimicen las ventajas y disminuyan los efectos secundarios de los antiandrógenos.

RELACION EMPIRICA

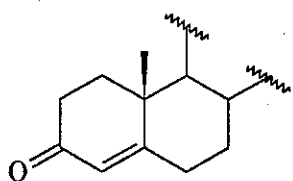
En el laboratorio del Dr. Eugene Bratoeff y bajo su dirección se han sintetizado varios compuestos, algunos de los cuales se muestran a continuación.²⁹⁻⁴⁶



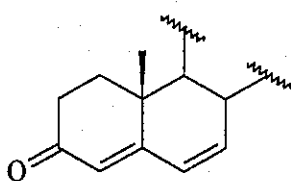
Estos compuestos han sido evaluados biológicamente en los órganos flanco y en las vesículas seminales de hámsters machos castrados y han resultado ser más potentes en la inhibición de la enzima 5 α -reductasa en comparación a Finasterida **3**, que es el medicamento comercialmente disponible.²⁹⁻³³

Esto sirvió para establecer una relación empírica entre la actividad inhibitoria de un esteroide y su estructura. Considerando ésta relación, se plantean a continuación los requerimientos estructurales para el diseño de nuevos fármacos basados en la molécula de progesterona.²⁹⁻³³

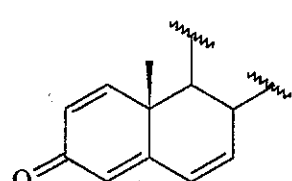
REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES PARA LA ACTIVIDAD
INHIBITORIA



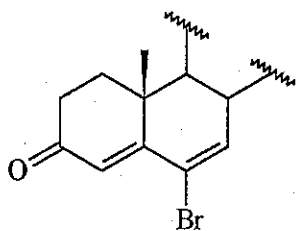
4-en-3-ona



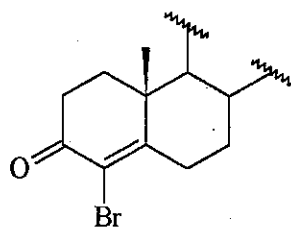
4,6-dien-3-ona



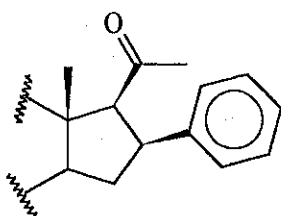
1,4,6-trien-3-ona



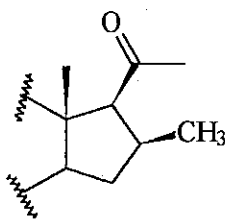
6-bromo-4,6-dien-3-ona



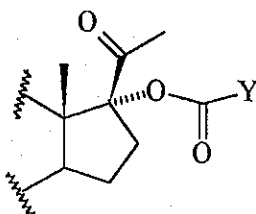
4-bromo-4-en-3-ona



16β-fenil



16β-metil



Éster

Y=alifático o aromático

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La presencia de ciertos grupos funcionales como: 4-en-3,20-diona ó 4,6-dien-3,20-diona ó 1,4,6-trien-3,20-diona que le confiera coplanaridad a la molécula.

Un grupo éster voluminoso y que en algunos casos posee un átomo electronegativo (para evitar la acción de la enzima 17,20-liasa).

Un grupo metilo ó un grupo fenilo en C-16 con orientación β (para evitar la reducción enzimática del éster en C-17 y al mismo tiempo evitar la reducción del carbonilo en C-20).

Un átomo de halógeno en el grupo éster y / o en C-4 ó C-6.

Por otra parte, se han realizado estudios teóricos, los cuales demostraron que el efecto antiandrogénico de los esteroides aumenta con el incremento del momento dipolar de la molécula. Probablemente esto ocurra a través de una interacción dipolo-dipolo receptor-antiandrógeno.³⁴

Tomando en cuenta los requerimientos antes descritos para la actividad inhibitoria, se estableció la siguiente:

HIPÓTESIS

Si un derivado esteroidal posee varios de los requerimientos estructurales , entonces inhibirá con mayor efectividad a la enzima 5α -reductasa, en comparación a Finasterida **3**, que es el medicamento comercialmente disponible.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La presencia de ciertos grupos funcionales como: 4-en-3,20-diona ó 4,6-dien-3,20-diona ó 1,4,6-trien-3,20-diona que le confiera coplanaridad a la molécula.

Un grupo éster voluminoso y que en algunos casos posee un átomo electronegativo (para evitar la acción de la enzima 17,20-liasa).

Un grupo metilo ó un grupo fenilo en C-16 con orientación β (para evitar la reducción enzimática del éster en C-17 y al mismo tiempo evitar la reducción del carbonilo en C-20).

Un átomo de halógeno en el grupo éster y / o en C-4 ó C-6.

Por otra parte, se han realizado estudios teóricos, los cuales demostraron que el efecto antiandrogénico de los esteroides aumenta con el incremento del momento dipolar de la molécula. Probablemente esto ocurra a través de una interacción dipolo-dipolo receptor-antiandrógeno.³⁴

Tomando en cuenta los requerimientos antes descritos para la actividad inhibitoria, se estableció la siguiente:

HIPÓTESIS

Si un derivado esteroideal posee varios de los requerimientos estructurales , entonces inhibirá con mayor efectividad a la enzima 5α -reductasa, en comparación a Finasterida **3**, que es el medicamento comercialmente disponible.

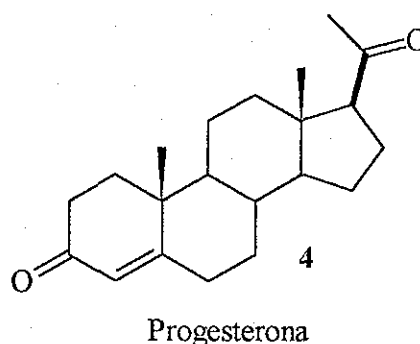
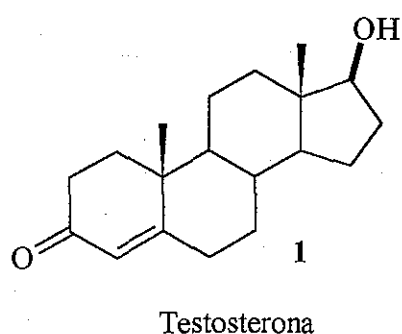
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

Para la síntesis de nuevos antiandrógenos e inhibidores de la enzima 5α -reductasa, se pueden seguir dos rutas:

a).- Modificar la molécula de la testosterona **1**, para eliminar efectos androgénicos y anabólicos de esta hormona y aumentar el efecto inhibidor.

b).- Modificar la molécula de la progesterona para obtener un derivado esteroidal con posible actividad antiandrogénica, debido a que la progesterona es un antiandrógeno débil.



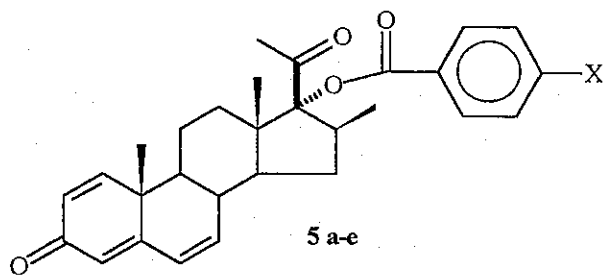
Por lo tanto, para probar la hipótesis antes enunciada se proponen los siguientes objetivos:

1.- La síntesis de los compuestos **5 a-e**, **6 a-f** y **23 a-c** los cuales se muestran en las siguientes figuras:

2.- Evaluar sobre la enzima 5α -reductasa la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados tomando a finasterida **3** como referencia.

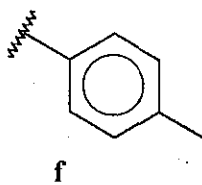
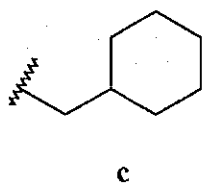
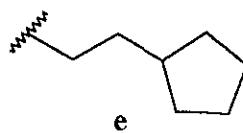
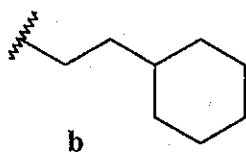
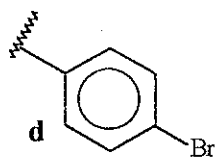
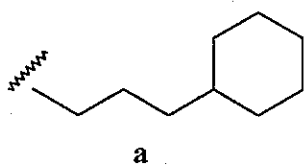
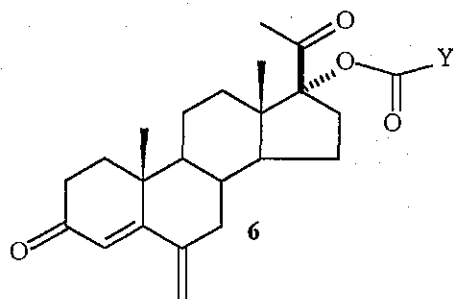
Inhibición de la enzima tipo I de la enzima 5α -reductasa por estudios sobre piel de hámsters machos castrados. Inhibición de la enzima tipo 2 por análisis de la velocidad de formación de DHT en vesículas seminales de hámsters machos castrados.

Primera Parte

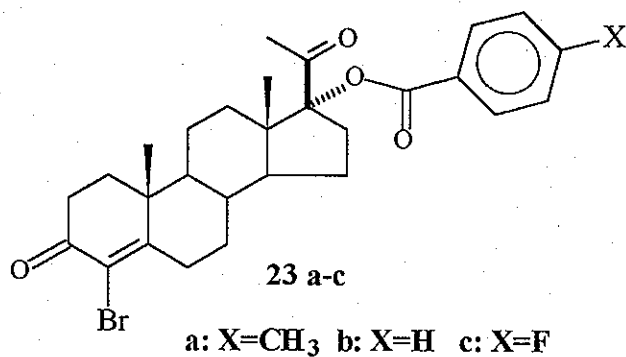


a: X = H b: X = Me c: X = Br
d: X = Cl e: X = F

Segunda Parte



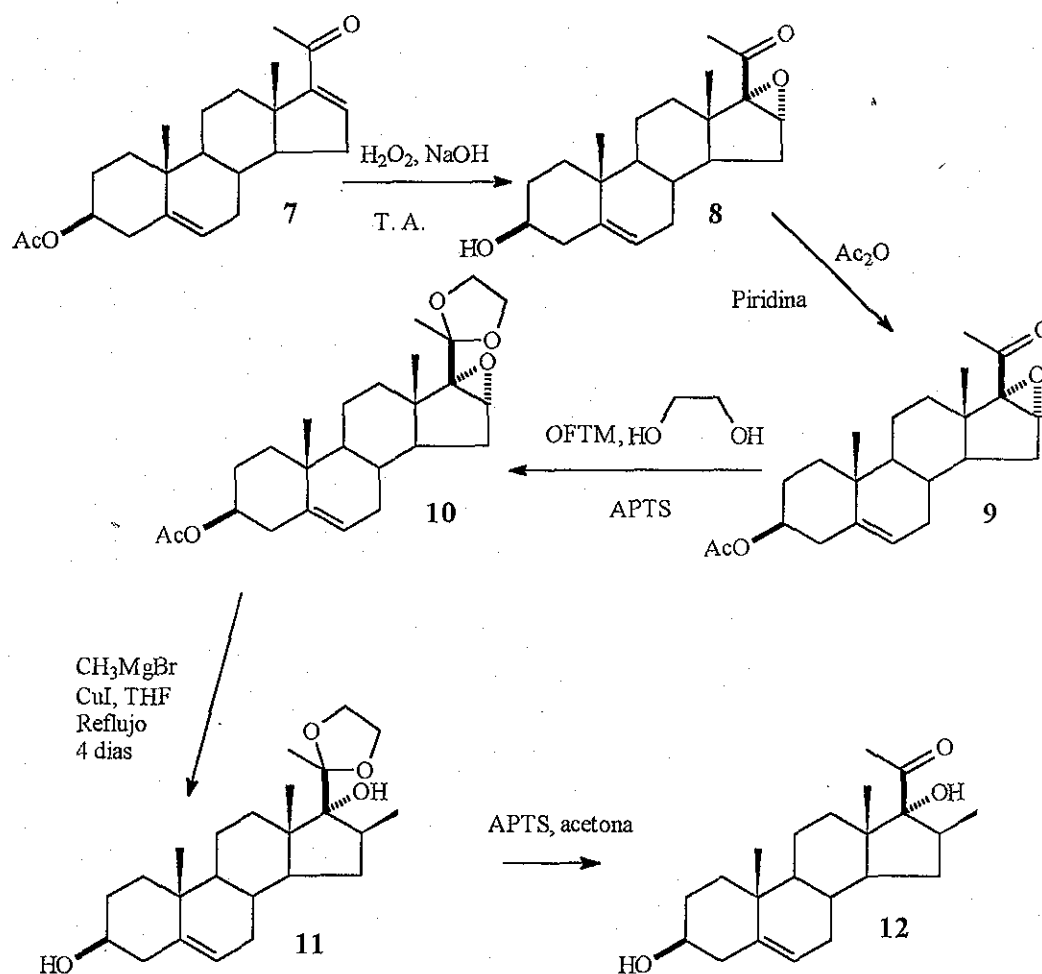
Tercera Parte



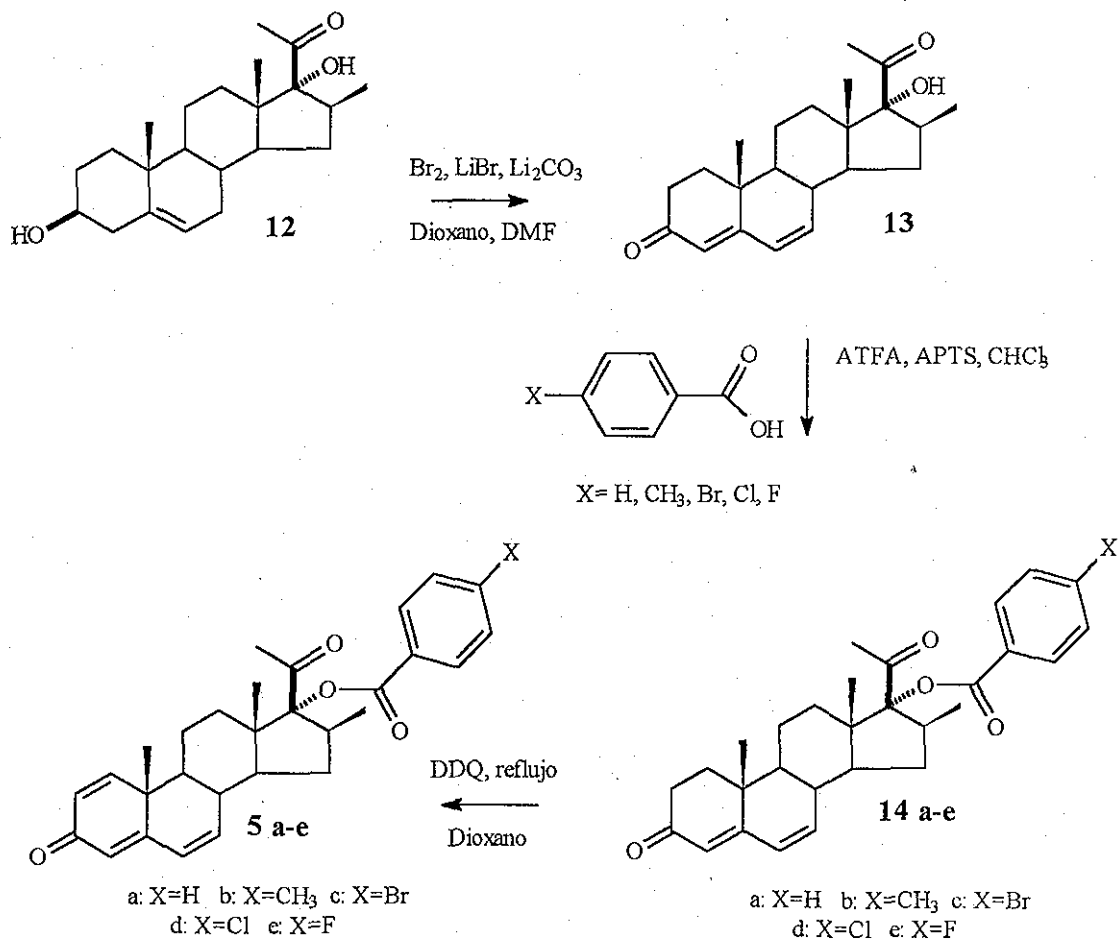
DISCUSION Y RESULTADOS

Discusión de la Primera parte. Compuestos 5 a-e

El primer objetivo planteado anteriormente se logró realizando el siguiente diagrama de síntesis:

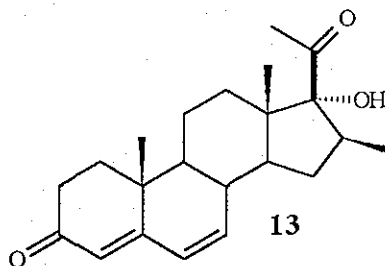


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



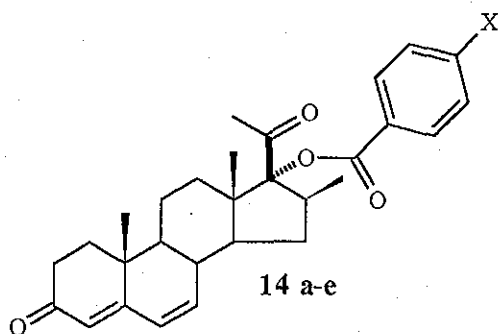
En la síntesis de los compuestos **5 a-e**, se utilizó como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona **7**, porque es comercialmente asequible y principalmente porque posee los grupos funcionales necesarios para la conversión en ocho etapas a los compuestos finales. La síntesis y su procedimiento ya han sido explicados en detalle en algunas tesis y artículos realizados por el grupo de trabajo del Dr. Eugene Bratoeff.²⁹⁻⁴⁸ Por lo tanto en este trabajo se discutirán solamente las reacciones que dan lugar a los productos finales.

La siguiente etapa en el proceso de síntesis, es la esterificación del compuesto **13**, y para ello se realizó una revisión bibliográfica de los diferentes métodos descritos en la literatura química:



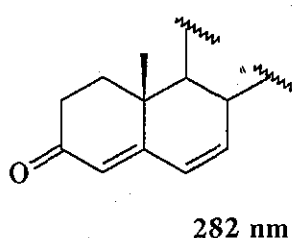
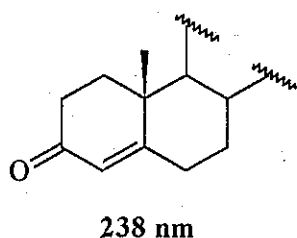
Algunos de los métodos descritos son: 1.-Anhídridos mixtos. 2.-Esteres Activados. 3.-Acilación con N-acilimidazoles.⁴⁹

En esta tesis, con la experiencia ya obtenida en nuestro grupo de trabajo,^{33, 46} la esterificación del alcohol **13** se realizó con el método del anhídrido mixto, formado mediante catálisis ácida con anhídrido trifluoroacético y el ácido carboxílico aromático correspondiente obteniendo así los ésteres **14 a-e**, cuyos rendimientos y propiedades espectroscópicas se describen a continuación:



a: X=H b: X=CH₃ c: X=Br
d: X=Cl e: X=F

Los espectros de IR de cada uno de los ésteres antes mencionados muestran la ausencia de la banda correspondiente al grupo funcional alcohol y en cambio se observa una banda intensa en 1711 cm^{-1} para carbonilo y la banda en 1287 cm^{-1} para el enlace C-O-C, características para un éster. Por otra parte, los espectros de UV muestran 2 máximos de absorción, uno de ellos en la región de 232-242 nm y el otro en 282 nm que corresponden a los siguientes grupos cromóforos.

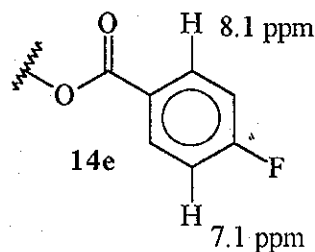
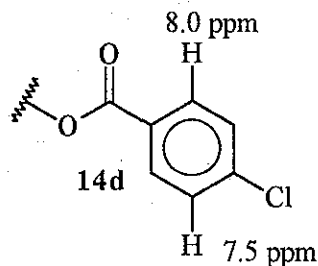
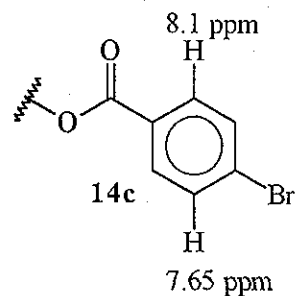
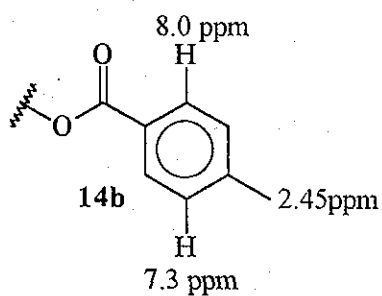
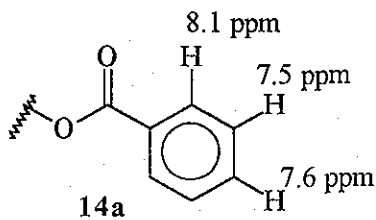


En los espectros de RMN de ^1H (Espectros IA-IVA) de los ésteres 14 a-e existen desplazamientos químicos similares como los siguientes:

- 1.- Los metilos en C-18, C-19 y C-21 aparecen en 0.87, 1.16 y 2.0 ppm respectivamente como señales simples que integran para tres hidrógenos cada uno.
- 2.- En 1.0 ppm se observa una señal doble ($J=7.0\text{ Hz}$) que integra para tres protones y que se adjudica al metilo unido al C-16.
- 3.- En 6.14 ppm se muestra una señal simple que integra para 2 protones y que corresponden a los protones 6 y 7.
- 4.- En 5.7 ppm se presenta una señal simple que integra para 1 protón y que se adjudica al protón 4.

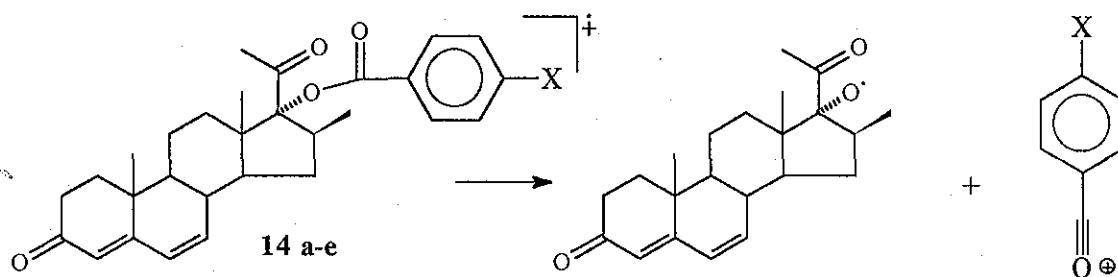
Las diferencias residen en los protones del anillo aromático, los cuales se observan como un sistema A_2B_2 y que se muestran en el siguiente diagrama:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Desplazamientos en RMN de ^1H de los ésteres 14a-e

Los espectros de Masas de los compuestos 14 a-e muestran que la pérdida del ion oxonio produce el pico base.



X=H, 14a, M^+ : 446

X=CH₃, 14b, M^+ : 460

X=Br, 14c, $M^+ + 2$: 526, M^+ : 524

X=Cl, 14d, $M^+ + 2$: 482, M^+ : 480

X=F, 14e, M^+ : 464

X=H, 105 m/z

X=CH₃, 119 m/z

X=Br, 183, 185 m/z

X=Cl, 139 m/z

X=F, 123 m/z

Espectrometría de Masas de los compuestos 14a-e

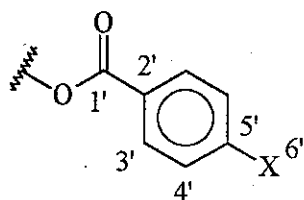
Por otra parte, en los espectros (IB-IVB) de RMN de ^{13}C de los ésteres **14 a-e**, se observa que los carbonilos en C-3 y C-20 aparecen a 199.3 y 204.2 ppm respectivamente. Los carbonos vinílicos de las posiciones 4, 6 y 7 se observan en 123.8, 128.1 y 140.1 ppm respectivamente. Los metilos 18, 19 y 21 se visualizan en 16.3, 19.7 y 20.3 ppm cada uno. El metilo que esta unido al carbono 16 aparece en 15.0 ppm. El carbonilo del éster y el carbono 17 aparecen en el intervalo de 165.8-167.0 ppm y 95.8-97.3 ppm respectivamente.

Los datos de RMN de ^1H y de ^{13}C de los compuestos **14 a-e**, se condensa en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla No. 1 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de los compuestos **14 a-e**

	14 a	14 b	14 c	14 d	14 e
	H	Me	Br	Cl	F
H - 19	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H
H - 18	0.87 s, 3H	0.87 s, 3H	0.86 s, 3H	0.86 s, 3H	0.86 s, 3H
H - 21	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H
H - 16'	1.0 d,7 Hz 3H	1.0 d,7 Hz 3H	1.0 d,7 Hz 3H	1.0 d,7 Hz 3H	1.0 d,7 Hz 3H
H - 6, 7	6.14 s, 2H	6.14 s, 2H	6.12 s, 2H	6.12 s, 2H	6.12 s, 2H
H - 4	5.7 s, 1H	5.7 s, 1H	5.7 s, 1H	5.7 s, 1H	5.7 s, 1H
H - 4'	7.51 m, 2H	7.27 m, 2H	7.65 m, 2H	7.48 m 2H	7.1 m, 2H
H - 3'	8.1 m, 2H	8.0 m, 2H	8.0 m, 2H	8.0 m, 2H	8.1 m, 2H
H - 5'	7.6 m, 1H	----	----	----	----
H - 6'	----	2.45 s 3H	----	----	----
Espectro	Ref. 50-1	IA	IIA	IIIA	IVA

Referencia TMS 300 MHz Disolvente CDCl_3 Desplazamientos en ppm



a: X=H, b: X=Me, c: X=Br, d: X=Cl, e: X=F

Tabla No. 2 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C de los compuestos 14 a-e

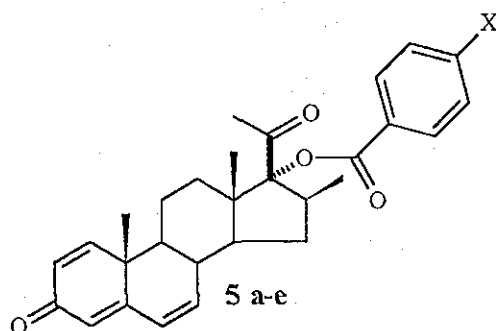
	14a	14b	14c	14d	14e
	H	Me	Br	Cl	F
C - 3	199.3 s	199.4 s	199.3 s	199.3 s	199.3 s
C - 20	204.8 s	204.4 s	203.9 s	204.1 s	204.0 s
C - 1'	166.9 s	166.6 s	171.3 s	165.9 s	165.9 s
C - 4	123.8 d	123.8 d	123.8 d	123.8 d	123.8 d
C - 5	163.1 s	163.2 s	163.0 s	163.1 s	163.1 s
C - 6	128.1 s	128.2 s	128.2 s	128.1 s	128.1 s
C - 7	139.9 d	140.3 d	140.0 d	140.1 d	140.1 d
C - 2'	128.6 s	127.3 s	128.9 s	128.6 s	125.8 s
C - 5'	133.6 s	144.5 s	127.6 s	139.1 s	167.4 s
C - 18	16.3 c	16.4 c	16.4 c	16.4 c	16.3 c
C - 19	18.8 c	19.8 c	19.7 c	19.7 c	19.7 c
C - 21	20.3 c	20.4 c	20.2 c	20.2 c	20.3 c
C - 16'	14.7 c	15.0 c	15.0 c	15.0 c	15.0 c
C - 6'	----	21.7 c	---	---	---
Espectro	Ref. 50-1	IB	IIB	IIIB	IVB

Disolvente: CDCl_3 Referencia: TMS

El último paso en la síntesis, consistió en la introducción de una doble ligadura entre los carbonos 1 y 2 de los compuestos **14 a-e**. Se consultó la literatura para revisar los métodos disponibles para realizar la introducción del doble enlace y estos son algunos de los métodos más utilizados.⁵²

- 1.- Deshidrogenación con cloranilo en medio ácido.
- 2.- Halogenación-Deshidrohalogenación.
- 3.- Deshidrogenación con MnO_2 .
- 4.- Deshidrogenación con DDQ.
- 5.- Deshidrogenación con SeO_2

El procedimiento experimental con cloranilo y medio ácido no es conveniente, porque el sistema que se obtendría (1,4,6-trien-3-ona) podría experimentar una transposición del tipo dienona-fenol. La halogenación-deshidrohalogenación podría halogenar al C-21 (posición α al carbonilo en C-20), luego entonces no es recomendable. Utilizando MnO_2 y SeO_2 podrían ocurrir oxidaciones alílicas. Por lo tanto la deshidrogenación se realizó con DDQ, porque los antecedentes en la literatura indican que la reacción procede con éxito, además de que es un reactivo comercialmente asequible.⁵³ Los productos así obtenidos son los ésteres **5 a-e**.



a: X=H b: X=CH₃ c: X=Br
d: X=Cl e: X=F

Los espectros de IR de estos compuestos muestran las bandas en 1713 y 1285 cm^{-1} características para el grupo funcional éster, además se observa una señal en 1654 cm^{-1} para el carbonilo α , β , γ , σ , α' , β' insaturado. Los espectros de UV muestran 2 máximos de absorción, uno de ellos en el rango de 230-248 nm y el otro en 298 nm.

Por otra parte, el patrón de fragmentación en los espectros de Masas de estos compuestos, es idéntico al ya explicado para las diendionas **14 a-e** (página 18), con la salvedad de que los compuestos **5 a-e** presentan dos unidades menos de la relación m/z.

Los espectros de RMN de ^1H (Espectros VA-IXA) muestran los siguientes desplazamientos químicos en común:

- 1.- Los metilos en C-18, C-19 y C-21 aparecen en 0.87, 1.16 y 2.0 ppm como señales simples que integran para tres hidrógenos cada uno.
- 2.- En 1.0 ppm se observa una señal doble ($J=7.0$ Hz) que integra para tres protones y que se adjudica al metilo unido al C-16.
- 3.- En 7.0 ppm una señal doble ($J=10.2$ Hz) que integra para un hidrógeno y que se asigna al protón 1.
- 4.- En 6.26 ppm se localiza una señal múltiple ($J=7$ y 10 Hz) que integra para dos hidrógenos y que corresponden a los protones 2 y 4.
- 5.- En 6.01 y 6.06 ppm se observan dos señales simples que integran cada una para un hidrógeno y que se adjudican a los protones 6 y 7 respectivamente.

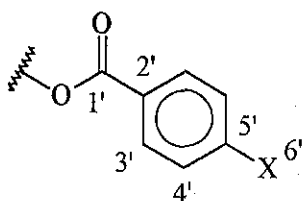
Los desplazamientos químicos de los protones aromáticos de cada uno de los diferentes ésteres son idénticos a los ya discutidos previamente para los ésteres **14 a-e**. (página 18).

Los datos de RMN de ^1H y de ^{13}C de los compuestos **5 a-e**, se condensan en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla No. 3 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de los compuestos 5 a-e

	5 a	5 b	5 c	5 d	5 e
	H	Me	Br	Cl	F
H - 1	7.07 d, 1H J = 10.2 Hz	7.07 d, 1H J = 10.2 Hz	7.02 d, 1H J = 10.2 Hz	7.03 d, 1H J = 10.2 Hz	7.03 d, 1H J = 10.2 Hz
H - 2	6.26 m, 2H	6.26 m, 2H	6.26 m, 2H	6.26 m, 2H	6.26 m, 2H
H - 4	J=7,10 Hz	J=7,10 Hz	J=7,10 Hz	J=7,10 Hz	J=7,10 Hz
H - 6	6.01 s, 1H	6.01 s, 1H	6.01 s, 1H	6.01 s, 1H	6.01 s, 1H
H - 7	6.06 s, 1H	6.05 s, 1H	6.04 s, 1H	6.06 s, 1H	6.06 s, 1H
H - 18	0.87 s, 3H	0.88 s, 3H	0.88 s, 3H	0.89 s, 3H	0.89 s, 3H
H - 19	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H	1.16 s, 3H
H - 16'	1.0 d, 1H J= 7.2 Hz	1.0 d, 1H J= 7.2 Hz	1.0 d, 1H J= 7.2 Hz	1.0 d, 1H J= 7.2 Hz	1.0 d, 1H J= 7.2 Hz
H - 21	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H	2.0 s, 3H
H - 3'	8.1 m, 2H	8.0 m, 2H	8.0 m, 2H	8.0 m, 2H	8.1 m, 2H
H - 4'	7.51 m, 3H	7.27 m, 2H	7.65 m, 2H	7.49 m, 2H	7.1 m, 2H
H - 5'	7.6 m, 1H	----	----	----	----
H - 6'	----	2.45 s, 3H	----	----	----
Espectro	VA	VIA	VIIA	VIIIA	IXA

Referencia TMS 300 MHz Disolvente CDCl_3 Desplazamientos químicos en ppm.



a: X=H, b: X=Me, c: X=Br, d: X=Cl, e: X=F

**Tabla No. 4 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C
de los compuestos 5 a-e**

	5 a	5 b	5 c	5 d	5 e
	H	Me	Br	Cl	F
C - 1	152.42 d	152.6 d	152.4 d	152.4 d	152.6 d
C - 2	128.7 d	129.4 d	129.0 d	129.0 d	128.3 d
C - 3	186.21 s	186.2 s	186.21 s	186.3 s	186.2 s
C - 4	128.3 d	128.3 d	128.3 d	128.0 d	128.2 d
C - 5	162.0 s	162.1 s	162.0 s	162.0 s	162.0 s
C - 6	123.9 d	124.0 d	124.0 d	124.0 d	124.0 d
C - 7	133.6 d	137.6 d	132.1 d	131.0 d	132.4 d
C - 16'	15.1 c	15.1 c	14.2 c	14.8 c	15.1 c
C - 18	18.8 c	18.8 c	18.7 c	18.7 c	18.7 c
C - 19	19.8 c	19.7 c	19.7 c	19.7 c	19.7 c
C - 20	204.1 s	204.3 s	206.3 s	203.9 s	204.0 s
C - 1'	166.8 s	166.5 s	171.1 s	165.6 s	165.5 s
C - 2'	128.3 s	128.2 s	128.3 s	128.3 s	128.3 s
C - 5'	133.6 d	144.5 s	127.9 s	137.1 s	167.8 s
C - 6'	----	21.4 c	----	----	----
C - 21	20.8 c	20.8 c	21.0 c	21.0 c	20.7 c
Espectro	VA	VIA	VIIA	VIIIA	IXA

Disolvente: CDCl_3 Referencia: TMS

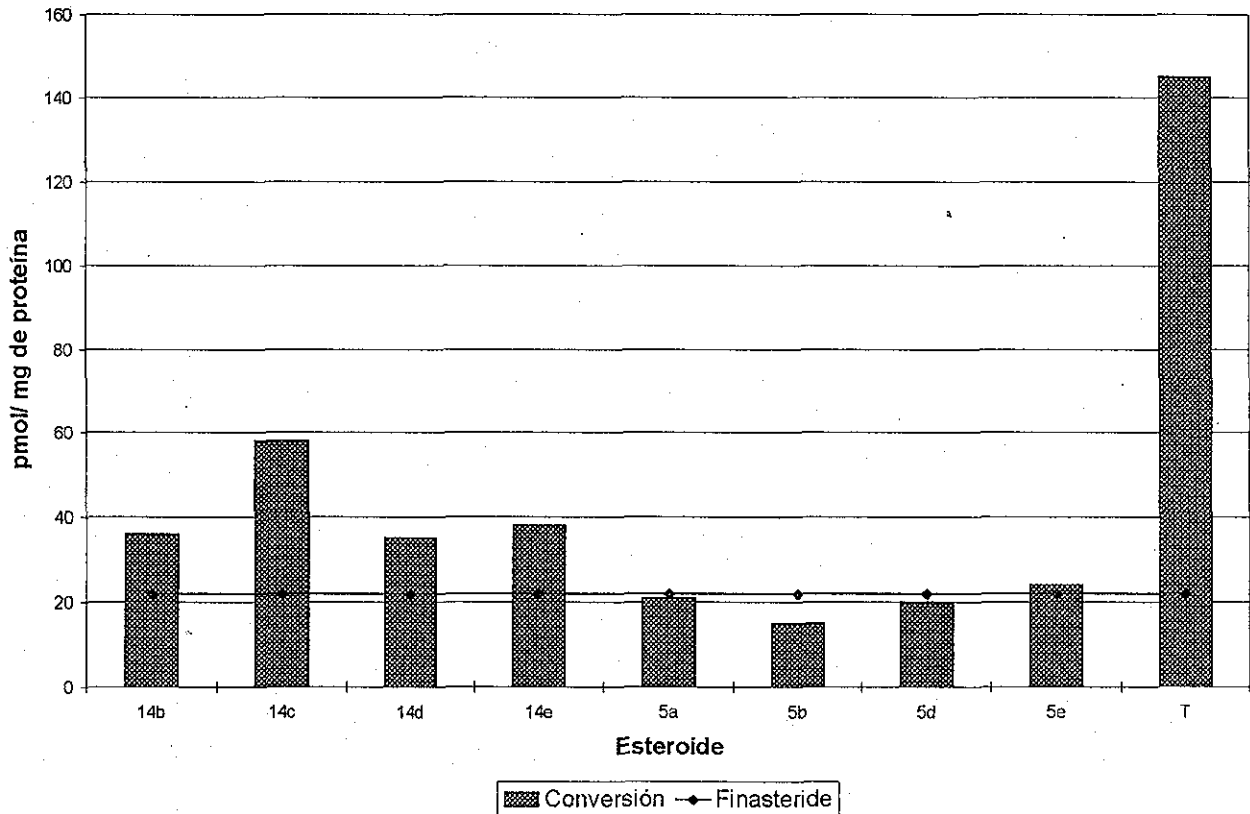
Desplazamientos químicos en ppm

Los ésteres 14 b-e y 5 a-e son nuevos y representan una aportación al área de los inhibidores de la enzima 5α -reductasa y fueron evaluados en un estudio metabólico *in vitro* con las vesículas seminales de hámsters machos castrados y así se conoció el efecto del esteroide en la velocidad de formación de dihidrotestosterona 2,^{33,54} catalizada por la isoforma II de la enzima 5α -reductasa

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los resultados se muestran en el siguiente diagrama:

Diagrama No.1
Efecto de los esteroides en la conversión *in vitro* de
 [³H]T en [³H] DHT en vesículas seminales de hamsters machos castrados



Conclusiones de la Primera parte:

En la gráfica anterior se puede observar lo siguiente:

- Las triendionas 5 a, b, d y e disminuyeron en mayor medida la velocidad de formación de DHT en comparación a las diendionas 14 a, c, d y e.
- Las triendionas 5 a, b y d disminuyeron con mayor efectividad la velocidad de formación de DHT que finasterida, esto significa que son inhibidores más potentes que finasterida siendo el compuesto 5 b el mejor de ellos.

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de Infrarrojo se determinaron en el espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600. Las determinaciones se realizaron en película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se determinaron en el aparato de RMN Varian VXR-300s, utilizando TMS como referencia interna. Las muestras se disolvieron en CDCl_3 . Los desplazamientos químicos están dados en ppm.

El análisis por Espectrometría de Masas se realizó en un Espectrómetro de Masas HP 5985-b CG/MS. por la técnica de impacto electrónico. Los valores se expresan en relación m/z (masa / carga).

Los espectros de absorción en el Ultravioleta se realizaron en el Espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, utilizando metanol como disolvente.

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

El compuesto final fue purificado por cromatografía en capa fina (C.C.F) utilizando gel de sílice Merck 7730, gel de sílice 60 GF254 y gel de sílice 60 G.

Procedimiento experimental de la Primera parte.

Síntesis de 17 α -benzoiloxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona (14a-e).

Procedimiento general.- En un matraz bola de 50 ml se colocaron 5 mmoles de anhídrido trifluoroacético, 5 mmoles del ácido carboxílico correspondiente y 0.7 mmoles de ácido *para*-toluensulfónico; la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 mmol del compuesto **13** y se agitó dos horas más. A continuación, la reacción se neutralizó con una disolución de NaOH al 10% y se extrajo con cloroformo (3 X 20 ml). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se destiló. Los ésteres se purificaron por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano-AcOEt 80:20.³³ Los rendimientos de cada éster, así como sus características físicas y espectroscópicas se localizan en las Tablas No. 1-2 y 5-7.

Tabla No. 5 Datos de IR y UV de los compuestos 14 a-e

	X	IR cm ⁻¹	UV nm
14 a	H ⁵⁰⁻¹	2948, 1714, 1660, 1614, 1285, 1108, 754	232, 282
14 b	CH ₃	2947, 1711, 1664, 1617, 1287, 1140, 771	243, 282
14 c	Br	2943, 1716, 1661, 1616, 1288, 1101, 758	250, 282
14 d	Cl	2944, 1715, 1660, 1616, 1290, 1102, 760	244, 282
14 e	F	2944, 1710, 1659, 1613, 1287, 1105, 756	234, 282

Tabla No. 6 Puntos de fusión y rendimientos de los compuestos 14 a-e

	X	P f °C	Rendimiento
14 a	H	155 – 157	38.0 %
14 b	CH ₃	195 – 197	46.4 %
14 c	Br	115 – 119	35.0 %
14 d	Cl	165 – 168	43.1 %
14 e	F	200 – 202	40.1 %

Tabla No. 7 Espectrometría de masas de los compuestos 14 a-e

	X	Espectrometría de Masas
14 a	H ⁵⁰⁻¹	446 M ⁺ (18), 403 (20), 324 (22), 281 (40), 105 (100)
14 b	CH ₃	460 M ⁺ (10), 417 (20), 324 (12), 281 (40), 119 (100)
14 c	Br	524 M ⁺ (16) 526 M ⁺ + 2 (17), 481 (25), 483 (26), 324 (26), 281 (70), 183 (99), 185 (100)
14 d	Cl	480 M ⁺ (12) 482 M ⁺ + 2 (5), 437 (15), 324 (20), 281 (40), 139 (100)
14 e	F	464 M ⁺ (20), 421 (40), 324 (20), 281 (60), 242 (20), 123 (100)

Síntesis de 16β-metil-1,4,6-pregnatrien-17α-benzoiloxi-3,20-diona (5a-e).

Procedimiento general.- En un matraz de 100 ml de dos bocas, provisto con un refrigerante en posición de reflujo, se disolvió 1 mmol de cada éster en 60 ml de dioxano seco y se adicionaron 3 mmoles de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) en tres partes (1mmol X 3). La reacción se calentó a reflujo durante 16 horas y posteriormente se adicionaron 50 ml de una disolución de NaOH al 10 % y se extrajo con cloroformo (3 X 50 ml). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente fue destilado. Los ésteres fueron purificados por cromatografía en capa fina.³⁸ Los rendimientos de cada éster y sus características físicas y espectroscópicas se localizan en las Tablas No. 3-4 y 8-9.

Tabla No. 8 Datos de IR y UV de los compuestos 5 a-e

	X	IR cm ⁻¹	UV nm
5 a	H	2946, 1713, 1654, 1601, 1285, 1107, 754	230, 295
5 b	CH ₃	2948, 1714, 1654, 1604, 1287, 1107, 754	242, 299
5 c	Br	2942, 1714, 1651, 1603, 1289, 1102, 762	248, 298
5 d	Cl	2944, 1715, 1652, 1604, 1290, 1091, 764	243, 298
5 e	F	2946, 1714, 1652, 1603, 1287, 1106, 756	229, 298

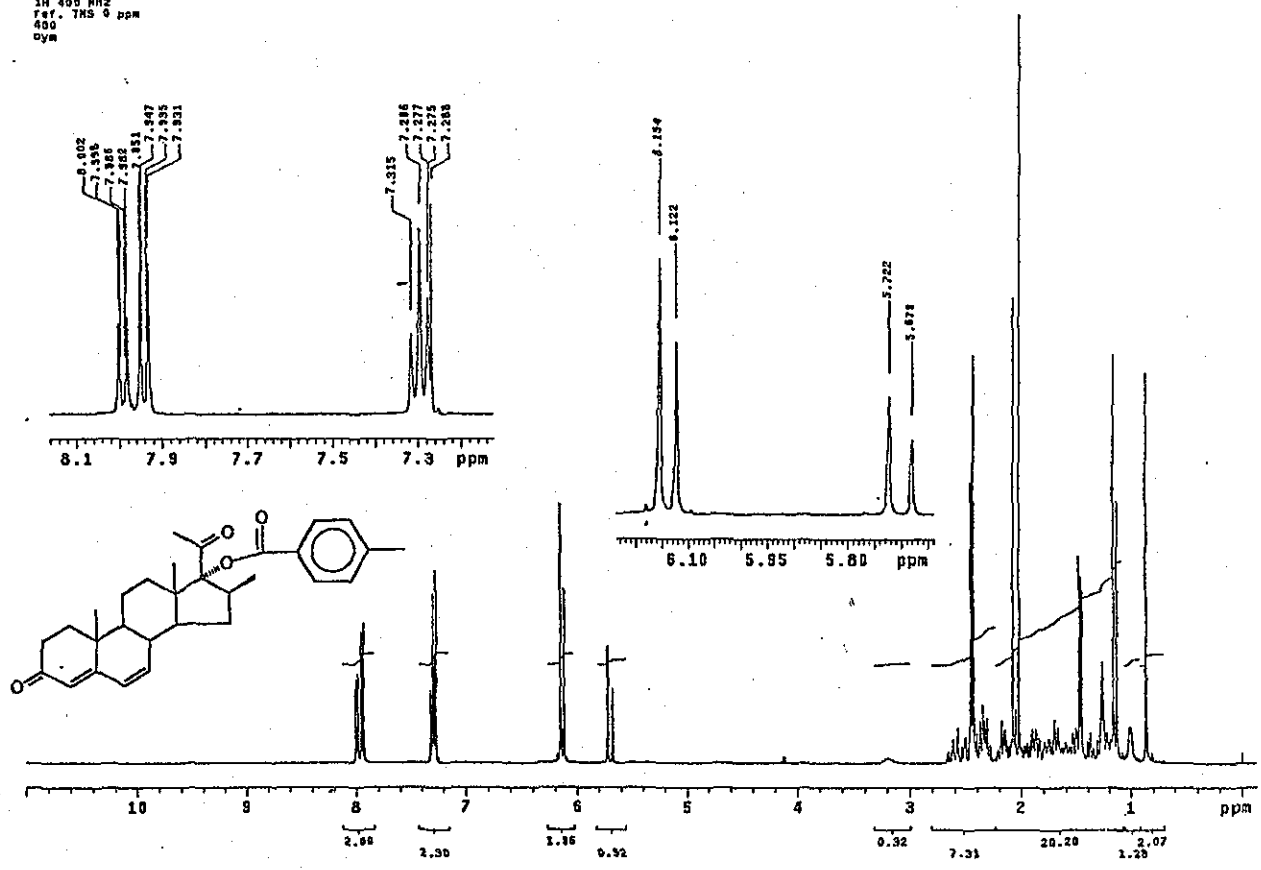
Tabla No. 9 Puntos de fusión y rendimientos de los compuestos 5 a-e

	X	P f °C	Rendimiento
5 a	H	195 - 199	52.0 %
5 b	CH ₃	186 - 189	48.0 %
5 c	Br	126 - 129	46.0 %
5 d	Cl	124 - 127	49.0 %
5 e	F	158 - 161	45.0 %

Evaluación farmacológica

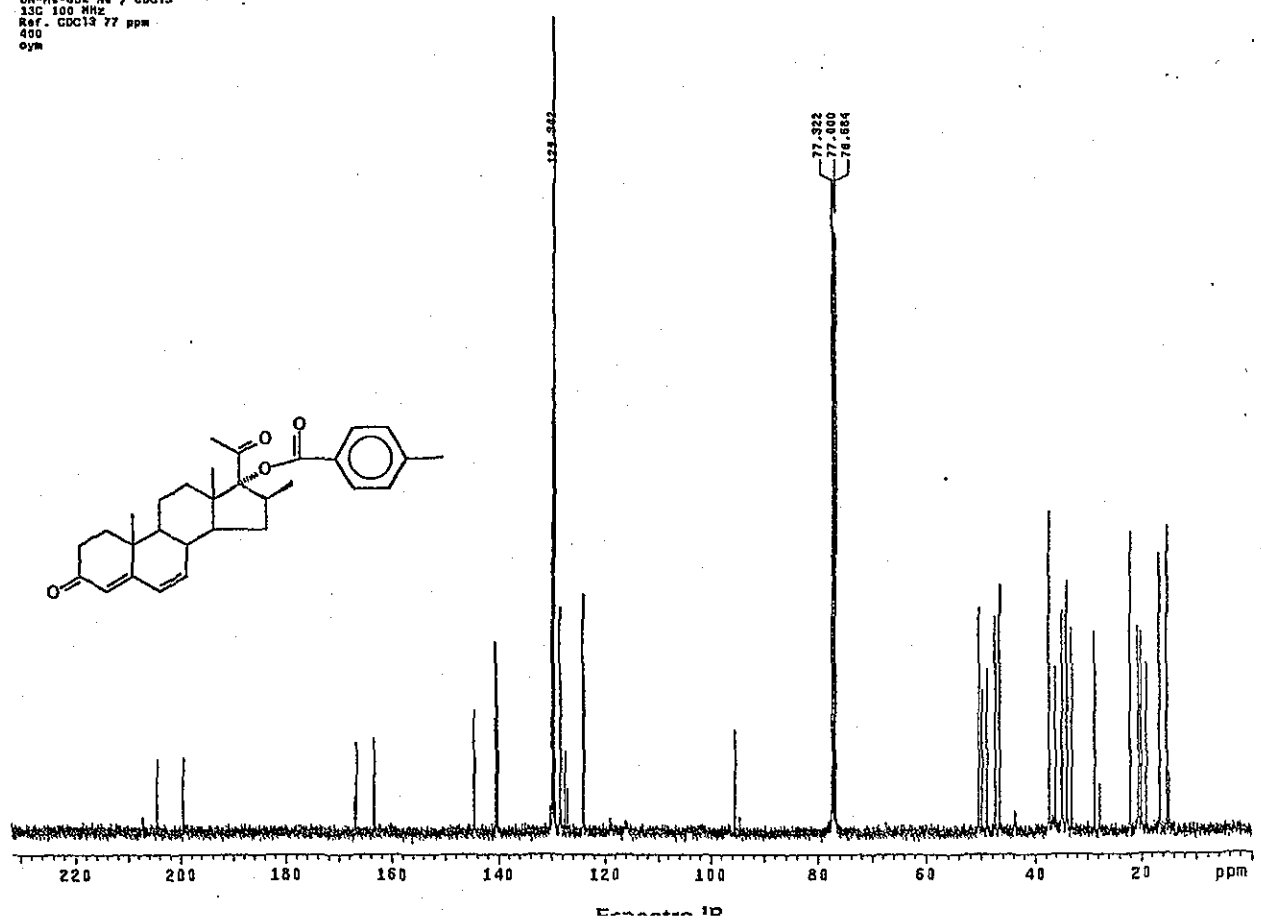
Para determinar la actividad biológica de los esteroides, se realizó el estudio metabólico *in vitro* con las vesículas seminales, así se conoció el efecto del esteroide en la velocidad de formación de dihidrotestosterona 2.^{33,54} En este bioensayo los esteroides a analizar se incubaron con homogenados de vesículas seminales (pH=6, con disolución amortiguadora de fosfatos), testosterona tritiada y NADPH a 37 °C por 1 hora. El control fue la incubación sin tejido. La incubación terminó por adición de diclorometano y el esteroide tritiado se extrajo con el mismo disolvente. La proteína se determinó por el método de Bradford.⁵⁴ La purificación de los productos tritiados se realizó por TLC, se midió la radioactividad y se expresó en pmol de DHT / g proteína/ hora. Con este tipo de prueba se analizó la isoforma II de la enzima (próstata y testículos).

USAI
17 Abril 2001
Dr. Eugenio Bratsloff / Eugenio A. Flores
DN-Ms-082Me / CDCl3
1H 400 MHz
Ref. TMS 0 ppm
400
oym



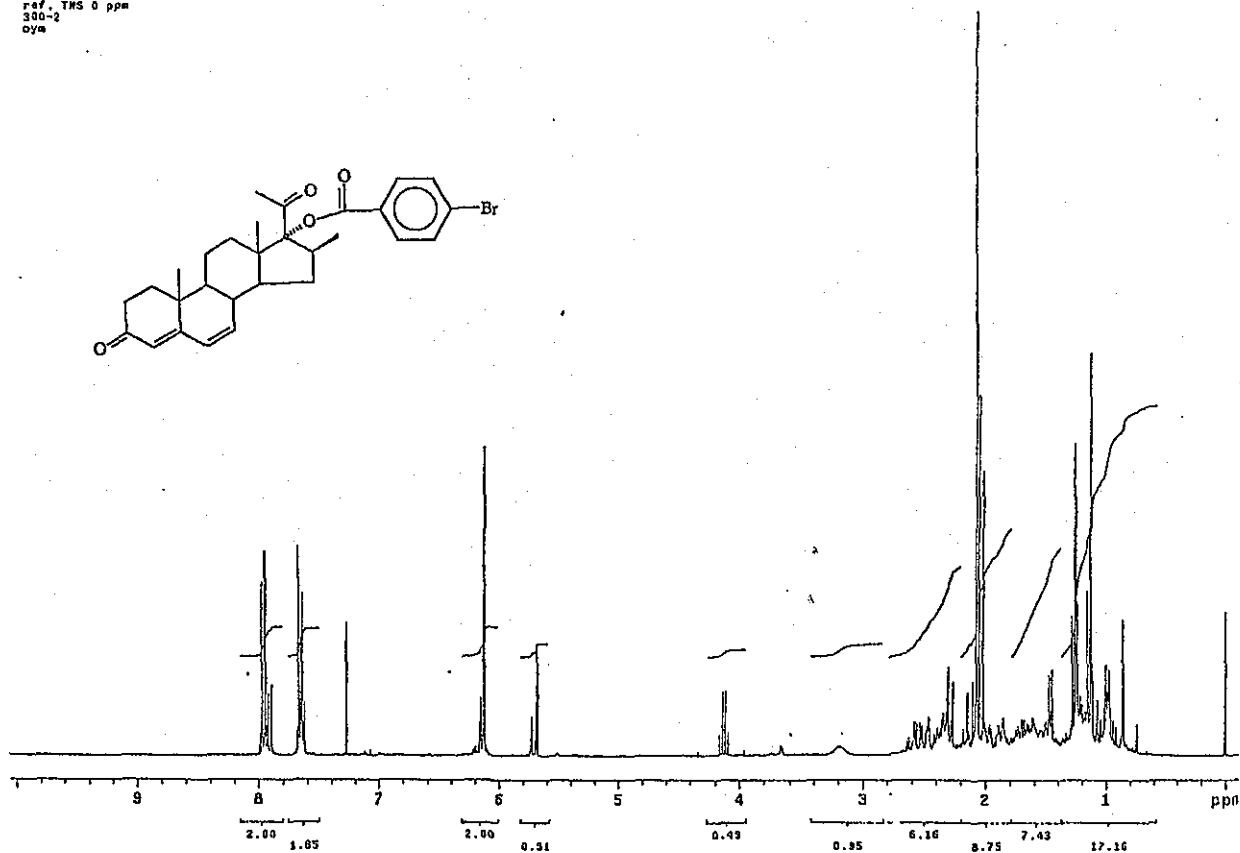
Espectro IA

USAI
17 febrero 2001
Dr. Eugenio Bratsloff / Eugenio Flores
DN-Ms-082-Me / CDCl3
13C 100 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
400
oym



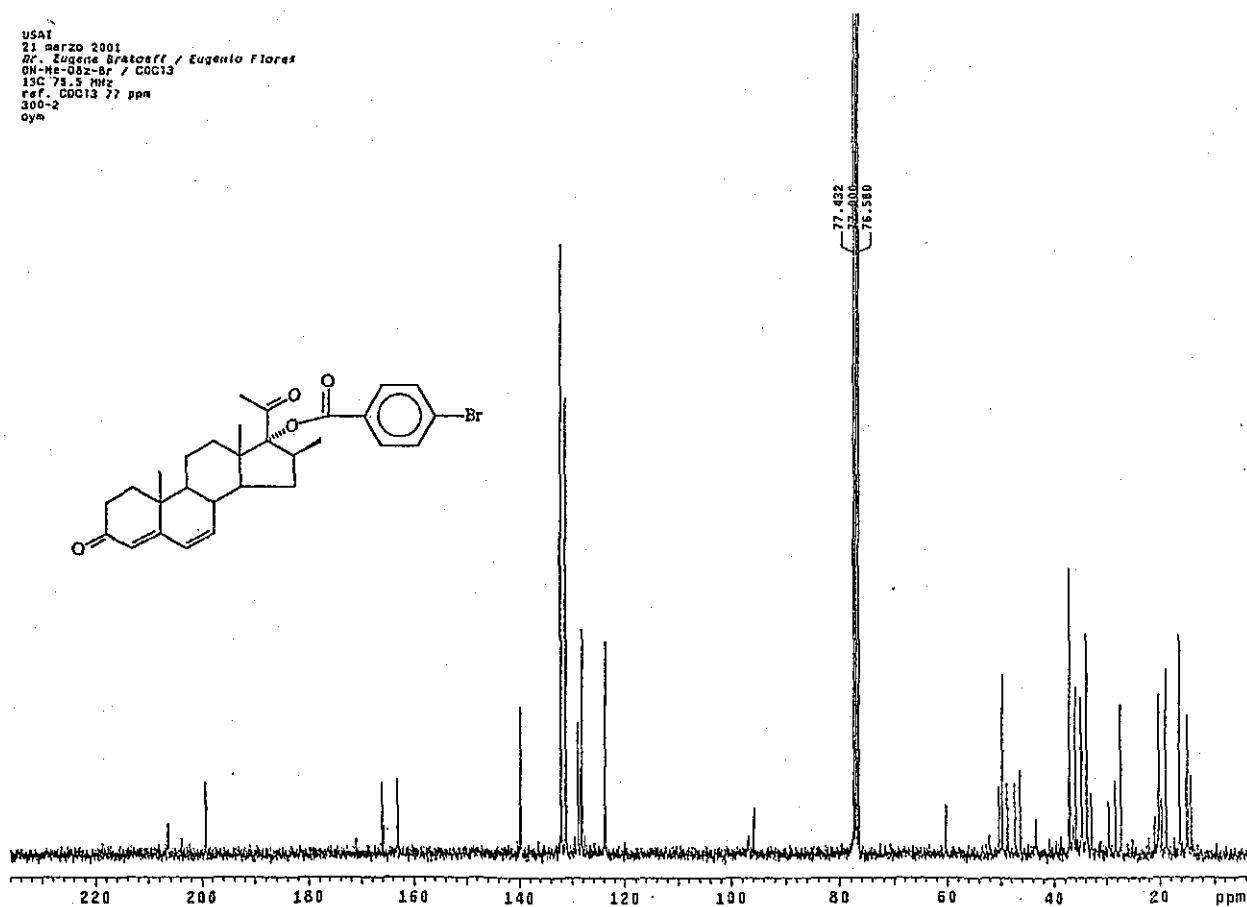
Espectro IB

USA1
21 marzo 2001
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
OH-Me-OBz-Br / CDCl₃
1H 299.7 MHz
ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



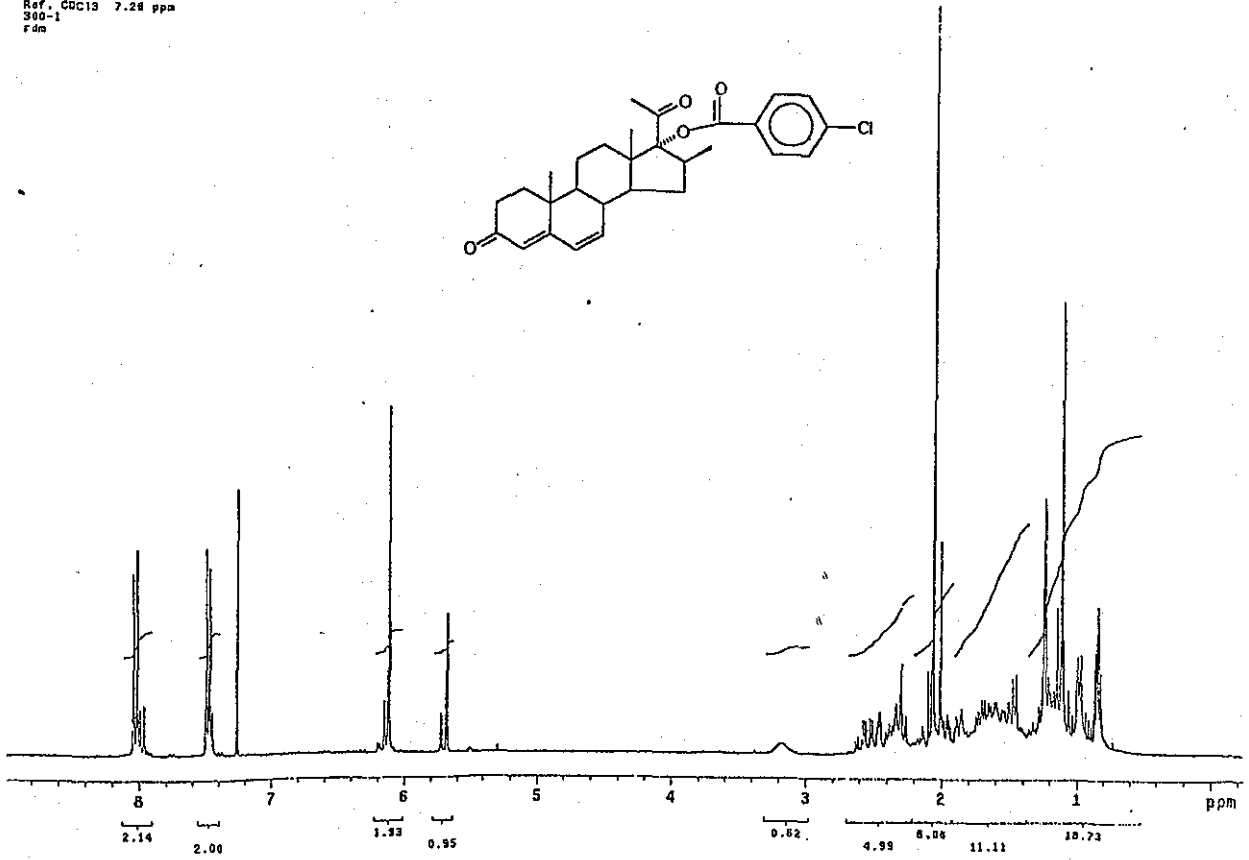
Espectro IIA

USA1
21 marzo 2001
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
OH-Me-OBz-Br / CDCl₃
13C 78.5 MHz
ref. CDCl₃ 77 ppm
300-2
oym



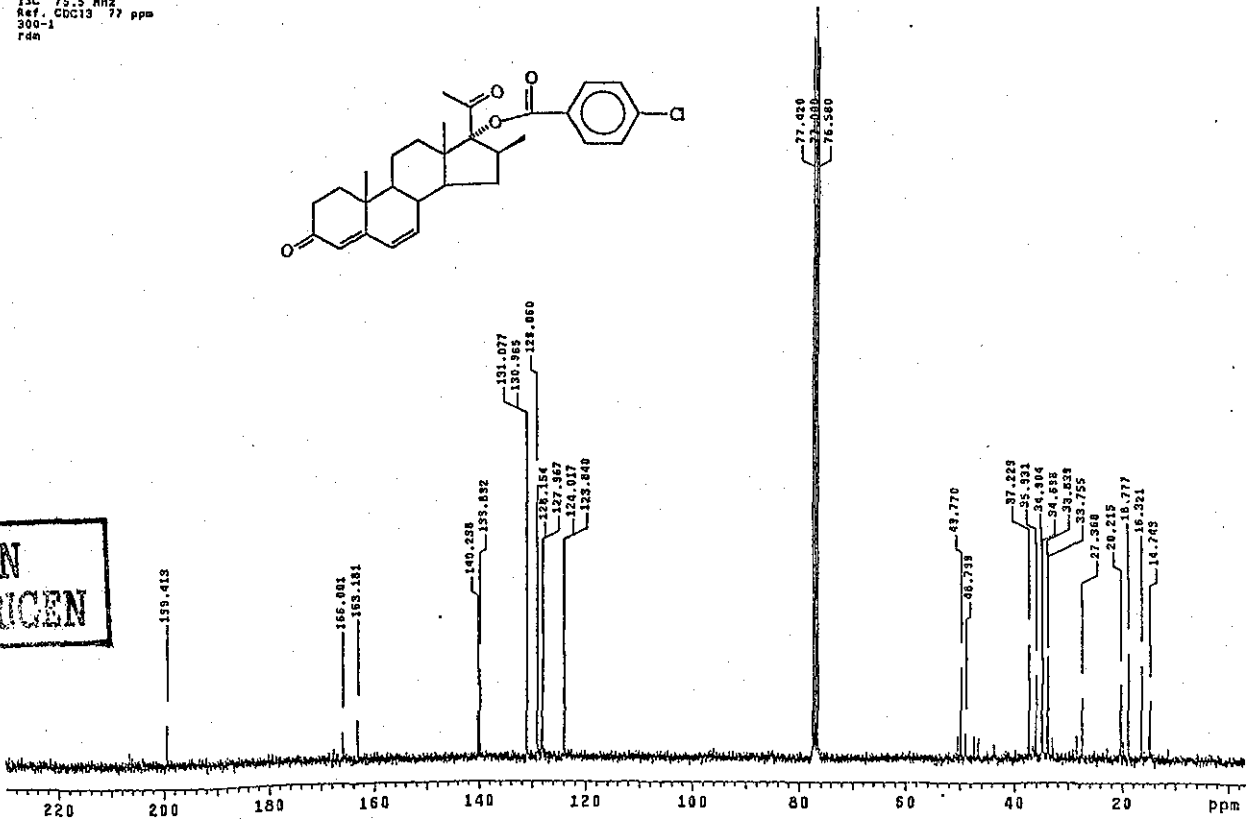
Espectro IIB

USA1
13/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
DN-Me-082-Cl/CDC13
IH 300.2 MHz
Ref. CDC13 7.26 ppm
300-1
rdm



Espectro IIIA

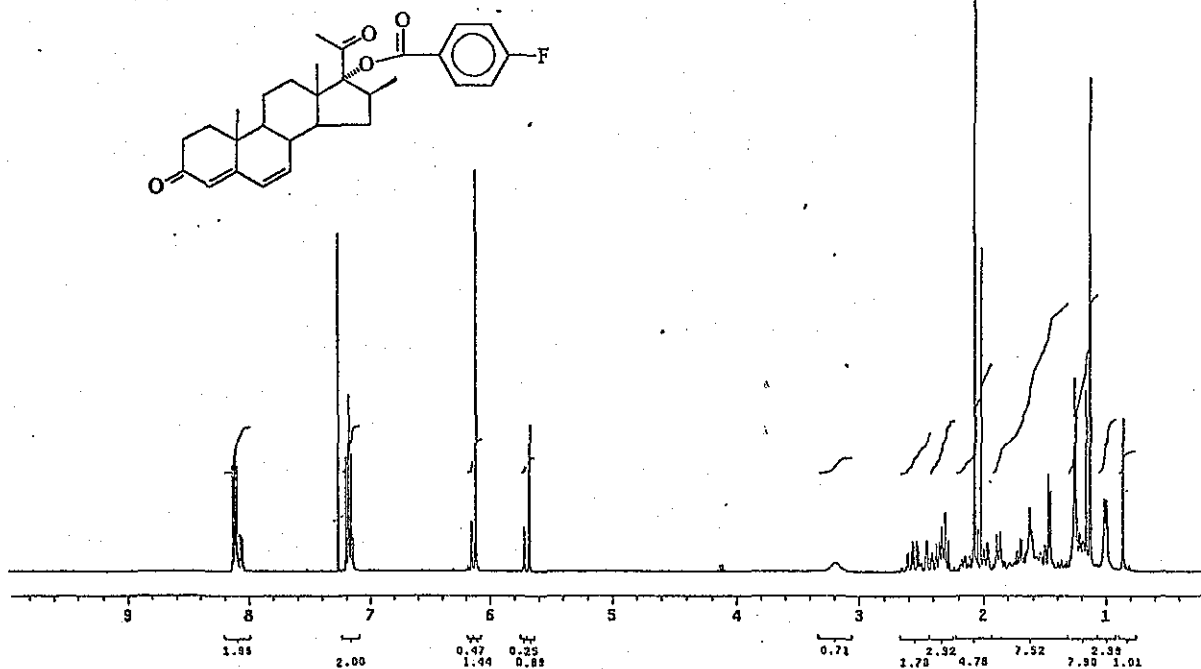
USA1
13/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
DN-Me-082-Cl/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
rdm



Espectro IIIB

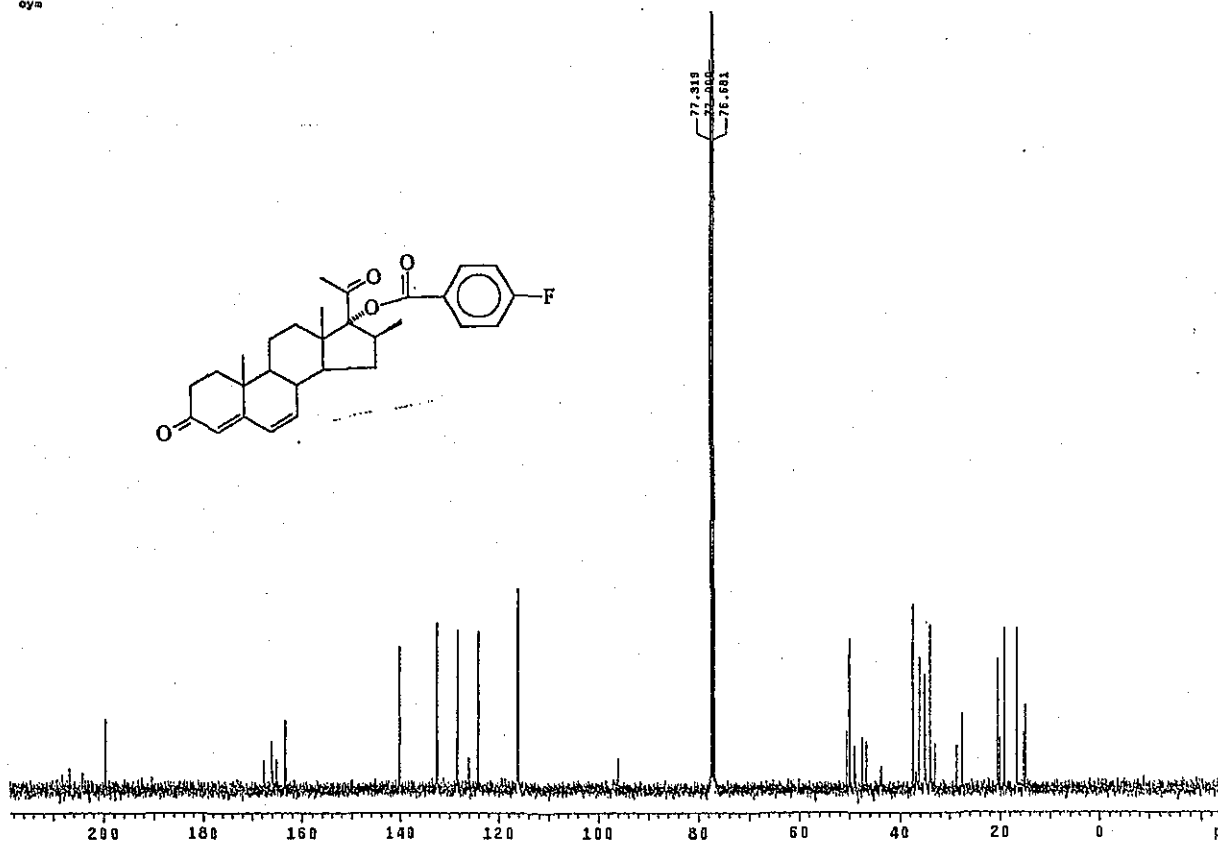
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USA1
23 abril 2001
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
DN-Me-0B2-F / CDCl3
1H 400 MHz
Ref. TMS 0 ppm
400
oym



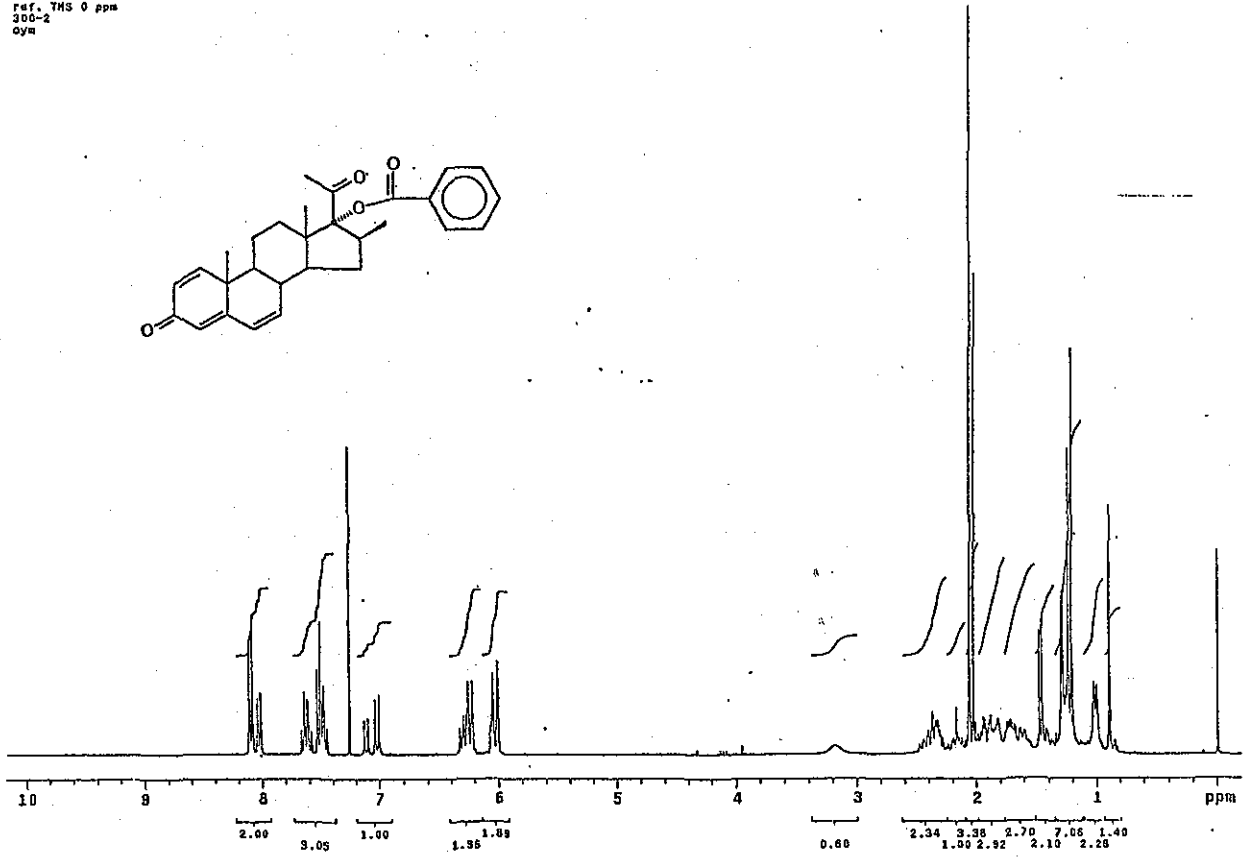
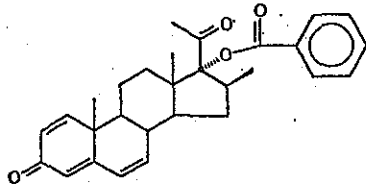
Spectro IVA

USA1
20 abril 2001
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
DN-Me-0B2-F / CDCl3
13C 100 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym



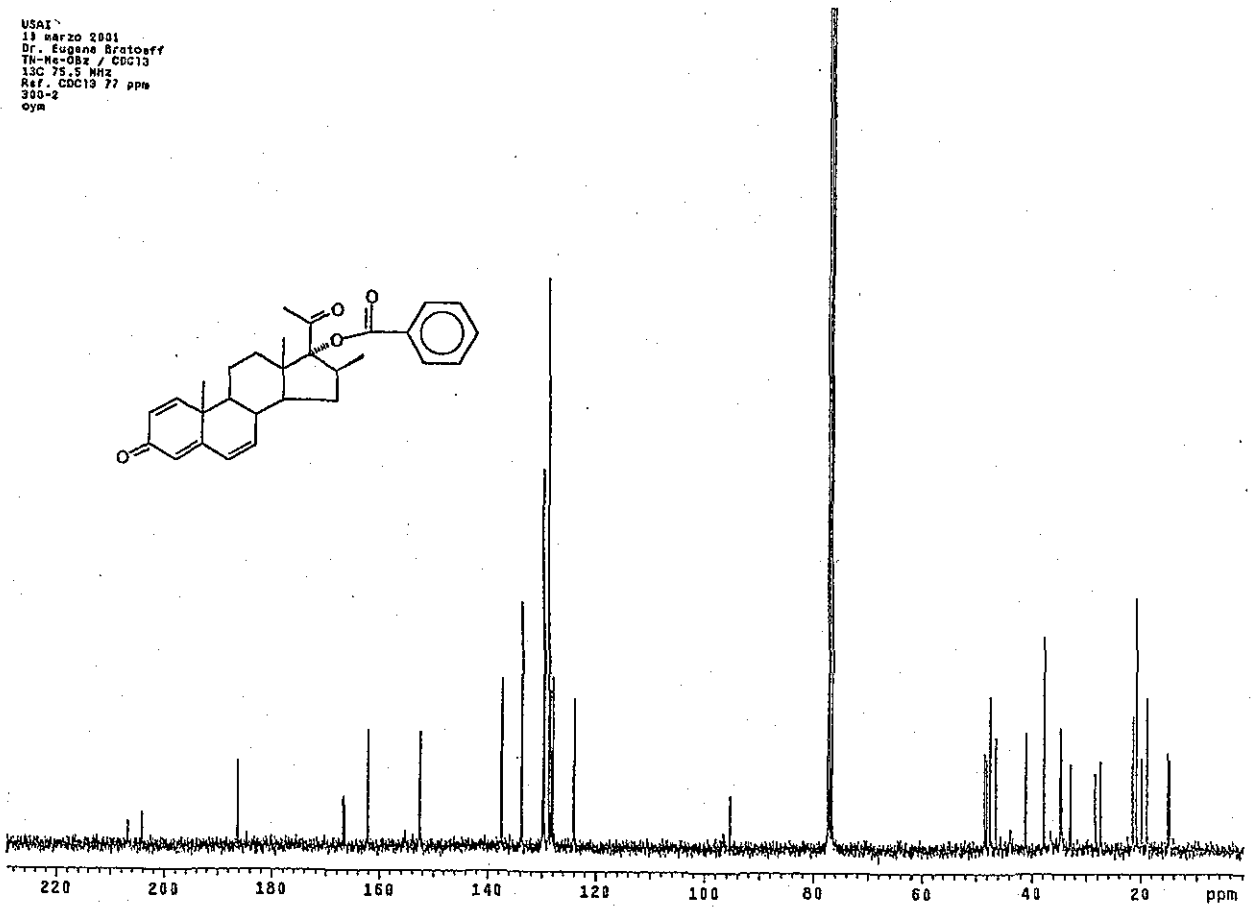
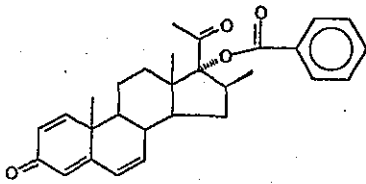
Spectro IVB

USAI
13 marzo 2001
Dr. Eugene Bratoeff
TH-Me-08z / CDCl3
JH 293.7 MHz
ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



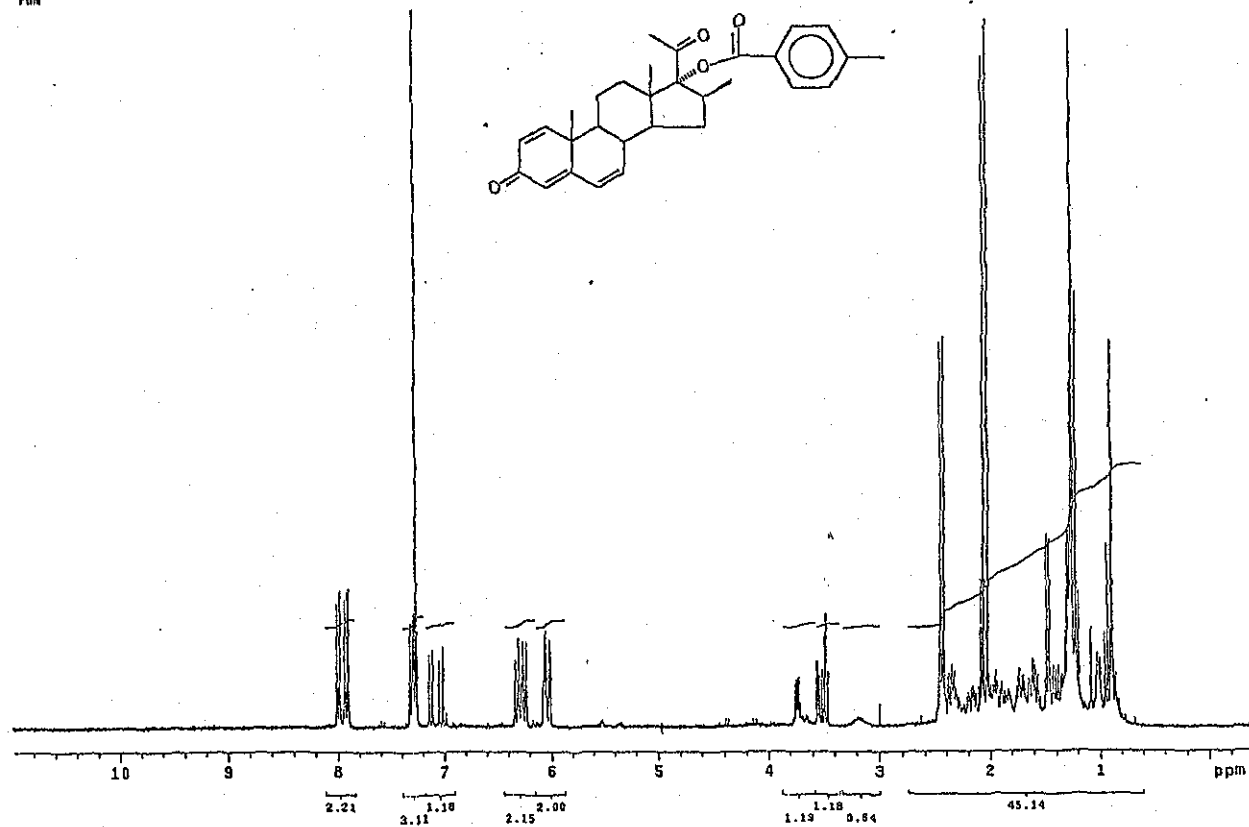
Espectro VA

USAI
13 marzo 2001
Dr. Eugene Bratoeff
TH-Me-08z / CDCl3
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-2
oym



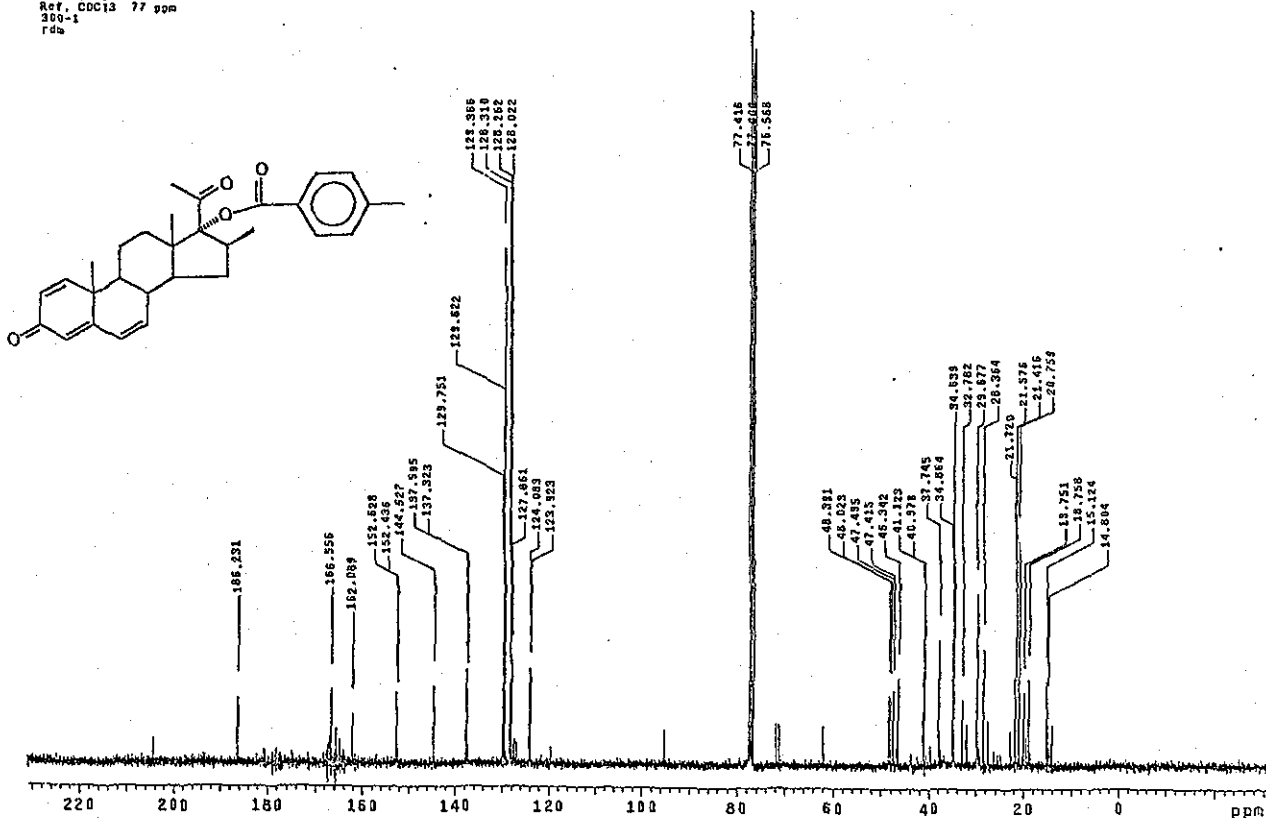
Espectro VB

USAI
 03/MAYO/2001
 Dr. Eugene Bratoeff/Eugenio Flores
 TN-Me-052-Me/CDC13
 1H 300.2 MHz
 300-1
 Ref. CDCl3 7.26 ppm
 rdm



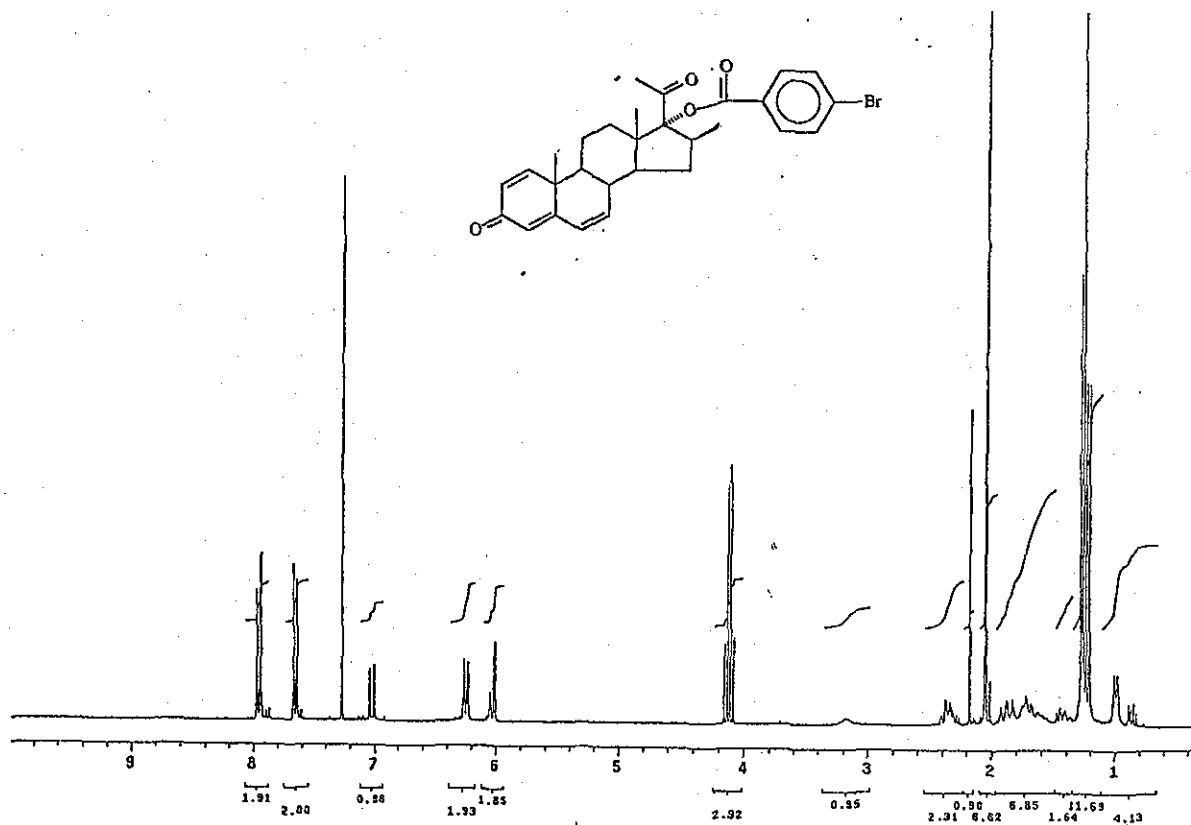
Espectro VIA

USAI
 Dr. Eugene Bratoeff/Eugenio A. Flores
 TN-Me-052-Me/CDC13
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDCl3 77 ppm
 300-1
 rdm



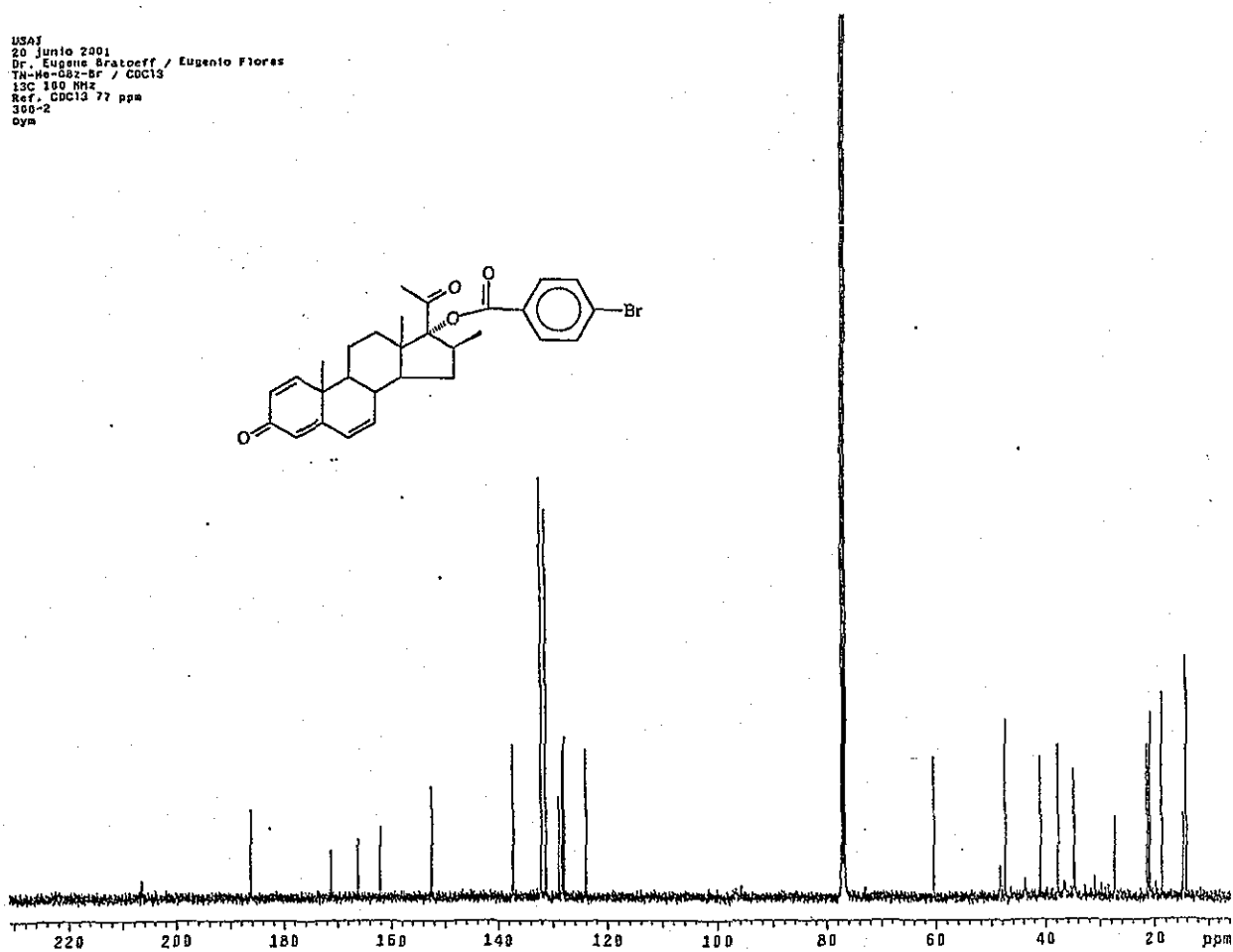
Espectro VI B

USAJ
 21 Junio 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 TH-Me-DBz-Br / CDCl₃
 1H 223.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-2
 Oym



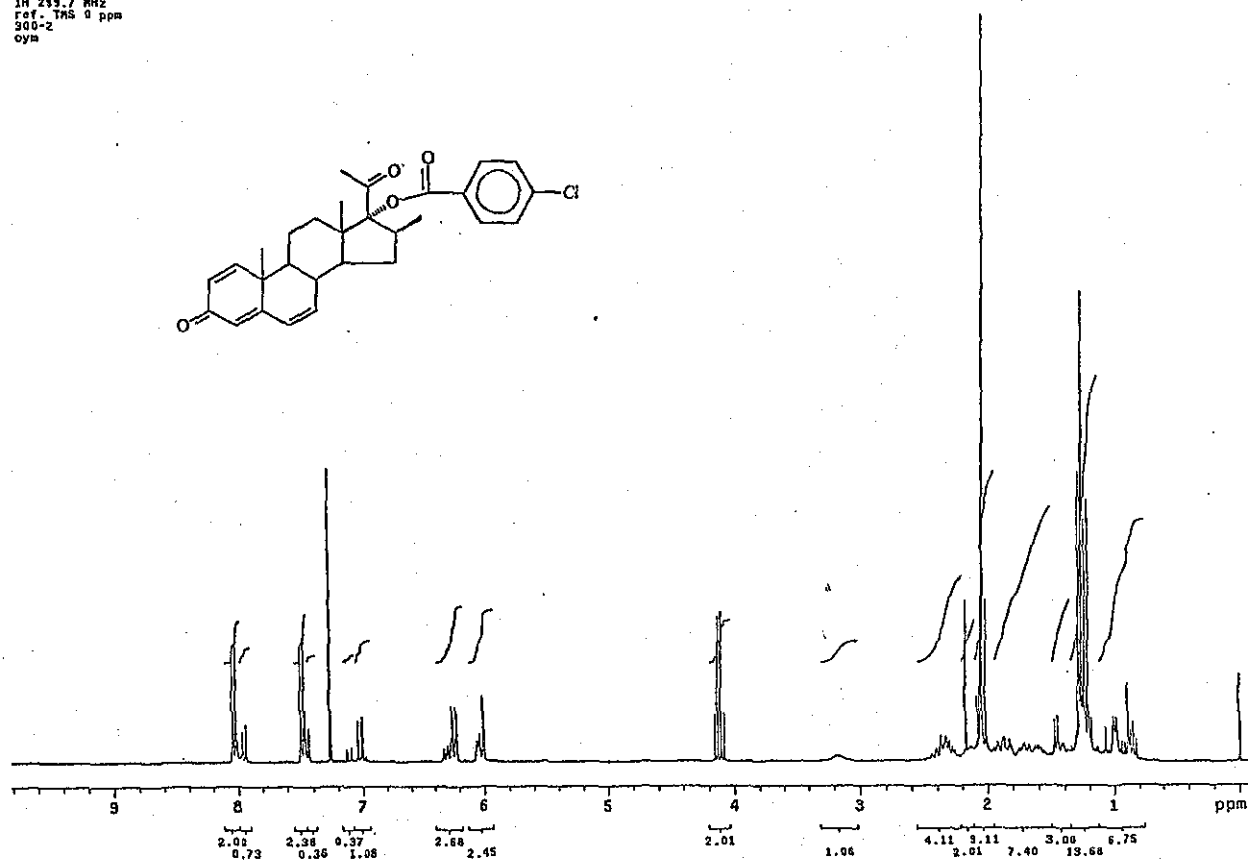
Espectro VIIA

USAJ
 20 Junio 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 TH-Me-DBz-Br / CDCl₃
 13C 100 MHz
 Ref. CDCl₃ 77 ppm
 300-2
 Oym



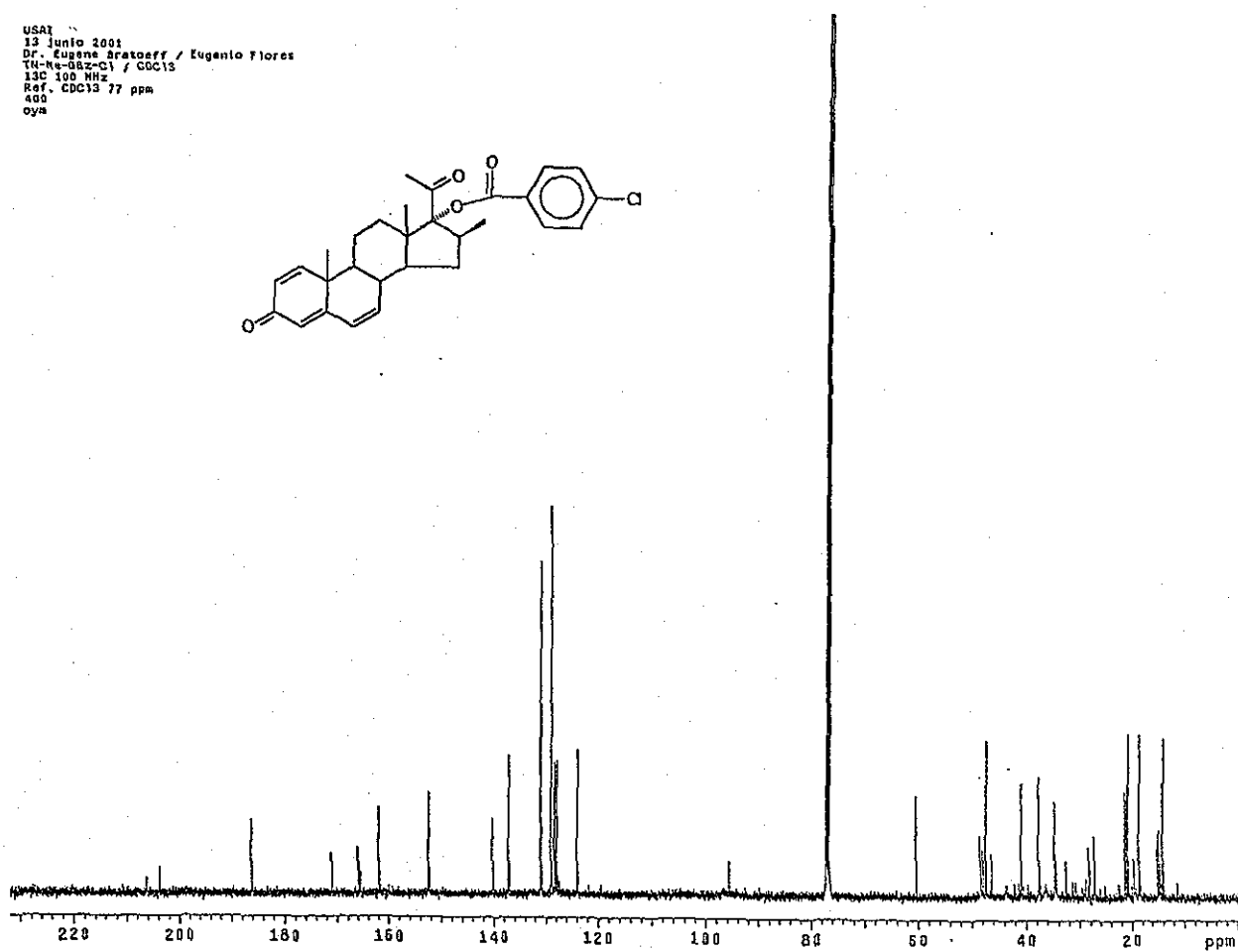
Espectro VIIB

USA1
 13 Junio 2001
 Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
 TM-Me-082-C1 / CDC13
 JH 293.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oya



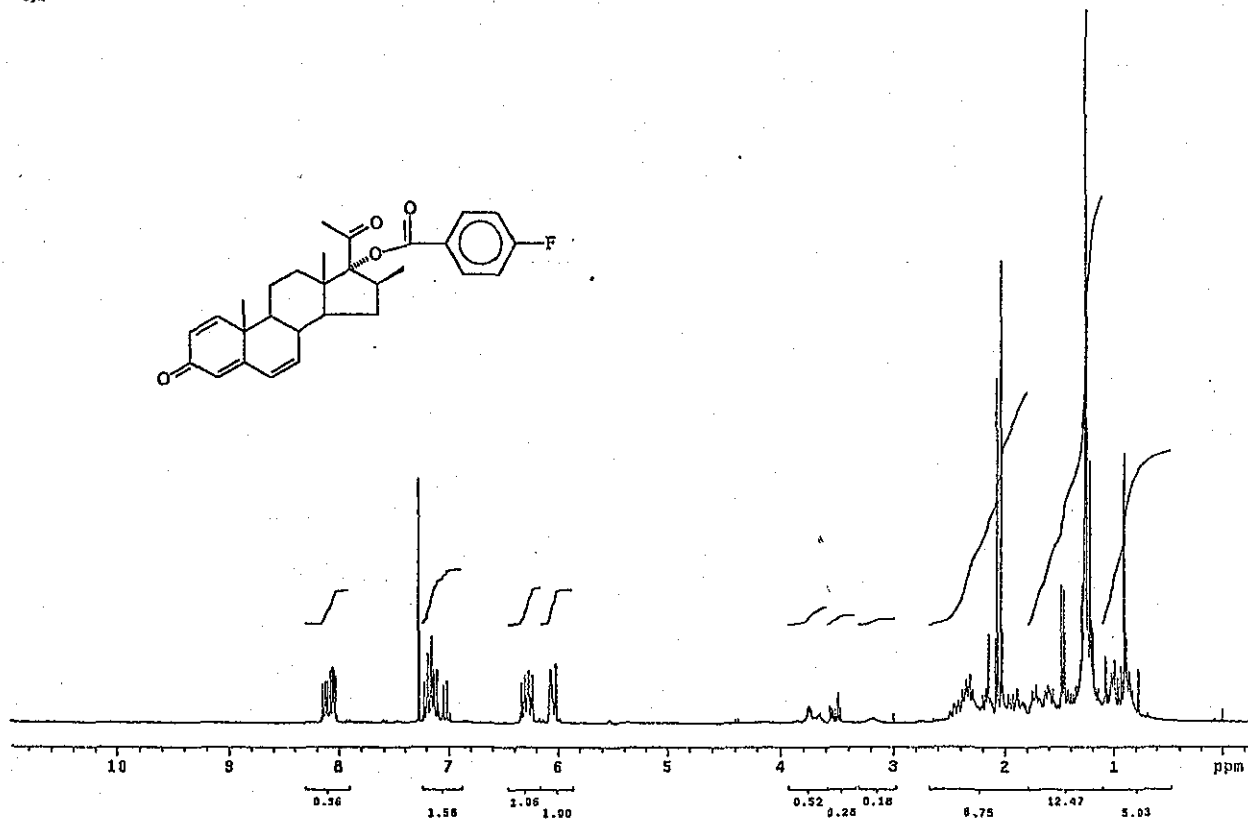
Espectro VIII A

USA1
 13 Junio 2001
 Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
 TM-Me-082-C1 / CDC13
 13C 100 MHz
 Ref. CDC13 77 ppm
 400
 oya



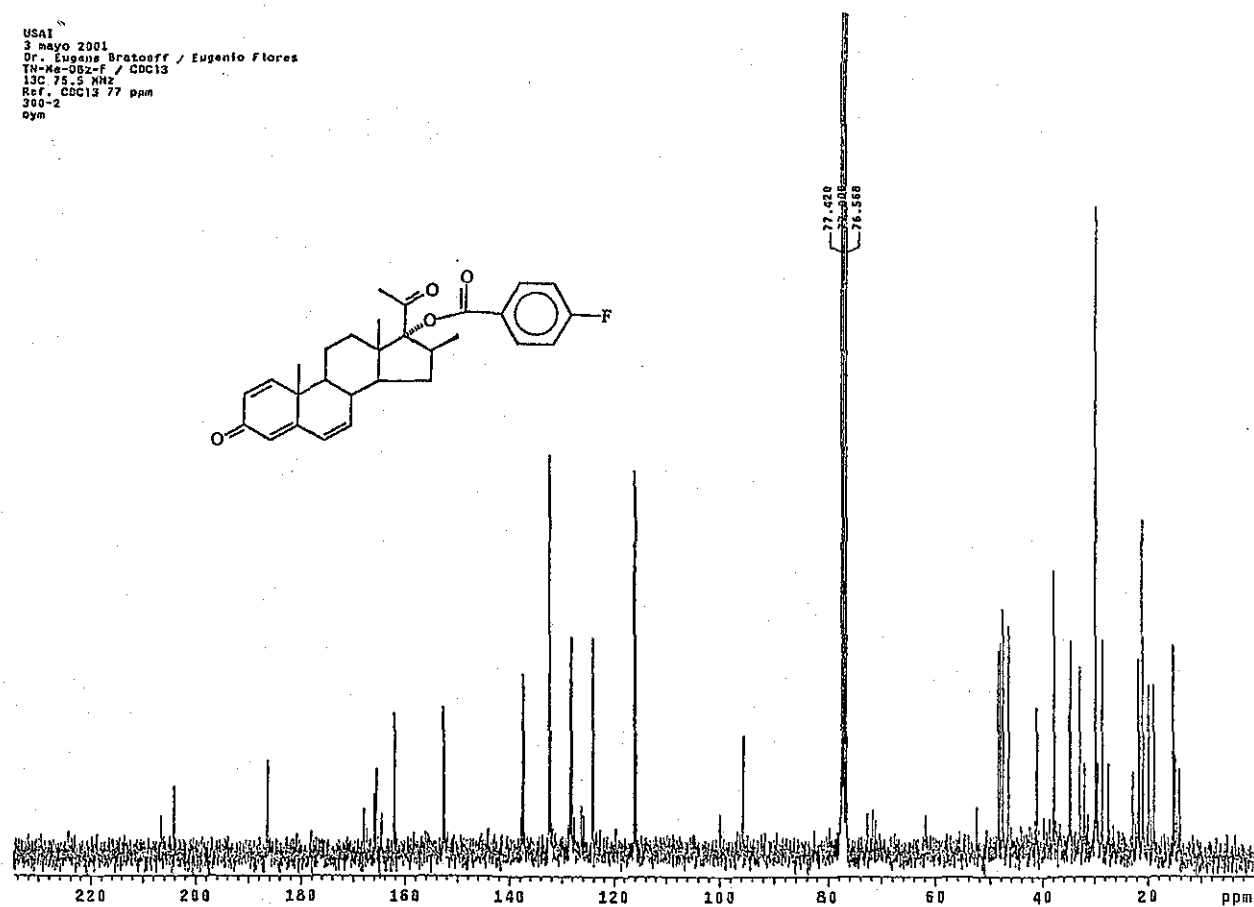
Espectro VIII B

USA1
 3 mayo 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 IN-Me-OBz-F / CDCl₃
 1H 299.7 MHz
 ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oya



Espectro IXA

USA1
 3 mayo 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 IN-Me-OBz-F / CDCl₃
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDCl₃ 77 ppm
 300-2
 oym

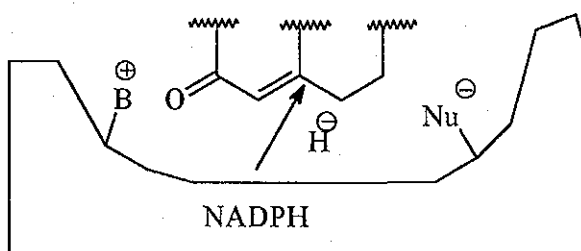


Espectro IXB

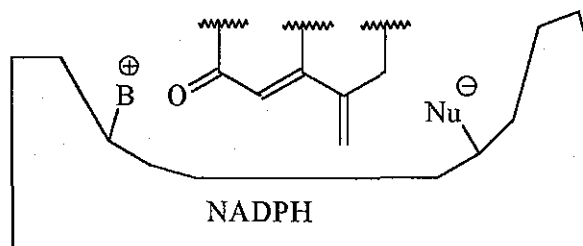
Discusión de la Segunda Parte. Compuestos 6 a-f

En esta parte del proyecto se retomó la hipótesis que propuso Vladimir Petrow,⁵⁵ que establece que un derivado de la progesterona, como el 6-metilén-4-pregnen-3-ona podría inhibir irreversiblemente a la enzima 5 α -reductasa conforme a los siguientes diagramas:

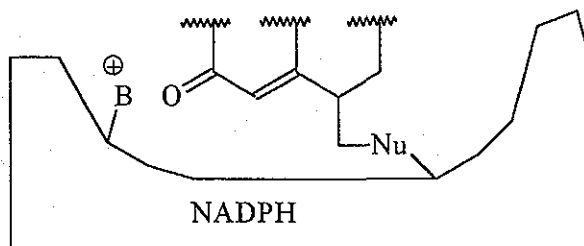
En el diagrama (a), se plantea la transferencia del hidruro por parte del NADPH hacia el sistema 4-pregnen-3-ona, de manera que se obtiene el producto 5 α -reducido y en este modelo el residuo nucleofílico de la enzima no puede adicionarse al sistema conjugado. Sin embargo en el diagrama (b), el residuo



(a)



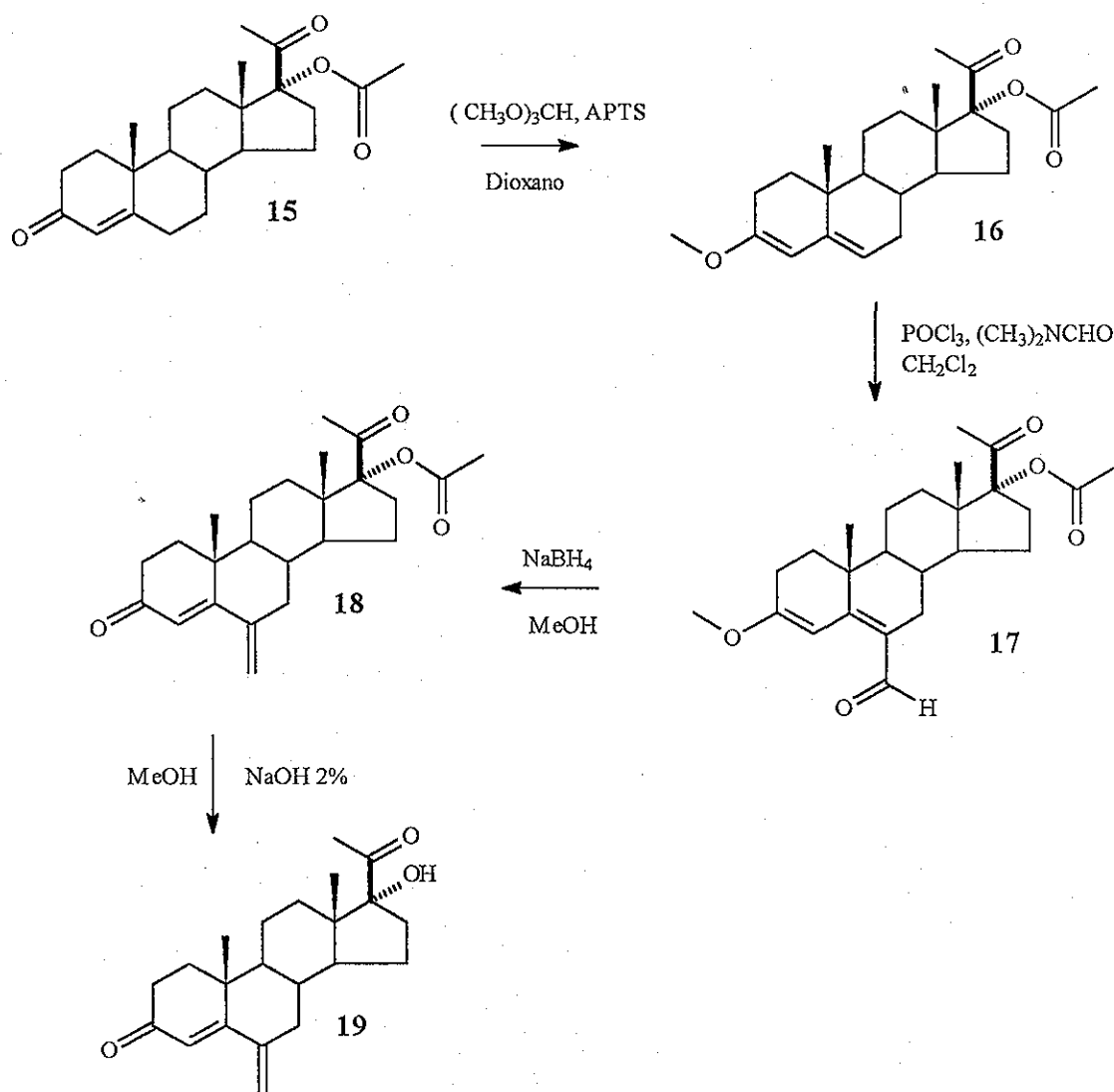
(b)



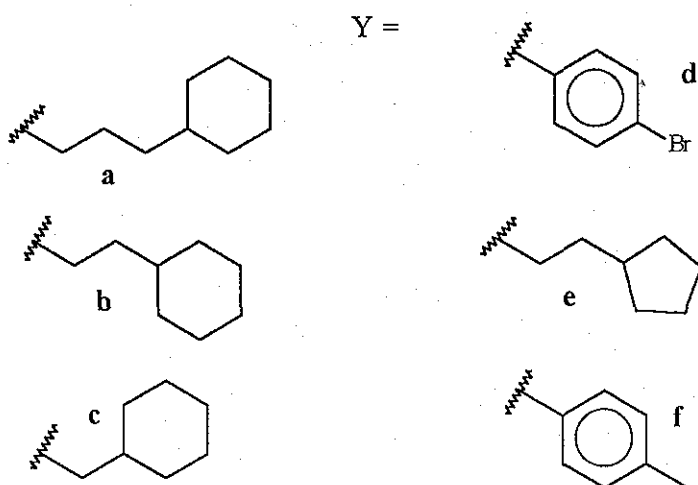
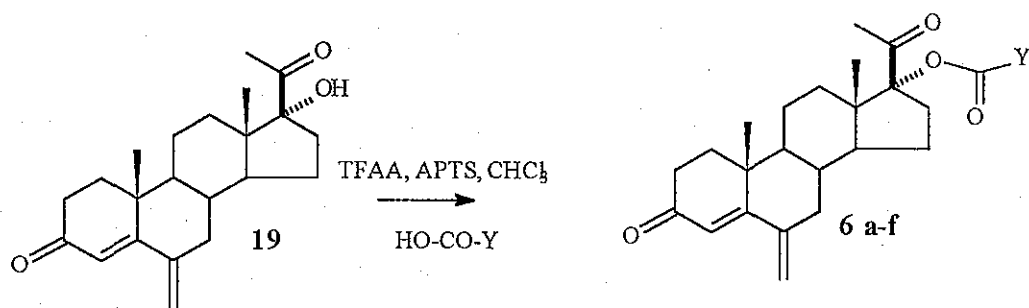
(c)

nucleofílico se adiciona al sistema 6-metilen-4-pregnen-3-ona de modo que la inhibición ocurre irreversiblemente como se observa en el diagrama (c).

Teniendo esto en cuenta, se propuso la síntesis de nuevos ésteres que incluyan al sistema 6-metilen-4-pregnen-3-ona, como se indica en el siguiente esquema:

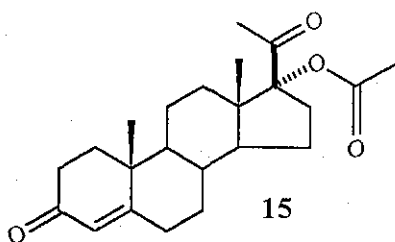


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Se propuso el inicio de la síntesis con el compuesto **15** (17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona) porque es una materia prima asequible y que tiene un éster en el carbono 17 que puede ser saponificado para rendir el alcohol libre, que posteriormente puede ser esterificado con los diferentes ácidos carboxílicos propuestos. Además, esta molécula posee un sistema 4-en-3-ona que puede ser convertido en su éter de enol (3-oxi-3,5-pregnadien) para ser acilado en el carbono 6 mediante una reacción de Vilsmeier. El compuesto **15** fue caracterizado por sus propiedades físicas y espectroscópicas antes de iniciar la síntesis.

El espectro de IR muestra dos bandas para carbonilo, una en 1717 cm⁻¹ que se adjudica al carbonilo en C-20 y la otra aparece en 1732 cm⁻¹ que combinada con la banda presente en 1255 cm⁻¹ confirman la presencia del éster. El espectro de

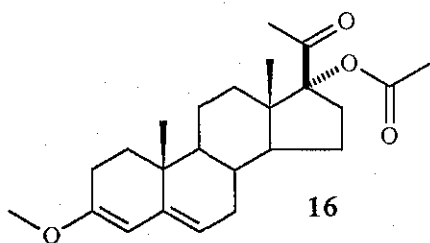


UV muestra un cromóforo con absorción a 239 nm que corresponde al sistema 4-en-3-ona.

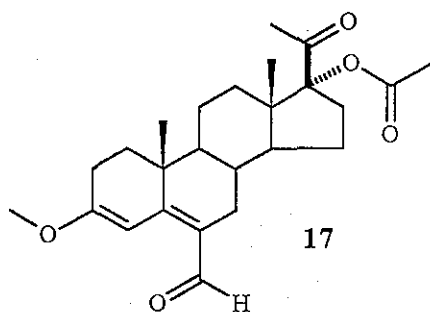
En el espectro de RMN de ^1H (Espectro XA) se observan cuatro señales simples que integran para tres hidrógenos cada uno en 0.68, 1.2, 2.0 y 2.1 ppm y que se asignan a los metilos en los carbonos 18, 19, 21 y metilo del éster. Además en 5.75 ppm aparece una señal doble ($J=1.8$ Hz) que corresponde al protón del carbono 4. En el espectro de masas el ión molecular tiene 372 unidades de m/z a partir del cual se observa la pérdida de ceteno $372-42=330$ m/z y la posterior fragmentación del ion oxonio formado por los carbonos 20 y 21, $330-43=287$ m/z . El pico base está dado por la eliminación de una molécula de agua a partir de este último fragmento, $287-18=269$ m/z . Las propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto **15** fueron comparadas con las descritas en la literatura.³²

El proceso de síntesis inició cuando se disolvió el compuesto **15** en tolueno y se añadió ortoformiato de trimetilo y ácido *para*-toluensulfónico como catalizador, la mezcla de reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente y después del trabajo de reacción se obtuvo el éter de enol **16** con un rendimiento del 60%, presentando las siguientes características: el espectro de IR muestra una señal fina en 2831 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace C-H del metoxilo; en 1652 cm^{-1} una señal que corresponde al dieno -3,5; en 1711 y 1736 cm^{-1} están presentes las bandas para los carbonilos en C-20 y del éster. En el espectro de UV se observa un máximo de absorción en 238 nm debido al cromóforo diénico.

El espectro de masas muestra un ion molecular en 386 m/z que al mismo tiempo es el pico base. Por otra parte, el espectro de RMN de ^1H (Espectro XIA) muestra una señal simple que integra para tres hidrógenos en 3.5 ppm que se asigna al metoxilo en C-3; en 5.7 ppm aparece una señal simple que integra para dos protones y que corresponden a los protones 4 y 6 del sistema diénico. El espectro de ^{13}C (Espectro XIB) muestra señales simples en 199.4, 202.0 y 170.7 que se atribuyen a los carbonos 3, 20 y carbonilo del éster respectivamente, las señales restantes en ambos espectros de resonancia magnética nuclear son idénticos a los del compuesto **15** previamente descrito.⁵⁶

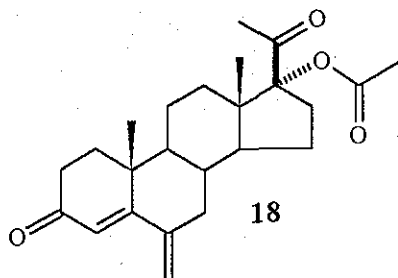


Al tratar al éter de enol **16** con oxiclorigo de fósforo y dimetilformamida, a una temperatura inferior a 5 °C, se obtuvo la sal de iminio, la cual no se aisló, sino que se hidrolizó con acetato de sodio disuelto en una mezcla de metanol-agua, para obtener el derivado formilo **17** con un rendimiento del 60 %, que se identificó por presentar en el espectro de UV, dos máximos de absorción, uno de ellos en 238 nm (sistema diénico) y el otro en 315 nm (aldehído conjugado); en el espectro de IR se observa una señal intensa en 1641 cm^{-1} que corresponde al formilo conjugado y también están presentes las bandas para los carbonilos antes discutidos. En el espectro de RMN de ^1H (Espectro XIIA), se observa una señal simple desplazada a campo bajo en 10.3 ppm que se adjudica al protón del formilo; en 3.5 ppm aparece la señal simple para el metoxilo unido al C-3, en 6.4 ppm se muestra una señal simple que integra para un protón y que se atribuye al protón olefínico en el carbono cuatro.⁵⁶⁻⁵⁷



En esta última etapa de la síntesis se adicionó un carbono más (carbono del formilo unido a C-6), ahora solo resta transformarlo a un alcohol y posteriormente deshidratarlo, para así obtener el derivado 6-metilen.

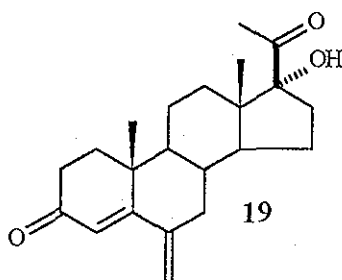
En un baño de hielo con temperatura inferior a 5 °C, se colocó al compuesto **17** suspendido en metanol y posteriormente se adicionó NaBH₄ suspendido también en metanol (se eligió este hidruro porque posee una baja reactividad; otro hidruro, por ejemplo LiAlH₄, reduciría al carbonilo del éster y el carbonilo en C-20), después del trabajo de reacción se obtuvo el compuesto **18** que ya tiene el sistema conjugado, 6-metilen-4-en-3-ona, es decir el formilo fue reducido al alcohol primario que fue deshidratado cuando de manera simultánea ocurre la regeneración del sistema 4-en-3-ona durante el trabajo de la reacción.



Se caracterizó al compuesto **18** como a continuación se explica: en el espectro de IR se observan 3 bandas agudas para carbonilos 1730 cm⁻¹ (éster), 1708 cm⁻¹

carbonilo en C-20 y 1672 cm^{-1} para el carbonilo conjugado. El espectro de UV muestra un máximo de absorción en 260 nm ; el espectro de RMN de ^1H (Espectro XIII A) muestra como señales distintivas 2 señales triples en 4.94 y 5.06 ppm ($J=2.1\text{ Hz}$) que integrando para un protón cada uno corresponden a los protones del 6-metilen; además ya no se observa ni el metoxilo en 3.5 ppm ni el protón del formilo en 10.3 y en cambio se observa una señal simple en 5.81 ppm que corresponde al protón 4 en el sistema 4-en-3-ona. En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro XIII B) aparecen en 203.9 , 199.6 y 170.6 ppm respectivamente las señales que se atribuyen a los carbonilos en C-20, C-3 y del éster respectivamente; en 114.4 ppm aparece el carbono 6 metilen y en 145.6 ppm el C-6, además en 121.7 ppm se presenta el C-4, las demás señales son semejantes a los del compuesto **15**.

El siguiente paso en la secuencia de síntesis fue la saponificación del éster en C-17 del compuesto **18** y para lograrlo se realizó un reflujo en metanol con una disolución de NaOH al 2% durante 1 hora, el trabajo de la reacción permitió obtener con un rendimiento del 75% el alcohol libre en C-17 **19**, cuyas propiedades físicas se describen como sigue:⁵⁶⁻⁵⁷ el espectro de IR ya no muestra las bandas características para un éster, en cambio solo se observan 2 bandas para carbonilo, una en 1702 cm^{-1} (C-20) y en 1658 cm^{-1} para el carbonilo conjugado, además se observa una banda intensa en 3435 cm^{-1} para el grupo funcional alcohol.



El espectro de UV presenta un máximo de absorción en 254 nm que corresponde al sistema conjugado. En el espectro de RMN de ^1H (Espectro XIVA) ya no se observa la señal simple que aparecía en 2.1 ppm que integraba para tres protones y que se adjudicaba al metilo del éster, las señales restantes coinciden con las que aparecen en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **18**. El espectro de Masas muestra un ion molecular en 342 unidades de m/z, el pico base se produce por la pérdida del radical oxonio constituido por los carbonos 20 y 21. En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro XIVB) se observa la ausencia del carbonilo del éster en 170.6 ppm y el desplazamiento a campo alto del C-17, pues en el éster **18** aparece en 96.61 ppm, mientras que en este compuesto **19** aparece en 90.0 ppm.

A continuación se muestran los datos de RMN de ^1H y de ^{13}C de los compuestos **15 - 19**:

Tabla No. 10 RMN de ^1H de los compuestos 15 - 19

Hidrógeno	15	16	17	18	19
4	5.75 d J = 2Hz	5.75d J = 2Hz	6.15 s	5.8d J = 2Hz	5.9d J = 2Hz
6	---	5.75d	---	---	---
Me-18	0.68s	0.68s	0.68s	0.68s	0.68s
Me-19	1.2s	1.2s	1.19s	1.19s	1.19s
Me-21	2.0s	2.0s	2.0s	2.0s	2.0s
Me-éster	2.1s	2.1s	2.1s	2.1s	2.1s
Me-éter	---	3.49s	3.49s	---	---
Formilo	---	---	10.27s	---	---
6-exo metilen	---	---	---	4.95 t y 5.07 t	4.95 t y 5.07 t
O-H	---	---	---	---	3.49 s
Espectro	XA	XIA	XIIA	XIIIA	XIVA

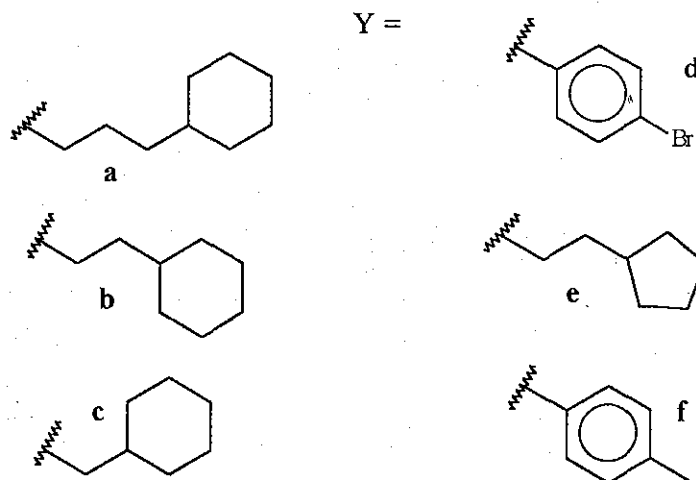
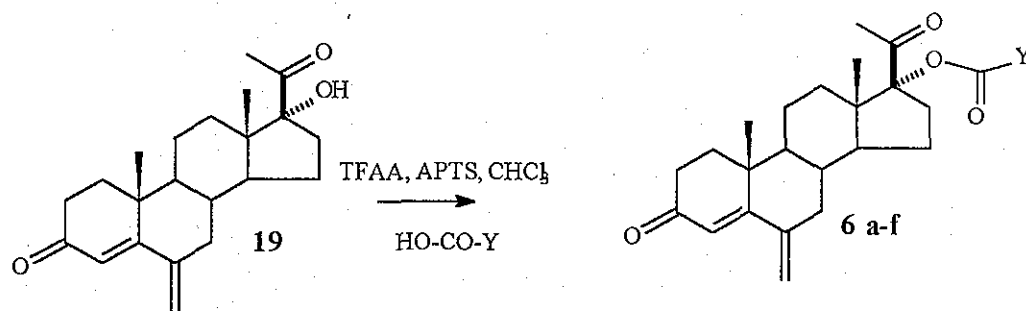
Referencia TMS 300 MHz Disolvente CDCl_3

Tabla No. 11 RMN de ^{13}C de los compuestos 15–19

Carbono	15	16	17	18	19
3	199.4s	199.4	162.6s	199.7s	199.8s
4	124.0d	123.9d	91.8d	121.8d	121.8d
6	---	123.9d	125.5s	145.6	145.8s
Me-18	14.4c	14.3c	14.3c	14.3c	15.4c
Me-19	17.4c	17.4c	18.9c	17.1c	17.1c
20	204.0s	204.0s	204.2s	203.9s	211.5s
Me-21	26.3c	26.3c	26.5c	26.3c	23.8c
C=O éster	170.7s	170.7s	170.7s	170.6s	---
Me-éster	21.2c	21.2c	20.8c	20.6c	---
Me-éter	---	50.8c	54.8c	---	---
6'-exo	---	---	190.3d	114.4t	114.2t
Espectro	XA	XIA	XIIA	XIIIA	XIVA

Disolvente: CDCl_3 Referencia: TMS

La última etapa de esta secuencia de síntesis consistió en la esterificación con los diferentes ácidos carboxílicos, en este caso se utilizaron dos ácidos aromáticos y cuatro ácidos alifáticos para determinar el posible efecto que pueda tener el sustituyente en el anillo aromático y el tamaño de la cadena y del anillo en la actividad inhibitoria de la enzima. La reacción de esterificación del compuesto **19** se realizó como se describió en la primera parte de esta tesis (páginas 16 y 27) y se muestra en el diagrama de la siguiente página.

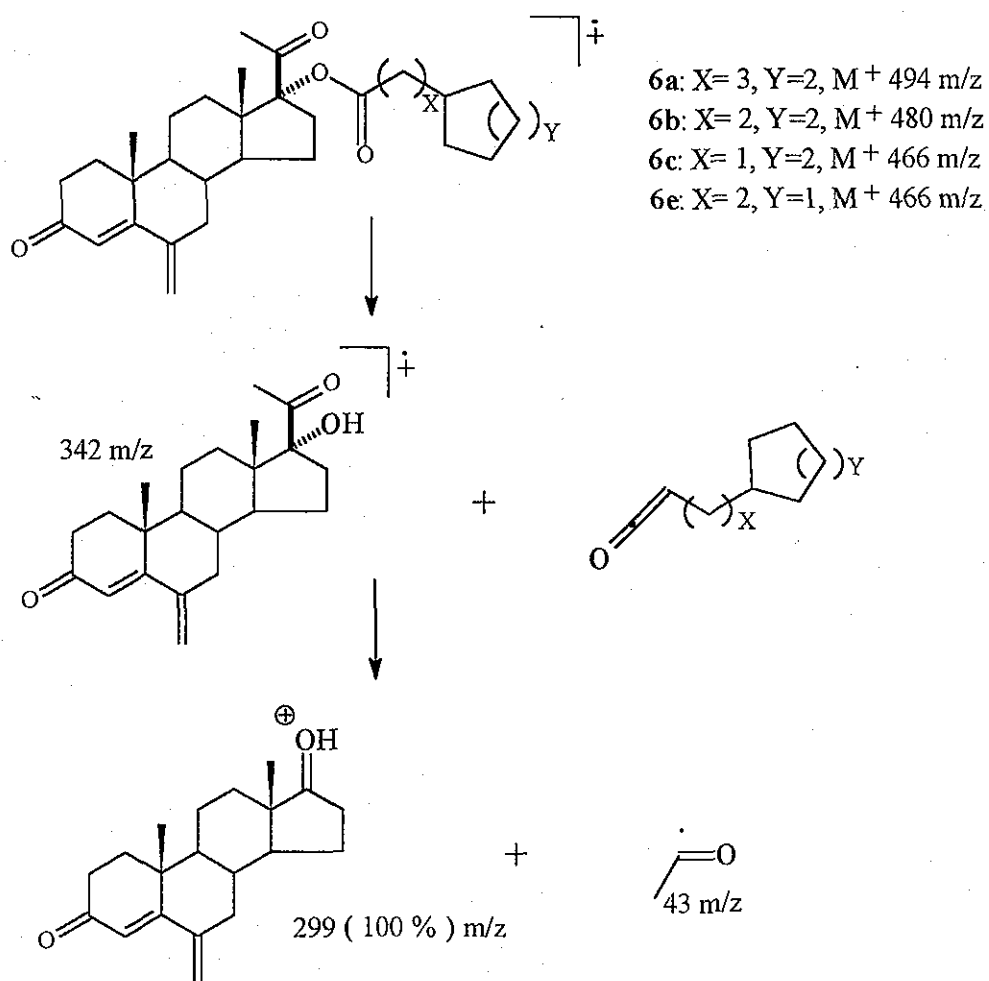


Los espectros de IR de los compuestos **6 a-f** tienen en común la banda para el carbonilo conjugado en 1674 cm^{-1} y las bandas características para un éster (carbonilo en $1718\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$). Los espectros de UV muestran un máximo de absorción en la zona de $247\text{--}263\text{ nm}$ para el carbonilo conjugado. Los ésteres **6 a-f** presentan los mismos desplazamiento químicos en RMN de ^1H (Espectros XVA-XXA) para los siguientes protones:

- 1.- En 5.9 ppm aparece una señal simple para el protón 4.
- 2.- En 5.0 y 4.9 ppm se ubican dos señales triples para los protones del 6-metileno exocíclico.
- 3.- Los metilos 18, 19 y 21 aparecen en 0.7 , 1.1 y 2.0 ppm como señales simples que integran para tres hidrógenos cada uno.

En el caso de los ésteres **6a**, **6b**, **6c** y **6e**, los protones de la parte alifática del ácido carboxílico aparecen en la zona de campo alto (0–2.5 ppm). Los protones aromáticos de los ésteres **6d** y **6f** presentan el mismo desplazamiento químico que el explicado para los ésteres **14b** y **14c** respectivamente. (Ver página 18).

En los espectros de masas de los ésteres alifáticos **6a**, **6b**, **6c** y **6e** se observa el siguiente patrón de fragmentación mostrado en el siguiente diagrama:



Espectrometría de Masas de los ésteres 6a, 6b, 6c y 6e

Los espectros de masas de los ésteres aromáticos **6d** y **6f** muestran que el patrón de fragmentación es similar al patrón que experimentan los ésteres **14b** y **14c** (página 18).

En la Tabla 12 se resumen los datos de RMN de ^1H de los ésteres **6 a-f**.

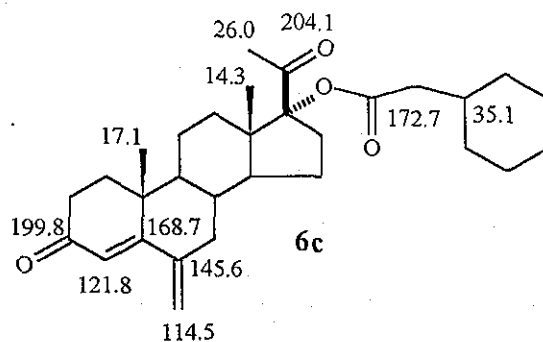
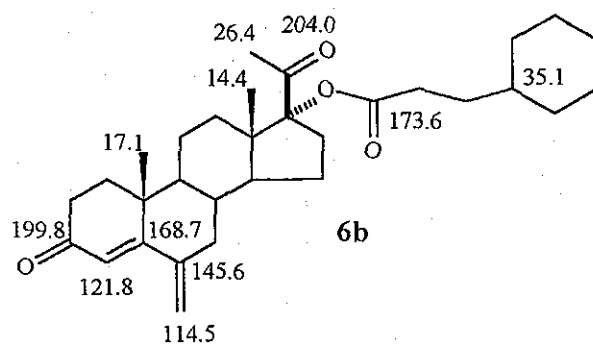
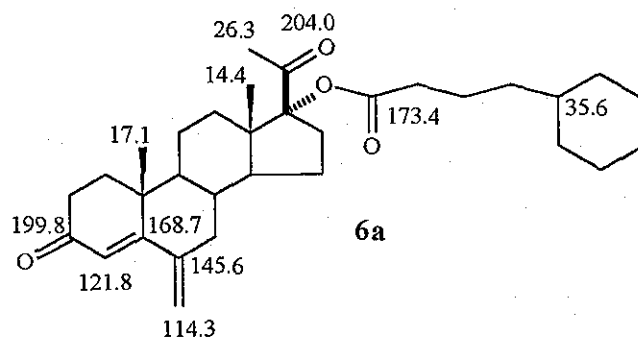
Tabla No. 12 RMN de ^1H de los ésteres 6 a-f

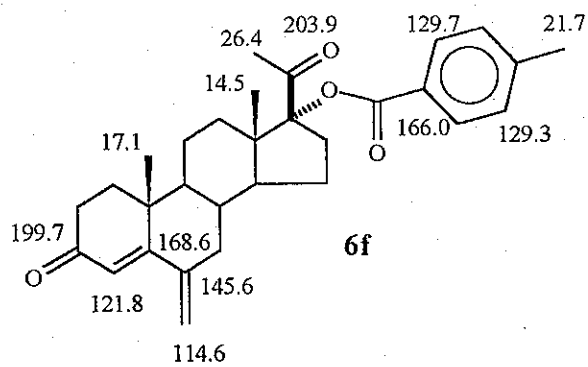
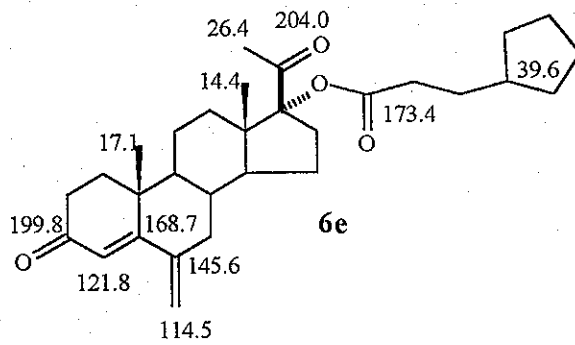
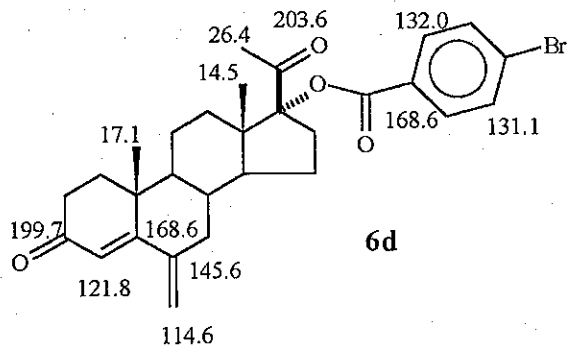
Hidrógeno	6 a	6b	6c	6d	6e	6f
4	5.93s	5.92s	5.93s	5.95s	5.86s	5.94s
6'(2H)	5.08t	5.07t	5.07t	5.09m	5.01m	5.08m
	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz
	4.96t	4.95t	4.95t	4.97t	4.89t	4.96t
	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz	J=1.8 Hz
Me-18	0.71s	0.7s	0.72s	0.7s	0.7s	0.74s
Me-19	1.1s	1.1s	1.09s	1.1s	1.1s	1.12s
Me-21	2.0s	2.0s	2.0 s	2.1 s	2.0 s	2.1 s
H - 3' 2H	---	---	---	8.0 m	---	8.0 m,
H - 4' 2H	---	---	---	7.65 m	---	7.27 m,
H - 6'	---	---	---	---	---	2.45 s, 3H
Espectro	XVA	XVIA	XVIIA	XVIII A	XIXA	XXA

Referencia TMS 300 MHz Disolvente CDCl_3

Desplazamientos químicos en ppm

A continuación se ilustran los datos de R.M.N. de ^{13}C de los compuestos **6 a-f**:





Evaluación farmacológica de los compuestos 6 a-f y 19.

Los compuestos 6 a-f y 19 fueron evaluados biológicamente en la fracción membranal de próstata de hamsters para determinar la inhibición de la conversión de testosterona 1 en 5 α -dihidrotestosterona 2. En la siguiente tabla se observan los valores de la concentración de inhibición al 50 % de la enzima 5 α -reductasa.

Tabla No. 13 Inhibición al 50 % de los compuestos 6 a-f y 19

Compuesto	C.I. ₅₀
6a	188 nM
6b	1000 nM
6c	4200 nM
6d	100 nM
6e	167 nM
6f	100 nM
19	19 nM
Finasterida	10 nM

Conclusiones de la Segunda Parte

El compuesto 19 (que posee un alcohol libre en C-17), sorprendentemente es el que inhibe con mayor efectividad a la enzima y lo hace en un valor muy cercano al mostrado por finasterida. Los ésteres aromáticos 6d y 6f inhiben a la enzima a la misma concentración y son los que presentan mayor inhibición comparándolos con los demás ésteres. Les siguen los compuestos 6a y 6e. Por lo tanto 19 es el más efectivo de todos los compuesto sintetizados en esta segunda parte. Comparando los ésteres aromáticos con los alifáticos se concluye que los primeros son más efectivos para inhibir a la enzima.

Procedimiento experimental de la Segunda Parte. Compuestos 6 a-f.

Caracterización de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (15).

Las características físicas y espectroscópicas de la materia prima se describen a continuación: P.M.: 372, Punto de Fusión: 246 –248°C, IR v: 2950, 2866, 1732, 1717, 1656, 1480, 1354, 1260 cm⁻¹. UV: 239 nm³², RMN de ¹H (Espectro XA): Tabla No.10, RMN de ¹³C (Espectro XB): Tabla No. 11

Obtención de 17 α -acetoxi-3-metoxi-3,5-pregnadien-20-ona (16).

En un matraz bola de 100 ml, se disolvió 1 gramo (2.68 mmol) del compuesto 15 en 5 ml de dioxano anhidro y se añadieron 0.2 gramos (1.0 mmol) de ácido *para*-toluensulfónico y 5 ml (45.7 mmol) de ortoformiato de trimetilo. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se adicionó piridina para finalizar la reacción. La mezcla de reacción se vació sobre 200 ml de agua helada y el compuesto 16 (0.62 g) precipitó. El producto se recrystalizó de metanol que contenía algunas gotas de piridina. El rendimiento obtenido fue del 60 %, ⁵² P.M.:386, Punto de Fusión: 154 –157°C, IR v: 2975, 2949, 1736, 1711, 1651, 1386, 1251 cm⁻¹ UV: 238.5 nm, RMN de ¹H (Espectro XIA): Tabla No.10, RMN de ¹³C (Espectro XIB): Tabla No. 11

Obtención de 17 α -acetoxi-6-formil-3-metoxi-3,5-pregnadien-20-ona (17).

En un matraz bola de 100 ml de dos bocas, provisto con un termómetro y agitación, se adicionaron 2 ml de cloruro de metileno y el sistema se enfrió en un baño de hielo-acetona-sal para lograr una temperatura inferior a 0°C, luego se añadieron muy lentamente 0.6 ml (7.7 mmol) de DMF cuidando que la temperatura no excediera los 5°C. Posteriormente se agregaron 0.5 ml (5.4 mmol) de POCl₃, teniendo el mismo cuidado con la temperatura. En un matraz aparte, se disolvieron 0.2 gramos (0.52 mmol) de 16 en 1.5 ml de cloruro de metileno y 1.5 ml de piridina. Esta disolución se adicionó muy lentamente a la mezcla anteriormente preparada conservando la temperatura por abajo de 0°C. Una vez terminada la adición, la reacción continuó en esa temperatura durante 1

hora y 2 más a temperatura ambiente (la reacción adquiere un color rojo intenso). Finalizada la reacción se vertió sobre una disolución de 1 gramo de acetato de sodio disuelto en 70 ml de metanol y 10 ml de agua y se agitó durante 15 minutos. Se extrajo con cloroformo (3 X 40 ml), se lavó sucesivamente con NaHCO_3 , salmuera y agua hasta pH neutro. El disolvente se destiló en el rotavapor y se cristalizó **17** de hexano -acetato de etilo⁵⁶⁻⁷. Rendimiento = 60 % (0.12 gramos), P.M.: 414, Punto de Fusión: 205-208°C, IR v: 2946, 1731, 1652, 1614, 1391, 1250 cm^{-1} , UV: 238.5 y 315.2 nm, RMN de ^1H (Espectro XIIA): Tabla No.10, RMN de ^{13}C (Espectro XIIB): Tabla No. 11

Obtención de 17 α -acetoxi-6-metilen-4-pregnen-3,20-diona (18).

A una suspensión de 0.1 gramos (0.24 mmol) de **17** en 2 ml de metanol se agregaron 20 mg (0.53 mmol) de NaBH_4 en polvo, cuidando que la temperatura no excediera los 5°C. La reacción se agitó durante media hora y su curso fue seguido por cromatografía en capa fina. Una vez terminada la reacción se transfirió a un embudo de separación que contenía 20 ml de agua y se extrajo con AcOEt (3 X 30 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor. El producto **18** se cristalizó a partir de metanol⁵⁶⁻⁷. El rendimiento obtenido fue del 70 % (0.064 gramos), P.M.:414, Punto de Fusión: 244-246°C, IR v: 2955, 1730, 1708, 1673, 1370, 1262 cm^{-1} , UV: 260 nm. RMN de ^1H (Espectro XIII A): Tabla No.10, RMN de ^{13}C (Espectro XIII B): Tabla No. 11

Obtención de 17 α -hidroxi-6-metilen-4-pregnen-3,20-diona (19).

En un sistema de reflujo, se colocó 1 gramo (2.6 mmol) del compuesto **18** y se disolvió en 100 ml de metanol y se añadieron 25 ml (12.5 mmol) de una disolución de NaOH al 2 % y la reacción se calentó a reflujo durante media hora. Cuando la reacción terminó, se destiló una parte del metanol y posteriormente se vertió en agua y se extrajo con cloroformo (3 X 60 ml), se lavó con salmuera y después con agua hasta pH neutro. El producto obtenido **19** se cristalizó con hexano-AcOEt⁵⁶⁻⁷. Rendimiento = 75% (0.66 gramos), P.M.: 342, Punto de

Fusión: 204-206°C, IR: 3436, 2947, 2869, 1702, 1658, 1229 cm⁻¹, UV: 254 nm, RMN de ¹H (Espectro XIVA), Tabla No.10, RMN de ¹³C (Espectro XIVB): Tabla No. 11.

Obtención de los ésteres 6 a-f

Procedimiento general.- Se desarrolló la misma técnica descrita en la página 16 y 27. Los rendimientos de cada éster, así como sus características físicas y espectroscópicas se localizan en las Tablas No. 12 y 14-15.

Tabla No. 14 Datos de IR y UV de los compuestos 6 a-f

Ester	IR	U.V. nm
6a	2922, 2849, 1730, 1674, 1447, 1226	255
6b	2923, 2851, 1730, 1673, 1599, 1227	260
6c	2924, 2851, 1729, 1673, 1447, 1226	254
6d	2948, 1718, 1671, 1589, 1291, 757	247
6e	2947, 2868, 1731, 1715, 1674, 1264	264
6f	2948, 1716, 1672, 1610, 1288, 754	242

Tabla No. 15 Espectrometría de masas, puntos de fusión y rendimientos de los compuestos 6 a-f

Ester	Masas	Rendimiento	P f °C
6 a	494(2), 451(10), 342(12), 299 (100)	47 %	114-117
6b	480(1), 437(10), 342(15), 299(100)	46 %	146-148
6c	466(1), 423(15), 342(20), 299(100)	48 %	134-136
6d	524(4), 526(5), 481(18), 483(19), 183(100), 185(97)	52 %	213-216
6e	466(5), 423(30), 342(50), 299(100), 281(85)	40 %	140-143
6f	460(3), 417(35), 324(10), 281(15), 119(100)	45 %	214-216

Determinación de la inhibición de la conversión de Testosterona a 5 α -dihidrotestosterona en fracción membranal de próstata a pH=7, por los compuestos 6 a-f y 19.

1.- Se sacrificaron 50 hámsters con aproximadamente 72 horas de haber sido castrados y se separaron próstatas y vesículas seminales. Los tejidos se limpiaron perfectamente de grasa y se pesaron por separado. Los tejidos se homogeneizaron con buffer TEDAM sin ditioeritrol en 3 volúmenes en relación al peso (v / p) 3:1.

2.- Los homogenados se centrifugaron por 1 hora a 37000 rpm (140000g) a 2°C y posteriormente se separó el pellet y sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 volúmenes de Medio A a pH = 6.5 (0.32 M sacarosa, 0.1 mM ditioeritrol, 20 ml buffer de fosfatos de sodio pH = 6.5) en relación al peso del tejido intacto (mismo volumen que se usó en el número 1).

3.-Previamente se prepararon series de tubos conteniendo 2 nM de testosterona marcada. A estos tubos se agregaron cantidades variables de los inhibidores por series (20 nM – 10 μ M) y se dejaron evaporar los disolventes. También se prepararon tubos control los que tenían solamente 2 nM de testosterona marcada.

4.- A estos tubos se agregaron 1mM de ditioeritrol, 2mM de NADPH, 250 μ g de proteína del pellet resuspendido y disolución amortiguadora de fosfatos de sodio 40 mM pH = 7.0 a 1 ml. También se prepararon tubos para determinar el rendimiento de extracción conteniendo únicamente 2 nM de testosterona marcada y 1000 μ l de buffer de fosfatos.

5.- Los tubos se incubaron en agitación por 1 hora a 37°C. Para detener la reacción se agregó 1ml de diclorometano.

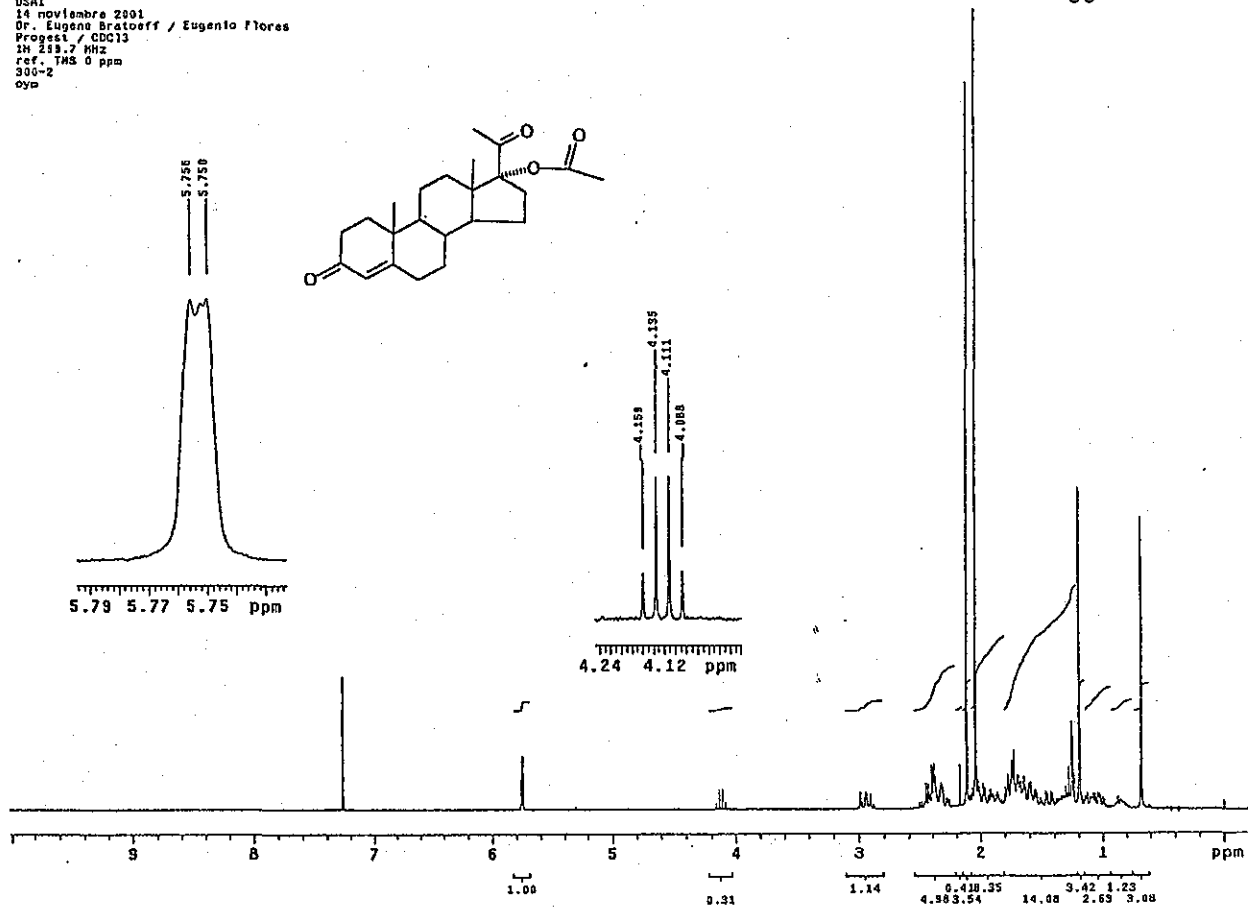
6.- Se realizaron extracciones sucesivas con diclorometano (1ml X 4) y el extracto seco se aplicó con MeOH a una placa de sílica gel junto con estándares de testosterona y DHT marcadas. La placa se eluyó tres veces en un sistema de cloroformo:acetona (9:1) y se revelaron los estándares. El estándar de testosterona se reveló con luz U.V. (254 nm) y el de DHT con ácido fosfomolibdico y calentamiento.

7.- La región de la placa correspondiente a DHT se cortó y se puso en viales junto con 5 ml de líquido de centelleo Ultima Gold en el contador de centelleo.

8.- Se calculó el porcentaje de conversión de testosterona a DHT en presencia de inhibidores y en base al 100% de conversión de los tubos control sin inhibidor.

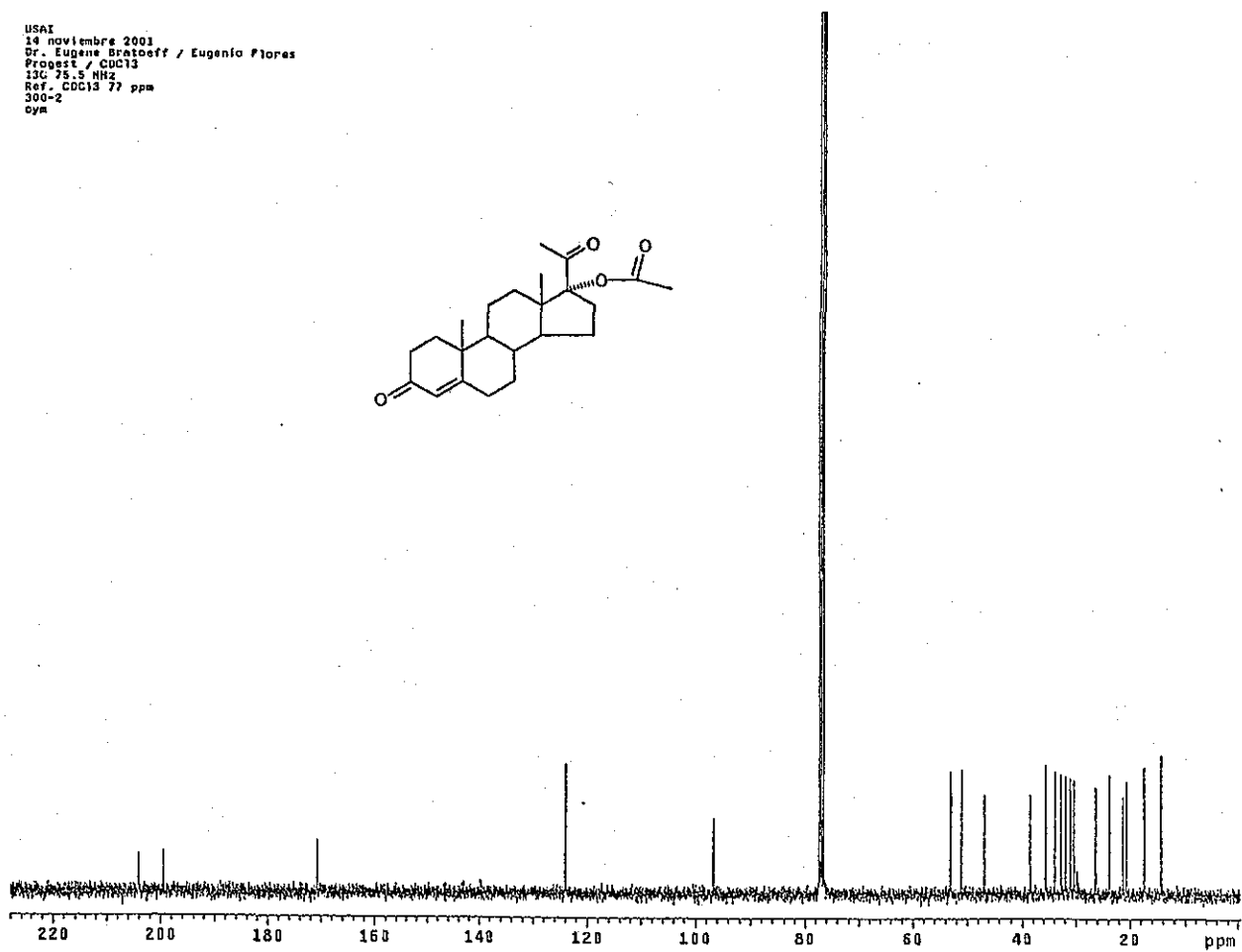
9.- Se determinó cantidad de proteínas de citosol de próstata y vesículas seminales por medio del método de Bradford⁵⁴.

USAI
14 noviembre 2001
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
Progest / CDC13
1H 289.7 MHz
ref. TMS 0 ppm
300-2
cym



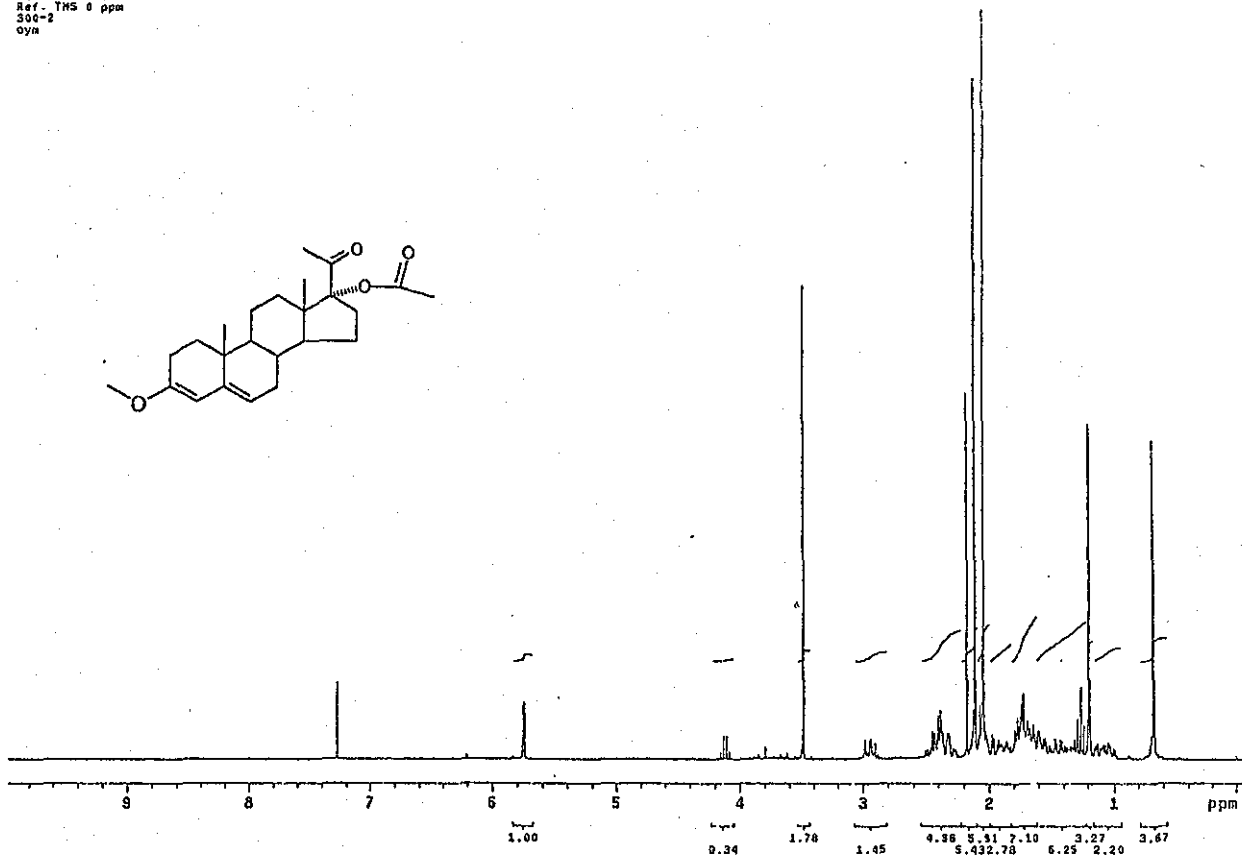
Espectro XA

USAI
14 noviembre 2001
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
Progest / CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-2
cym



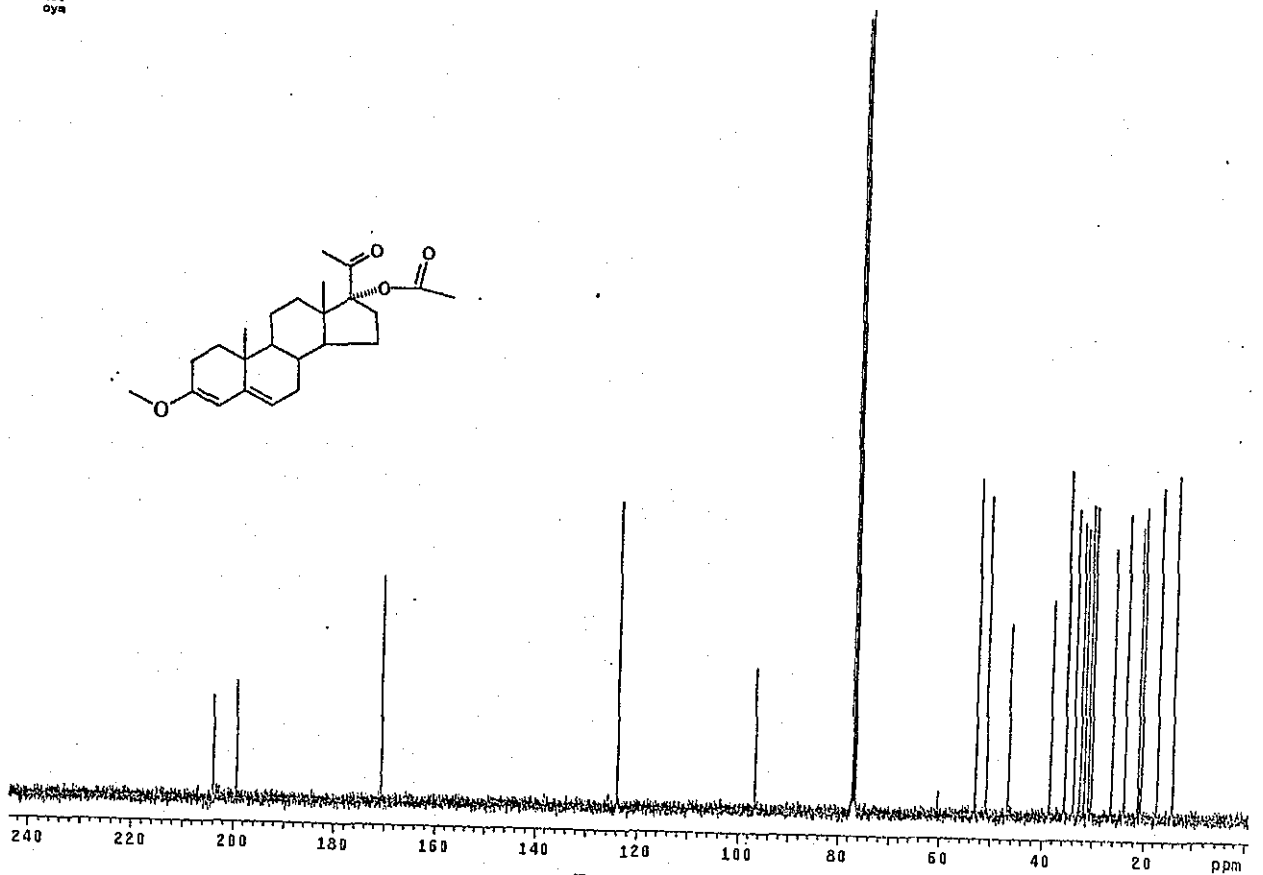
Espectro YB

USA1
 8 Diciembre 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 eter-enol / CDCl3
 3H 299.7 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oya



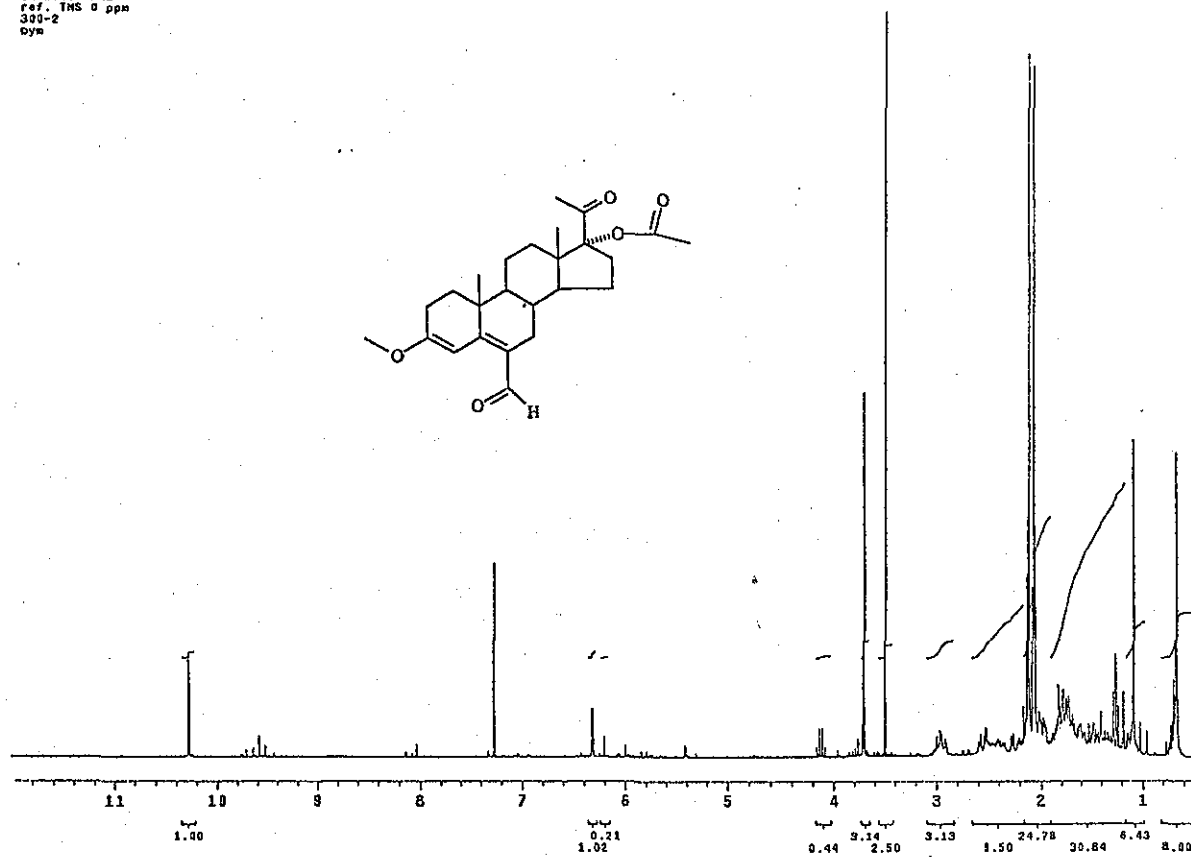
Espectro XIA

USA1
 3 diciembre 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 eter-enol / CDCl3
 13C 100 MHz
 ref. CDCl3 77 ppm
 400
 oya



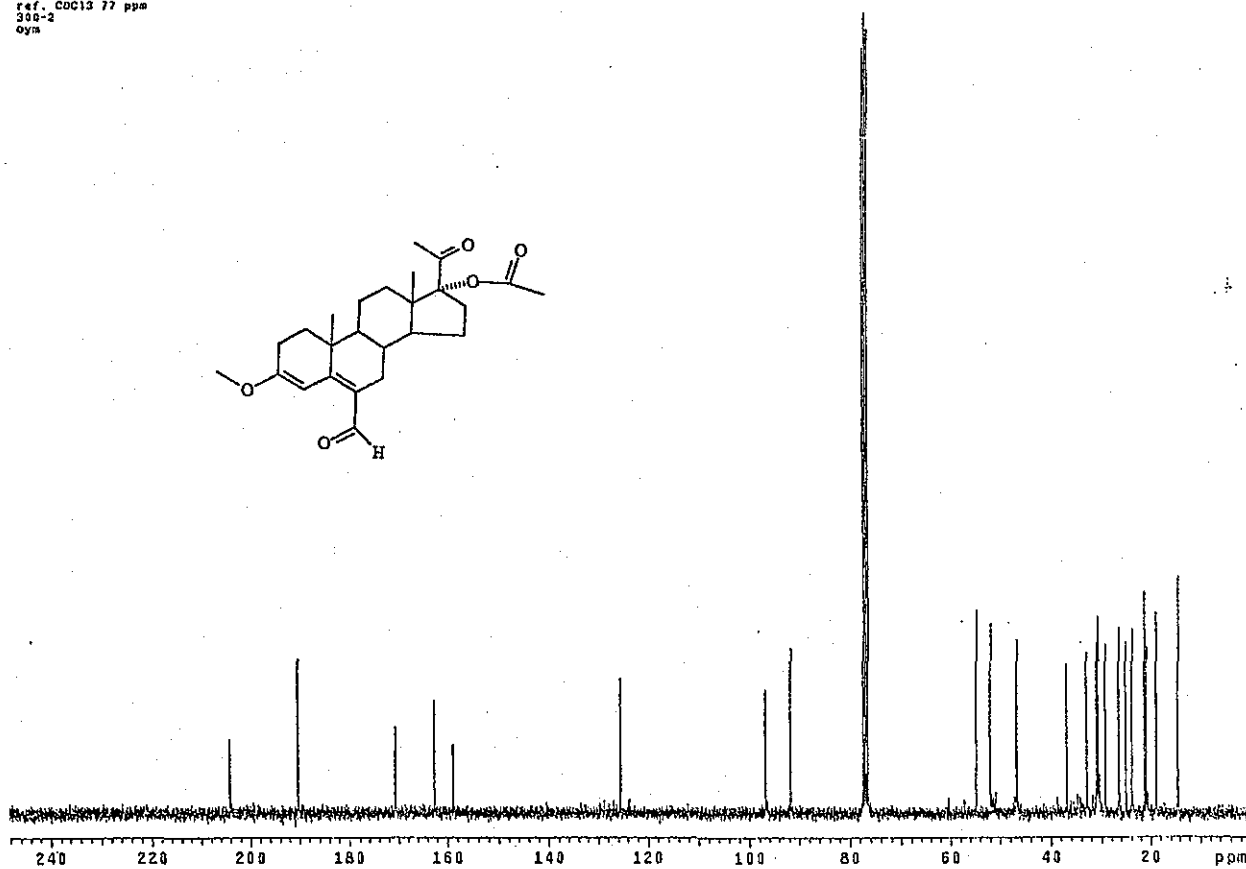
Espectro XIB

USA1
1 febrero 2002
Dr. Eugenio Bratoeff
VILSHEIRZ / COC13
1H 299.7 MHz
ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



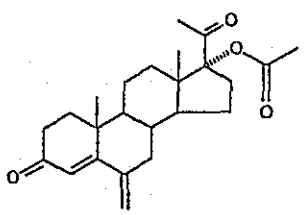
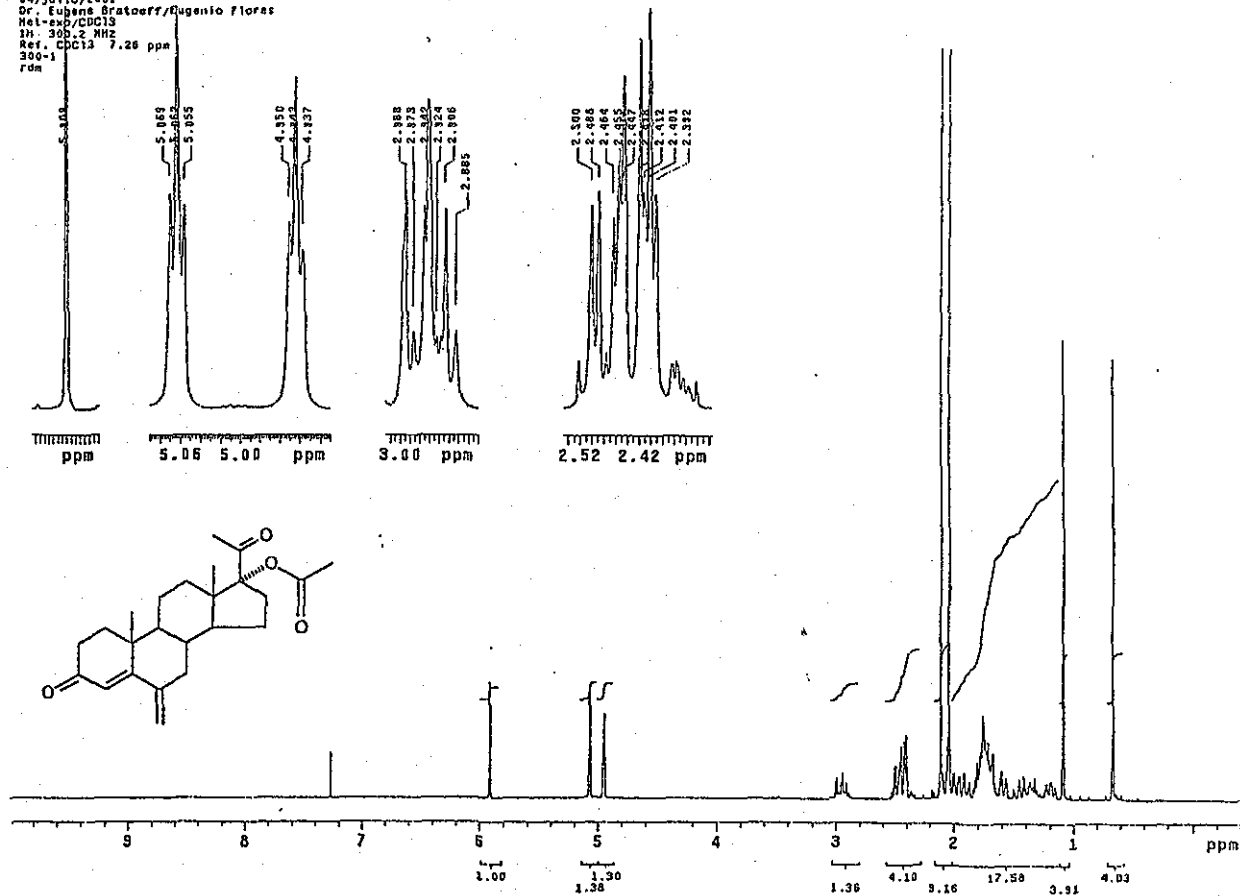
Espectro XIIA

USA1
30 enero 2002
Dr. Eugenio Bratoeff
VILSHEIRZ / COC13
13C 75.3 MHz
ref. COC13 77 ppm
300-2
oym



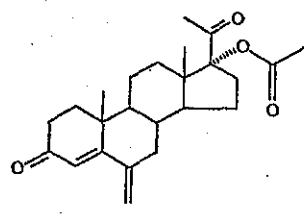
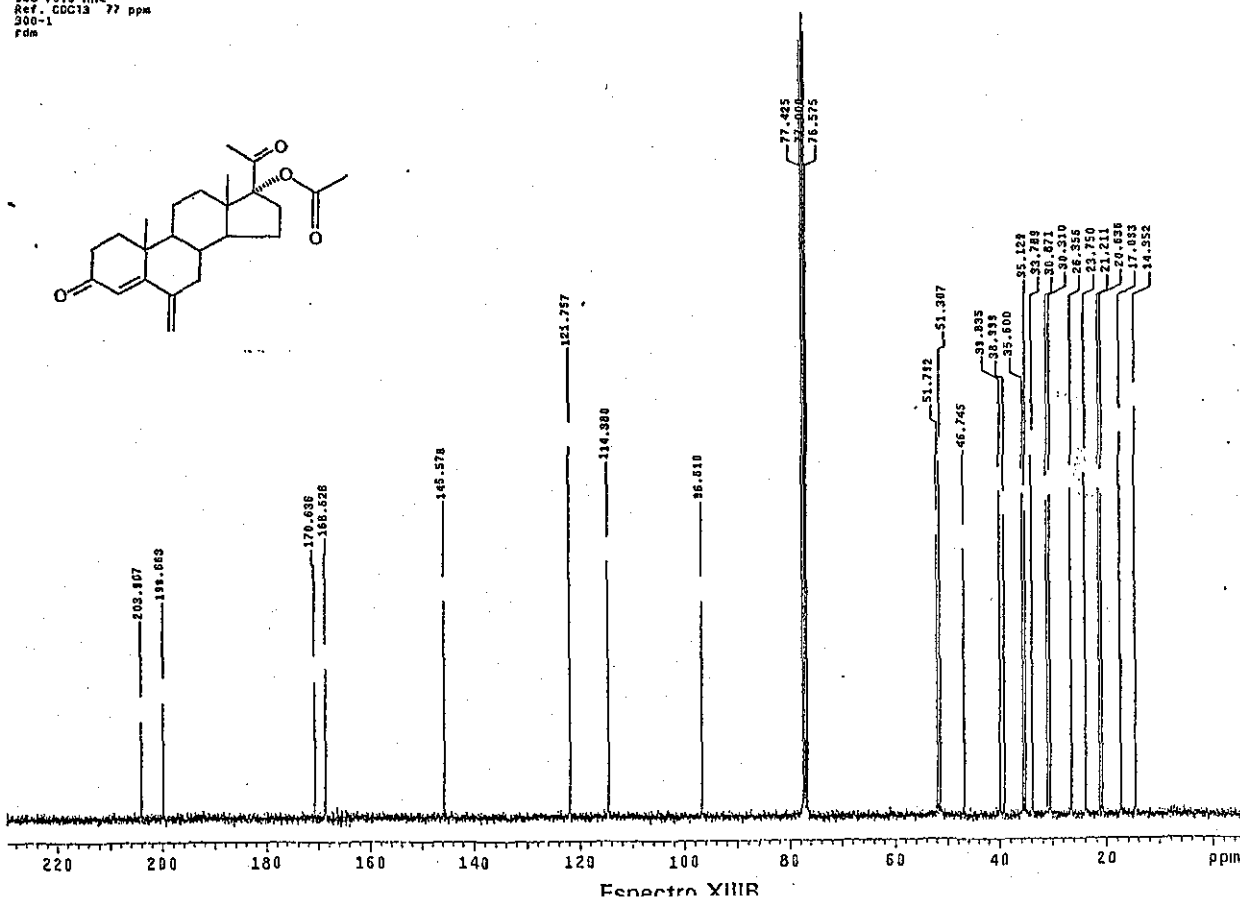
Espectro XIIIB

USA1
04/JULIO/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
Met-exp/CDC13
1H-300.2 MHz
Ref. CDC13 7.26 ppm
300-1
rdm



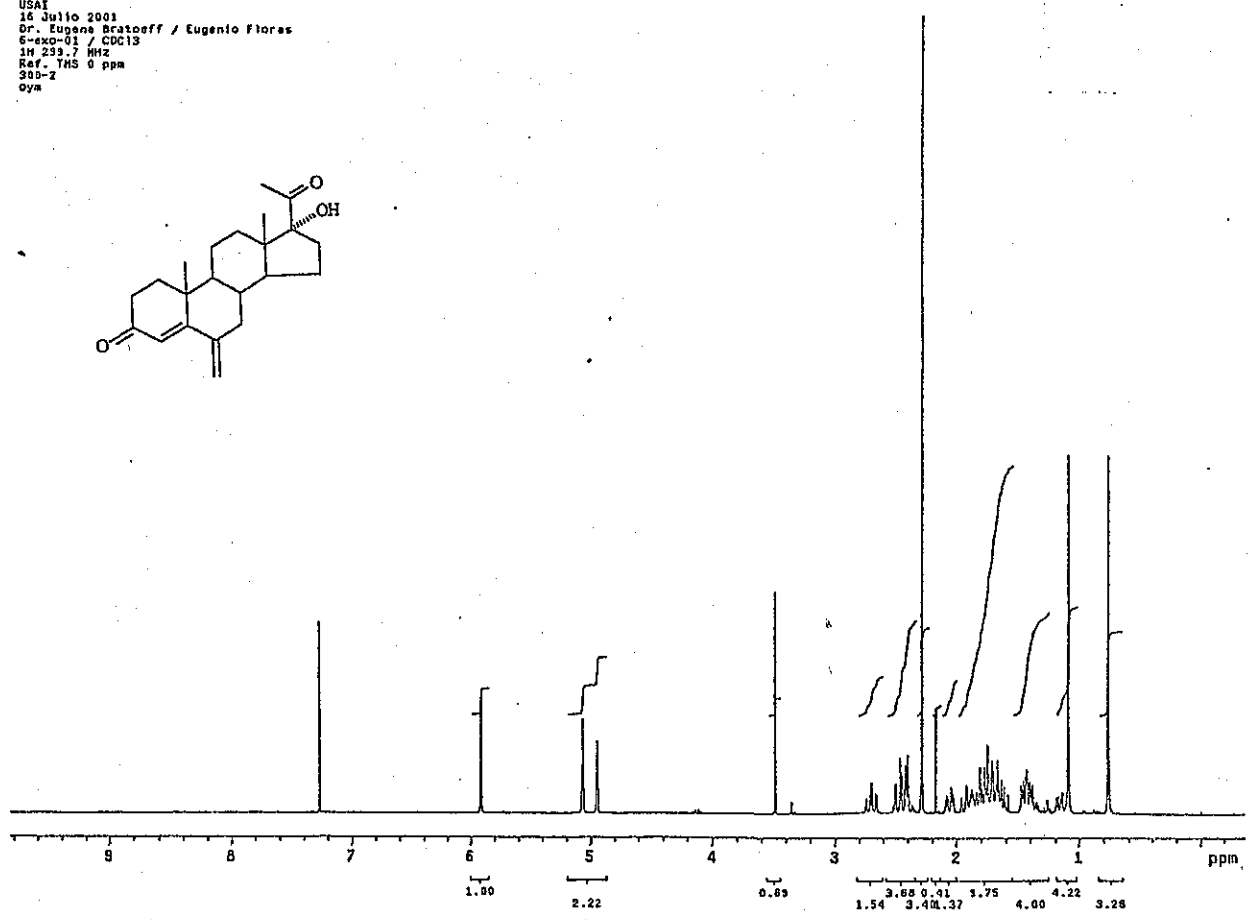
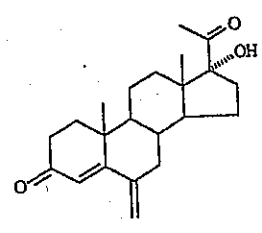
Espectro XIII A

USA1
04/JULIO/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
Met-exp/CDC13
13C-75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
rdm



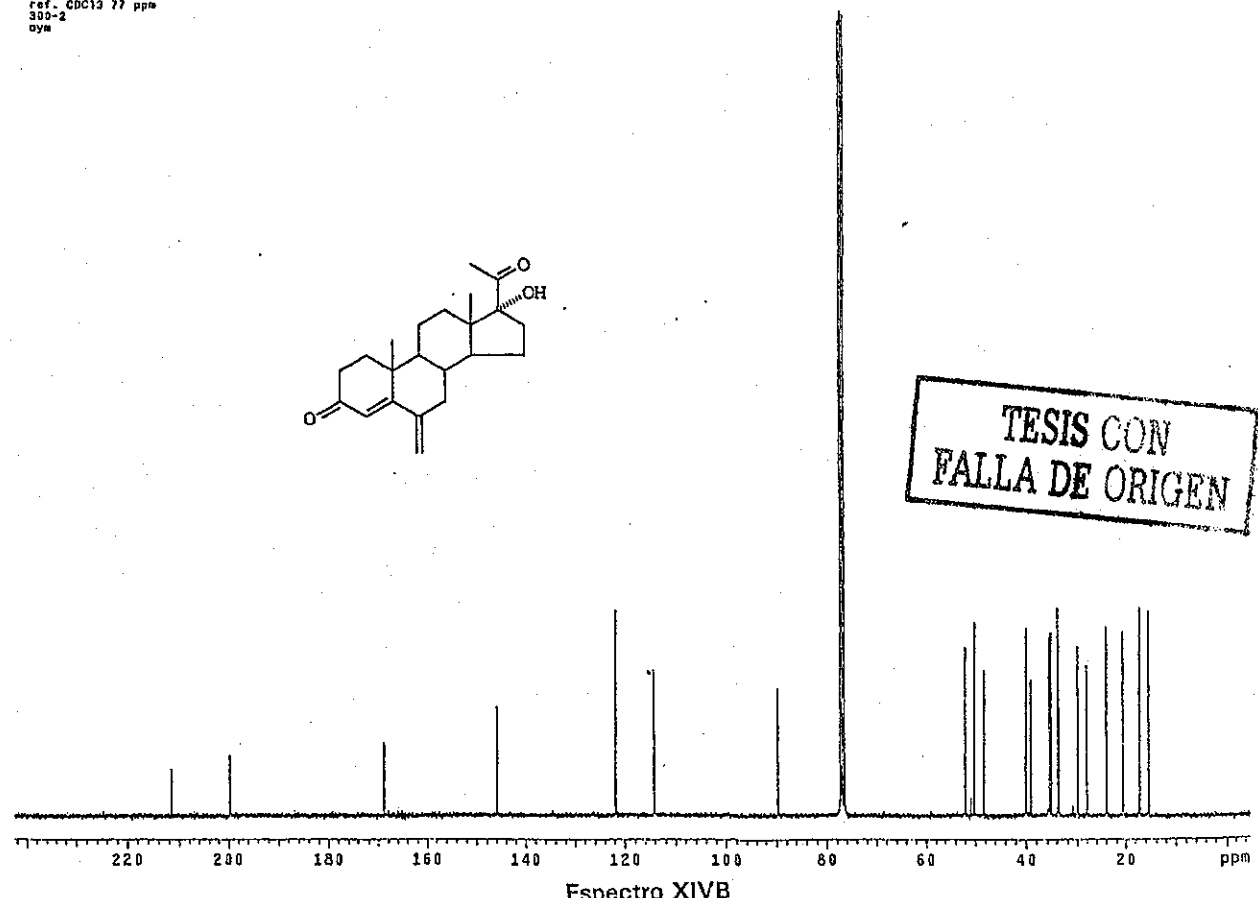
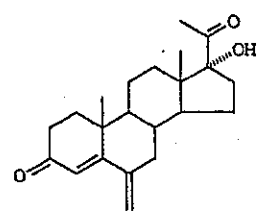
Espectro XIII B

USAI
16 Julio 2001
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
6-*exo*-01 / CDC13
1M 239.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



Espectro XIVA

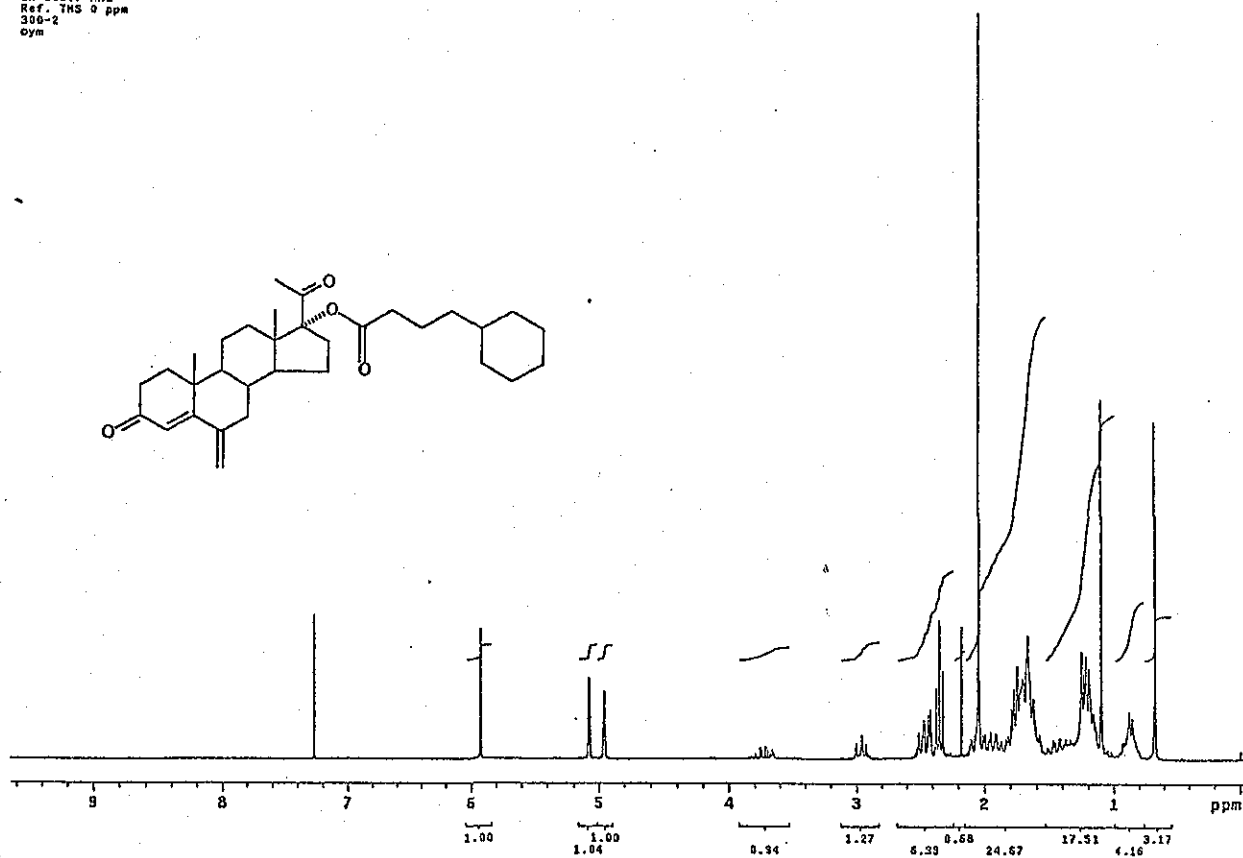
USAI
13 Julio 2001
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
6-*exo*-01 / CDC13
13C 75.3 MHz
ref. CDC13 77 ppm
300-2
oym



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

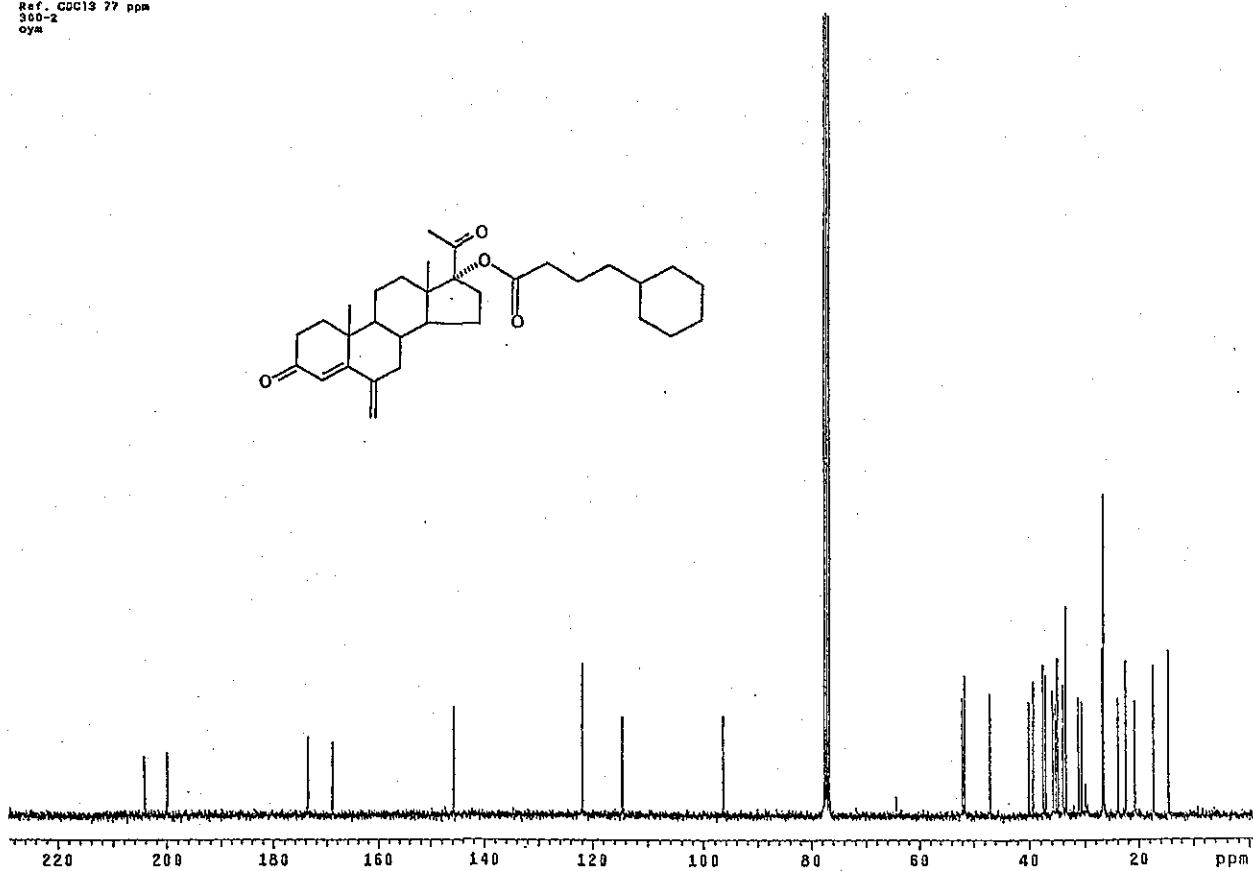
Espectro XIVB

USA1
 23 novembre 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 6-exo-CHXBU / CDCl₃
 1H 299.7 MHz
 Ref. TMS 0 ppm
 300-2
 oym



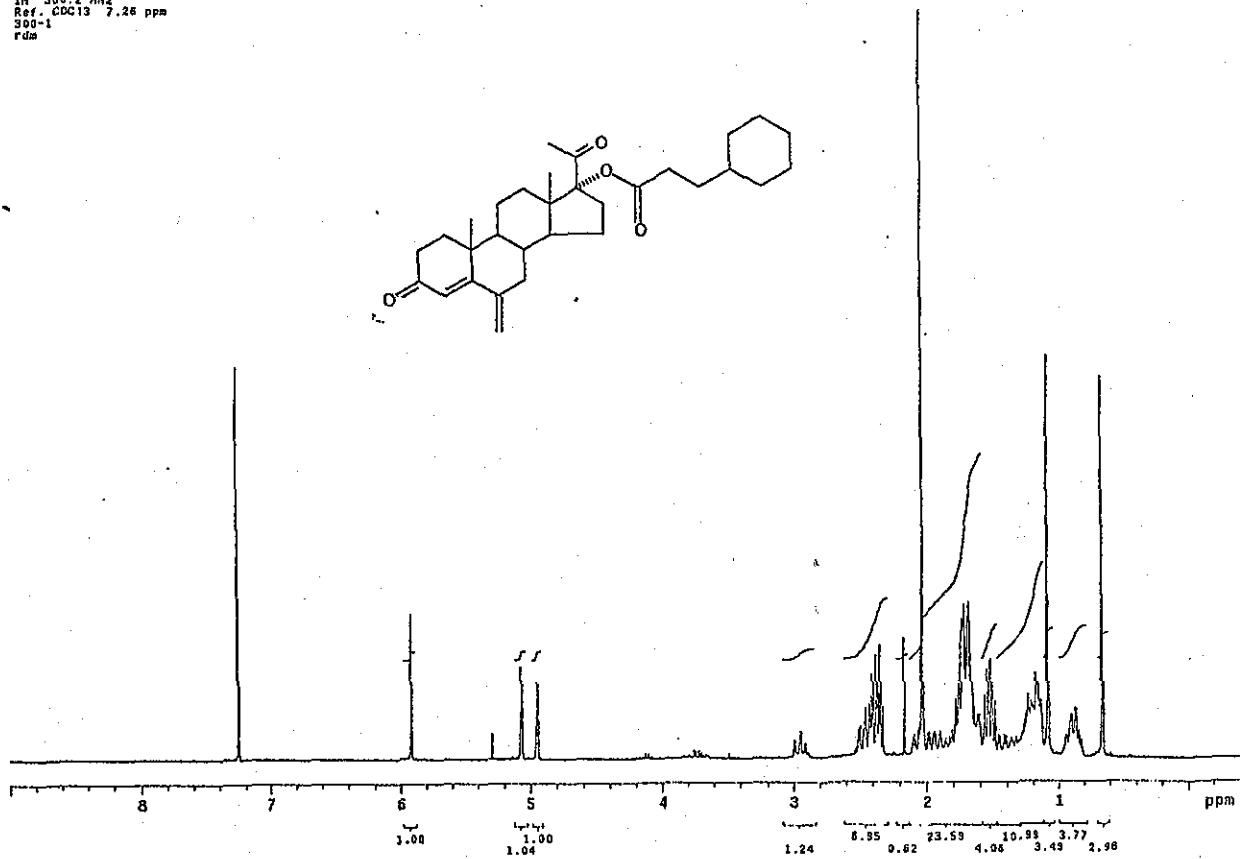
Espectro XVA

USA1
 22 novembre 2001
 Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
 6-exo-CHXBU / CDCl₃
 13C 75.5 MHz
 Ref. CDCl₃ 77 ppm
 300-2
 oym



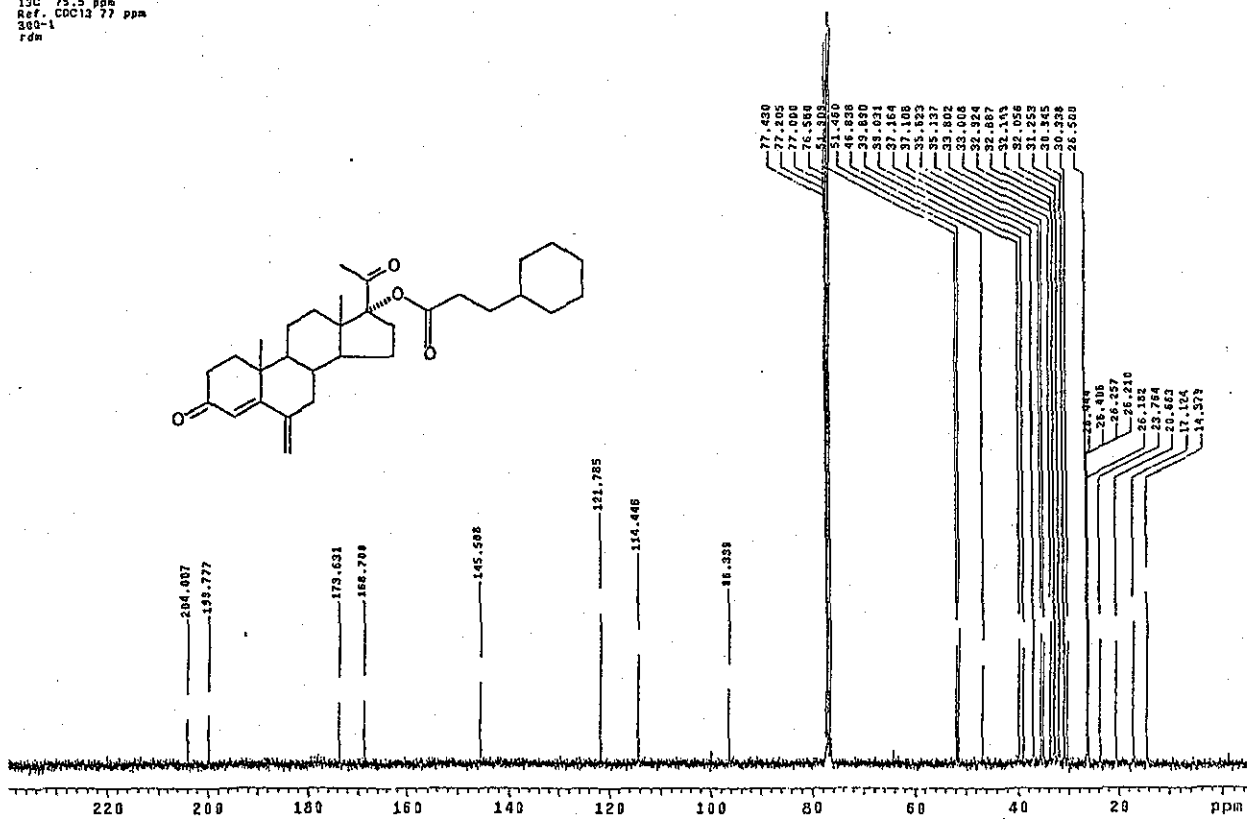
Espectro XVB

USA1
 22/OCTUBRE/2001
 Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio flores
 6- α -CHOxPr/CDC13
 1H 300.2 MHz
 Ref. CDC13 7.26 ppm
 300-1
 fdm



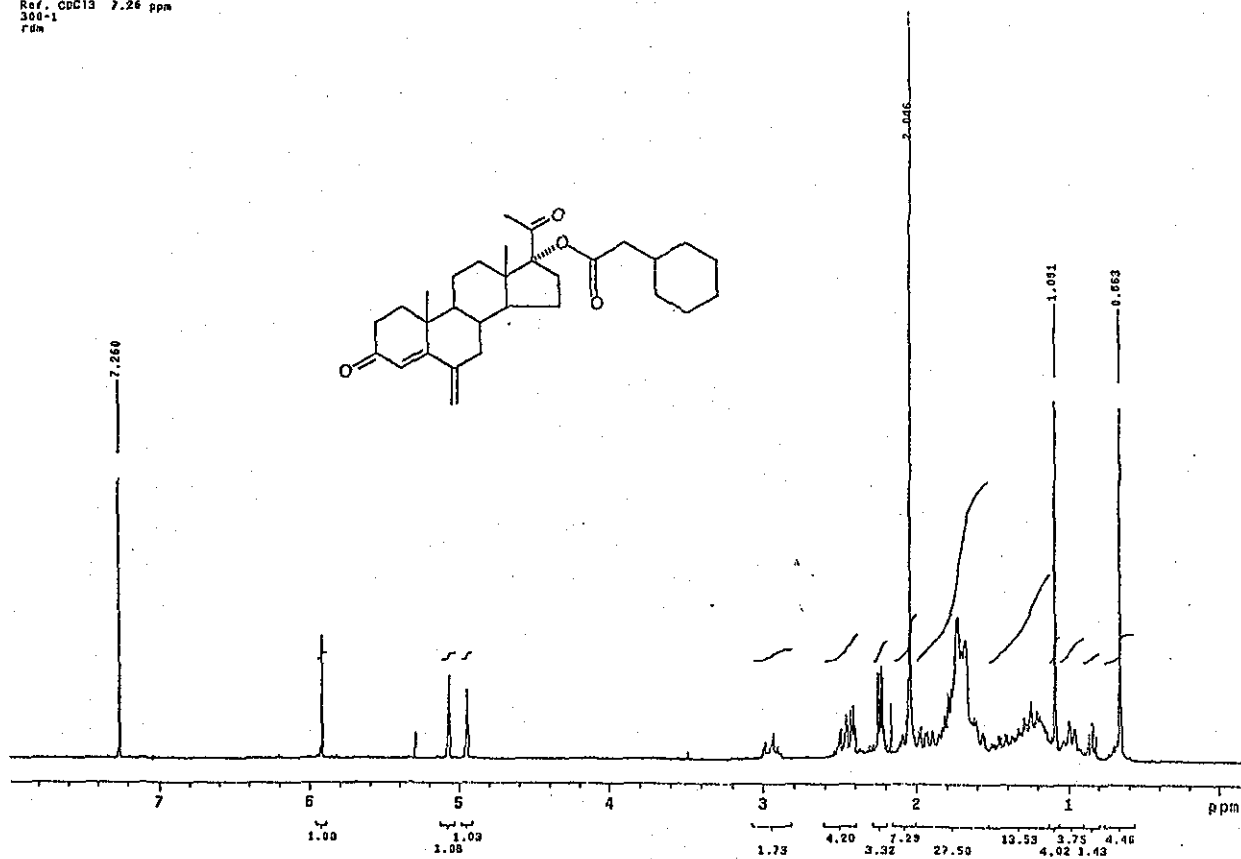
Espectro XVIA

USA1
 22/OCTUBRE/2001
 Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio flores
 6- α -CHOxPr/CDC13
 13C 75.5 ppm
 Ref. CDC13 77 ppm
 300-1
 fdm



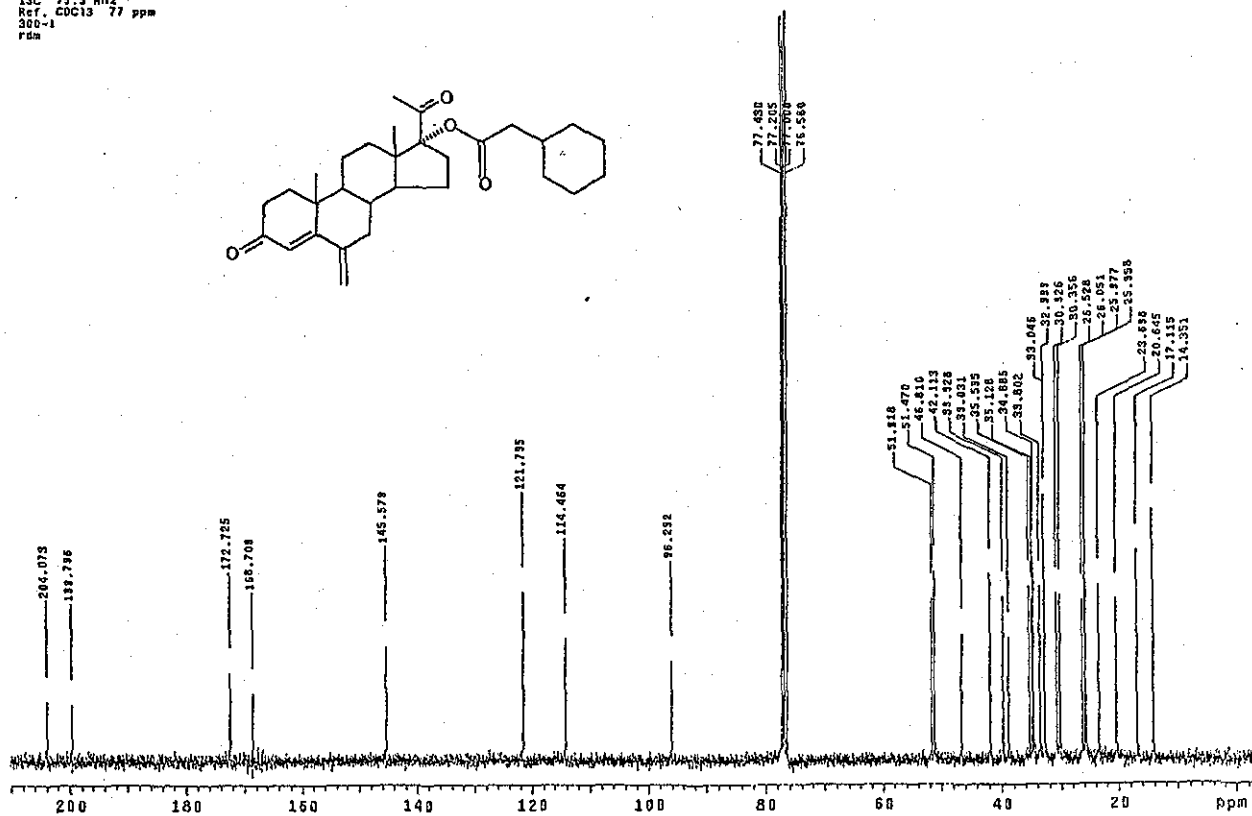
Espectro XVIB

USA7
14/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugene Bratoeff/Eugenio Flores
6-*exo*-CHXAC/CDC13
1H 300.2 MHz
Ref. CDC13 7.26 ppm
300-1
rdm



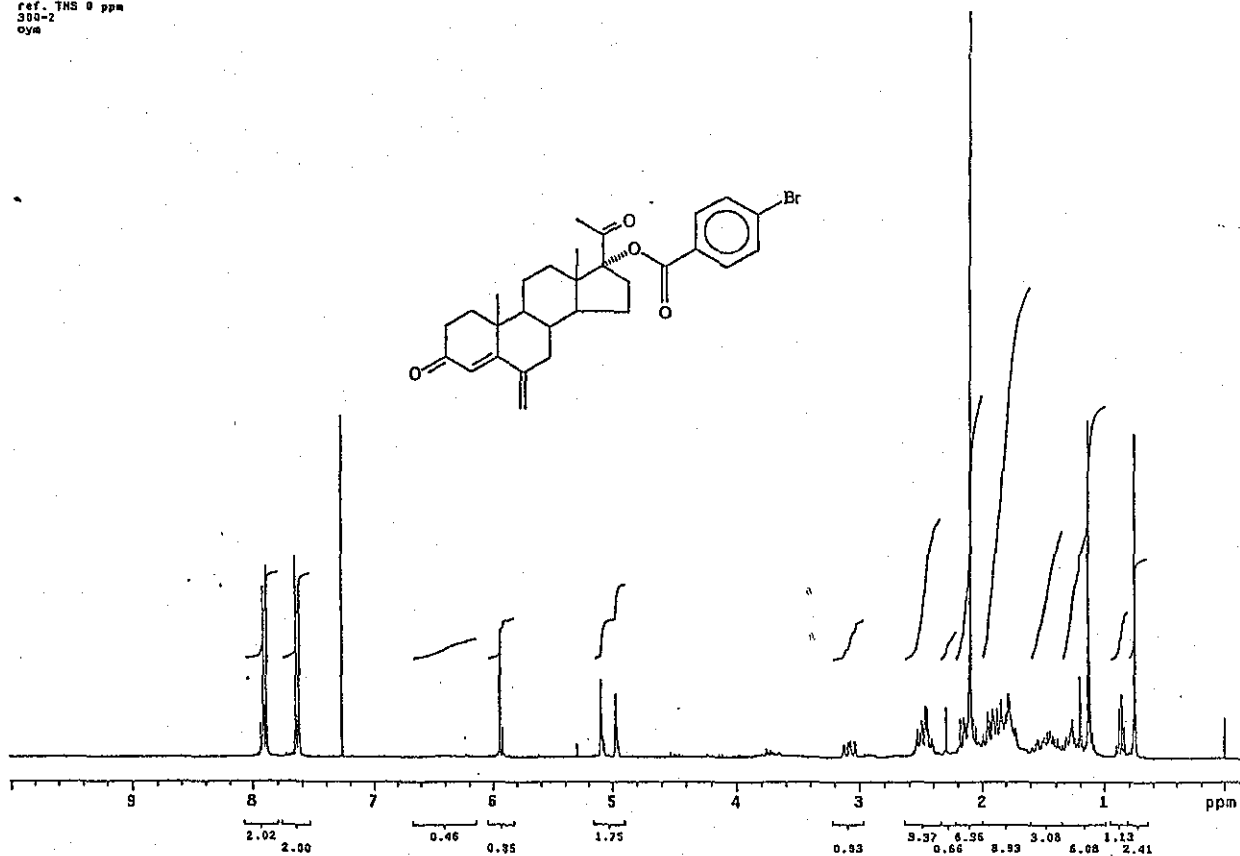
Espectro XVIIA

USA7
14/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugene Bratoeff/Eugenio Flores
6-*exo*-CHXAC/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
rdm



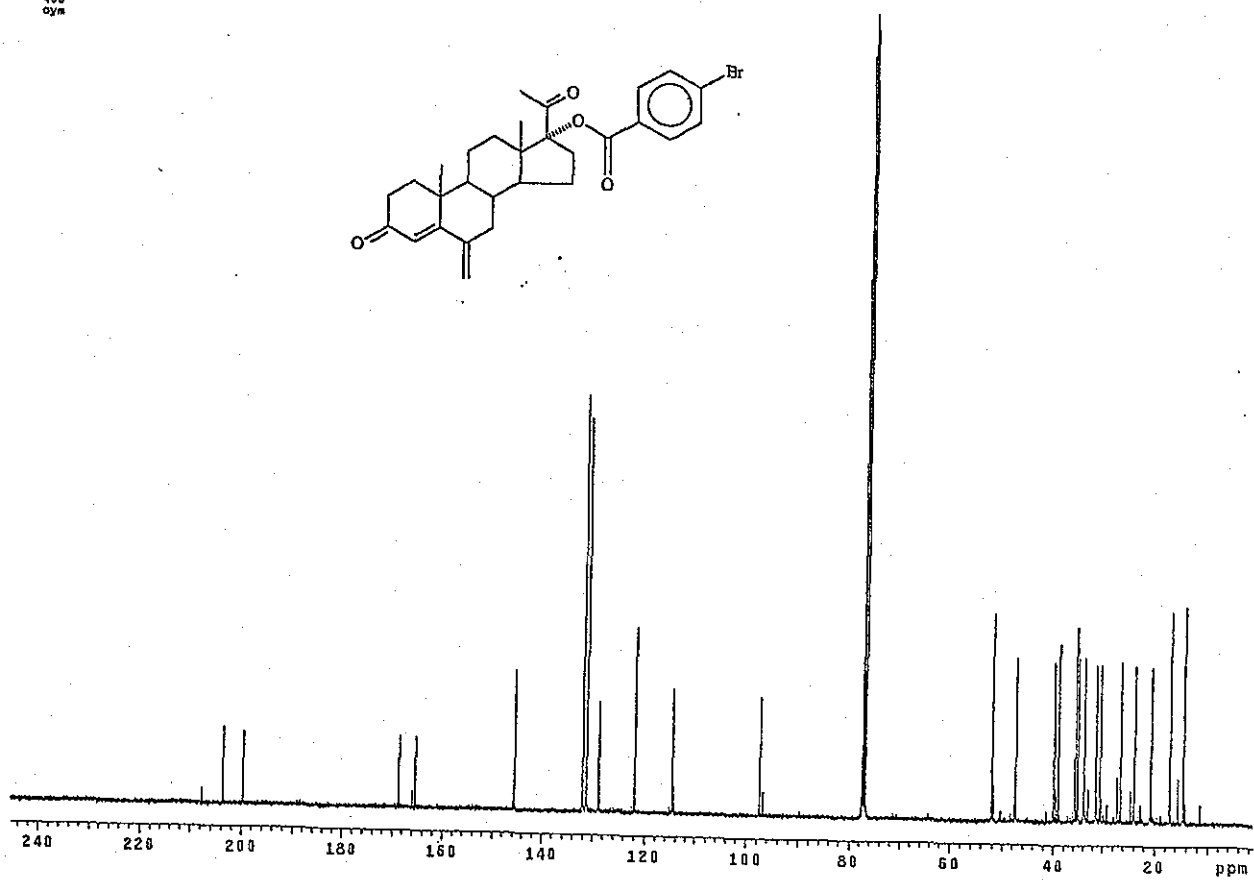
Espectro XVIIIB

USAI
4 octubre 2001
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Floras
6-oxo-8Z-Br / CDCl₃
1H 299.7 MHz
ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



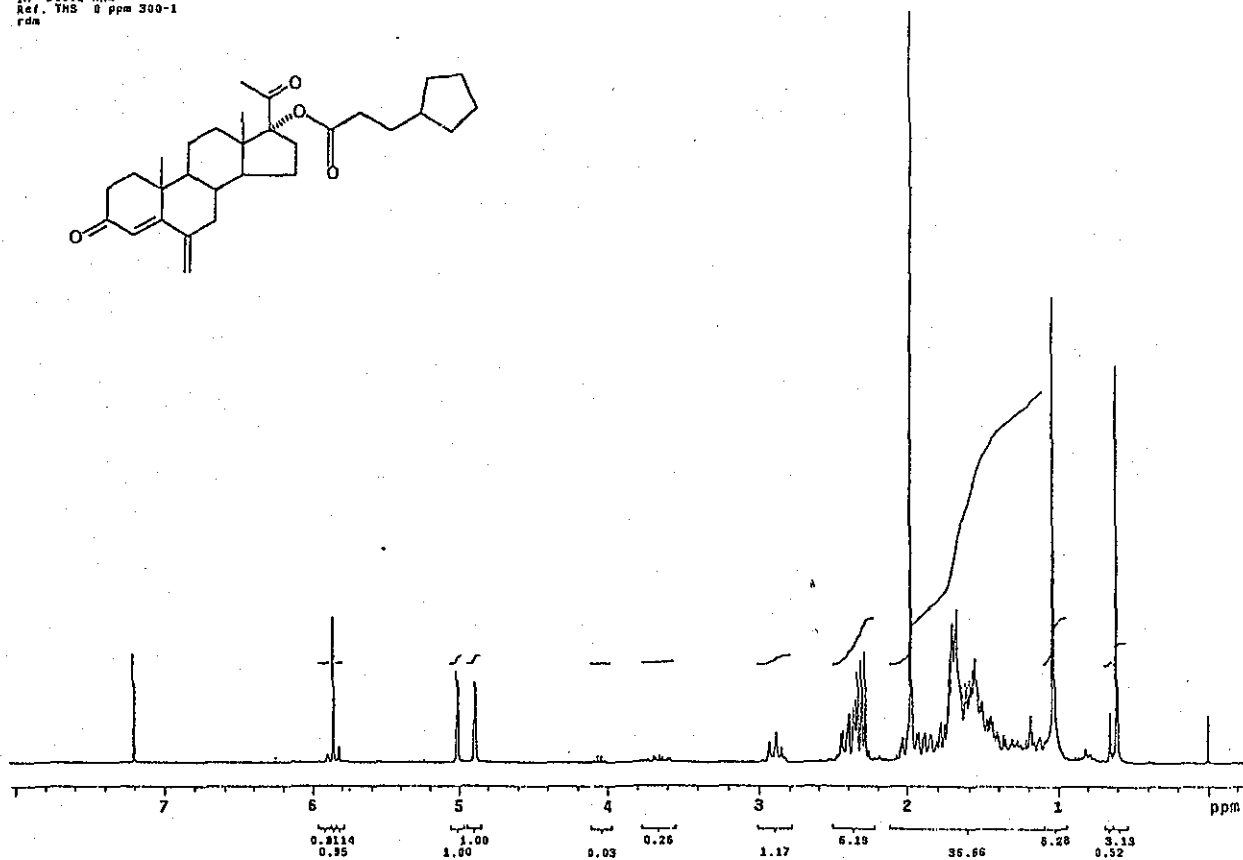
Espectro XVIII A

USAI
2 octubre 2001
Dr. Eugenio Bratoeff
6-oxo-8Z-Br / CDCl₃
13C 100 MHz
ref. CDCl₃ 77 ppm
400
oym



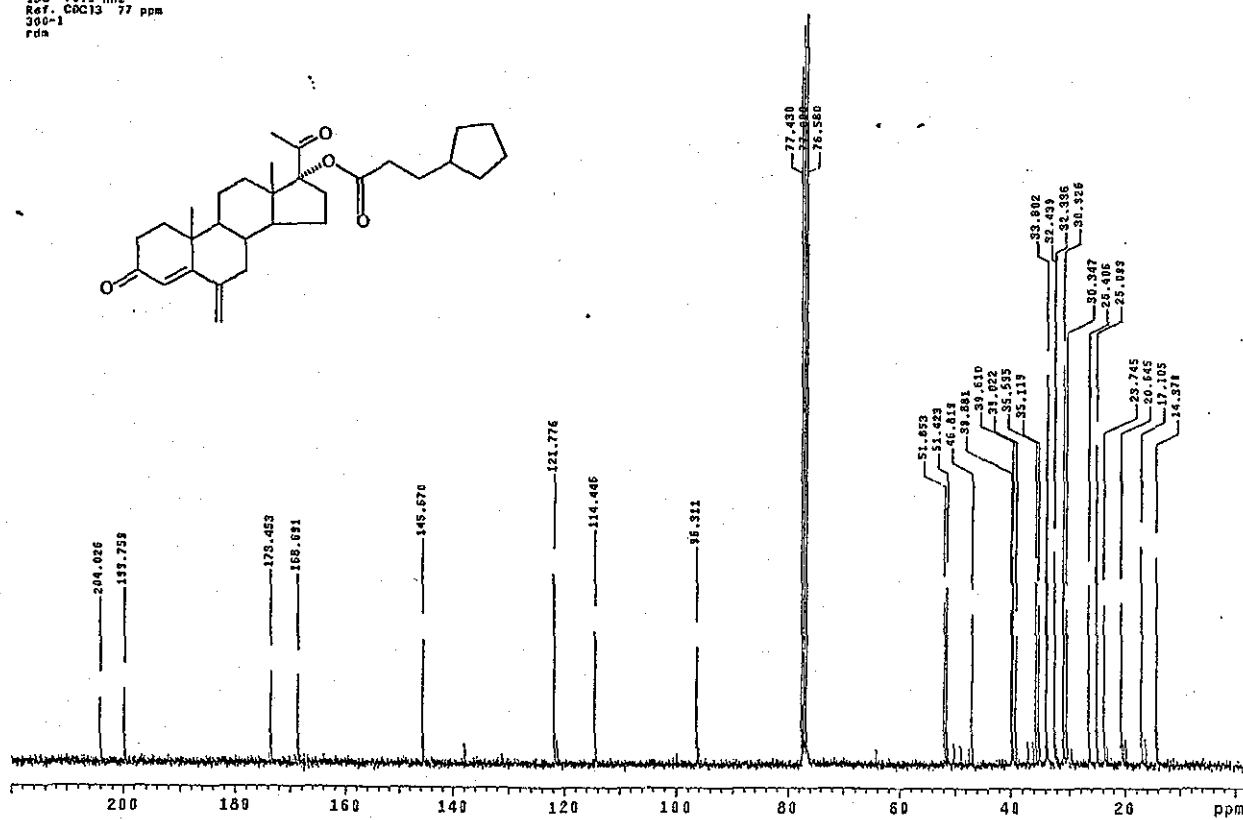
Espectro XVIII B

USA1
21/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugene Gratoeff/Eugenio Flores
6-oxo-CPPr/CDC13
1H 300.2 MHz
Ref. TMS 0 ppm 300-1
rdm



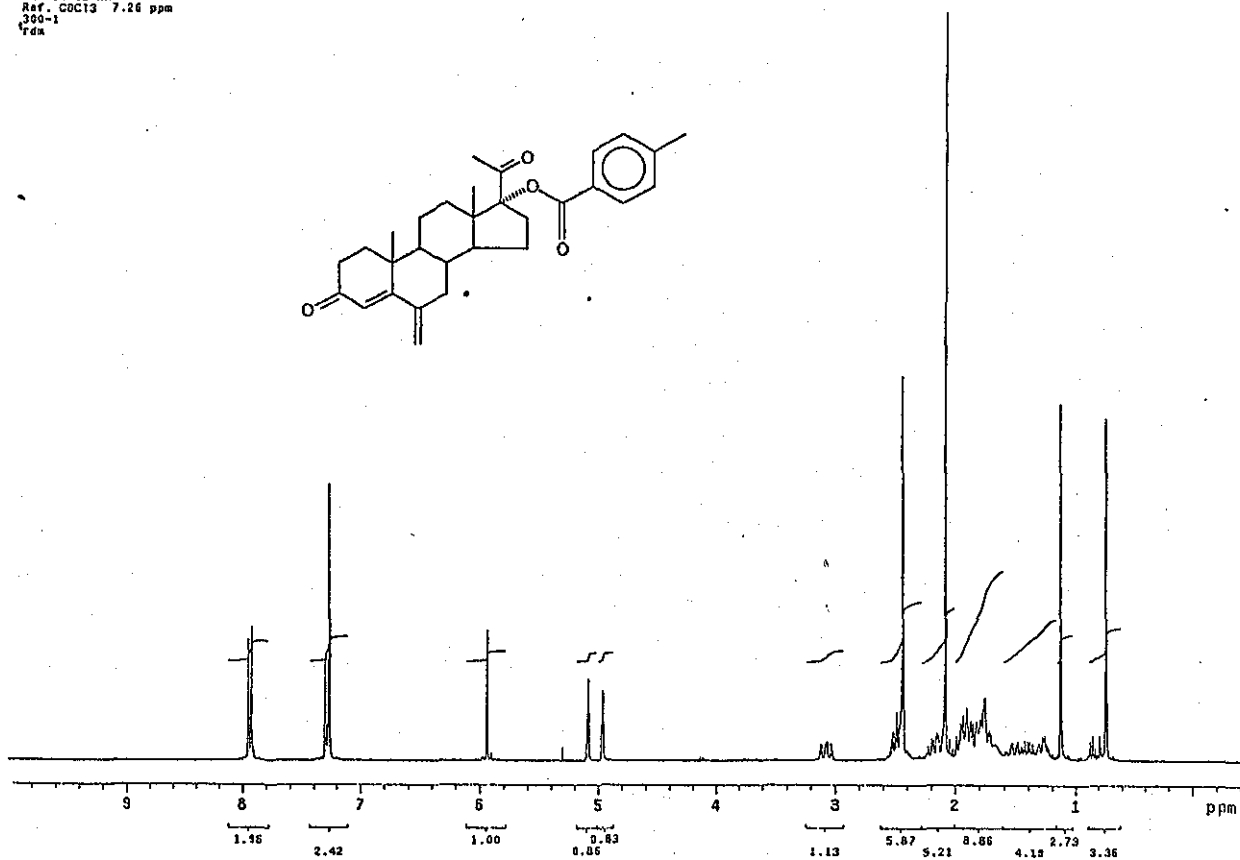
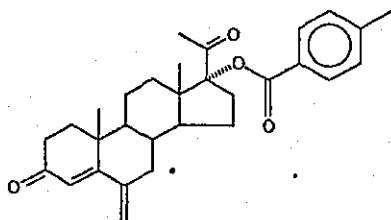
Espectro XIXA

USA1
21/NOVIEMBRE/2001
Dr. Eugene Gratoeff/Eugenio Flores
6-oxo-CPPr/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
rdm



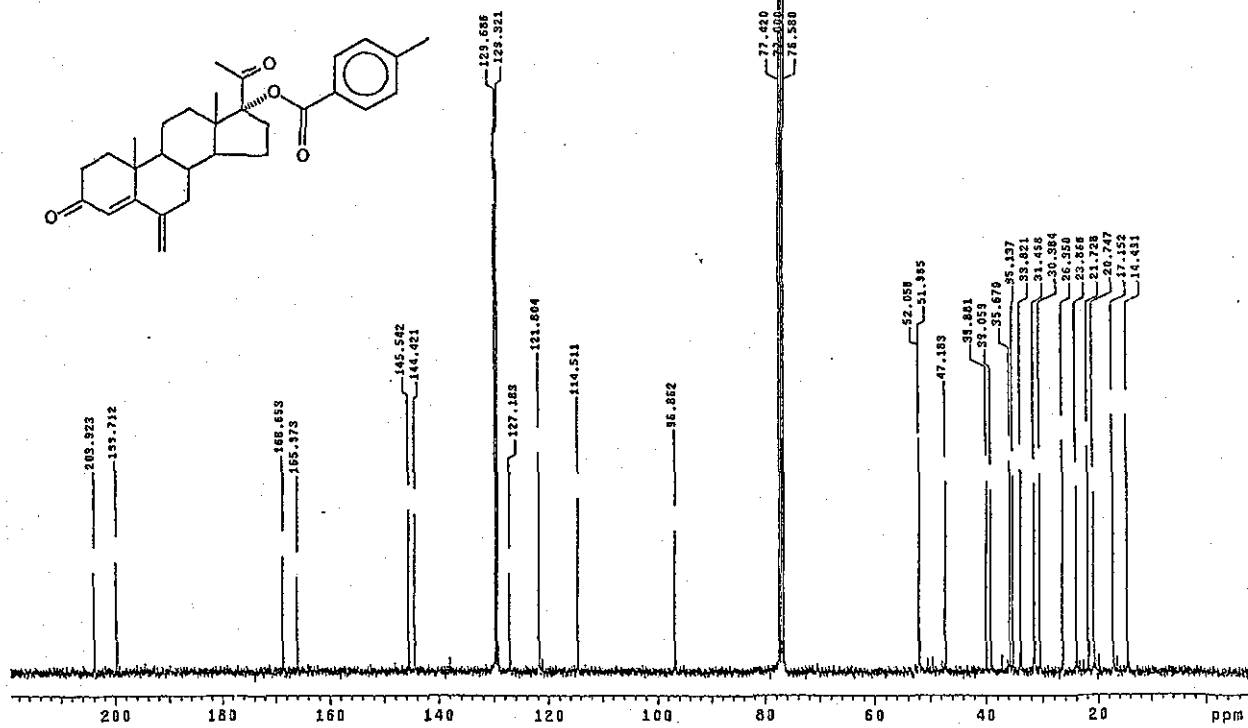
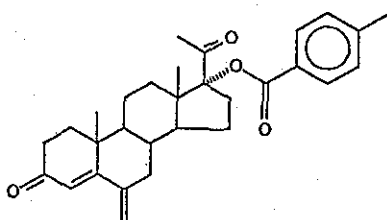
Espectro XIXB

USAI
02/OCTUBRE/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
6-exo-DB2-He/CDC13
1H 300.2 MHz
Ref. CDC13 7.26 ppm
300-1
TGA



Espectro XXA

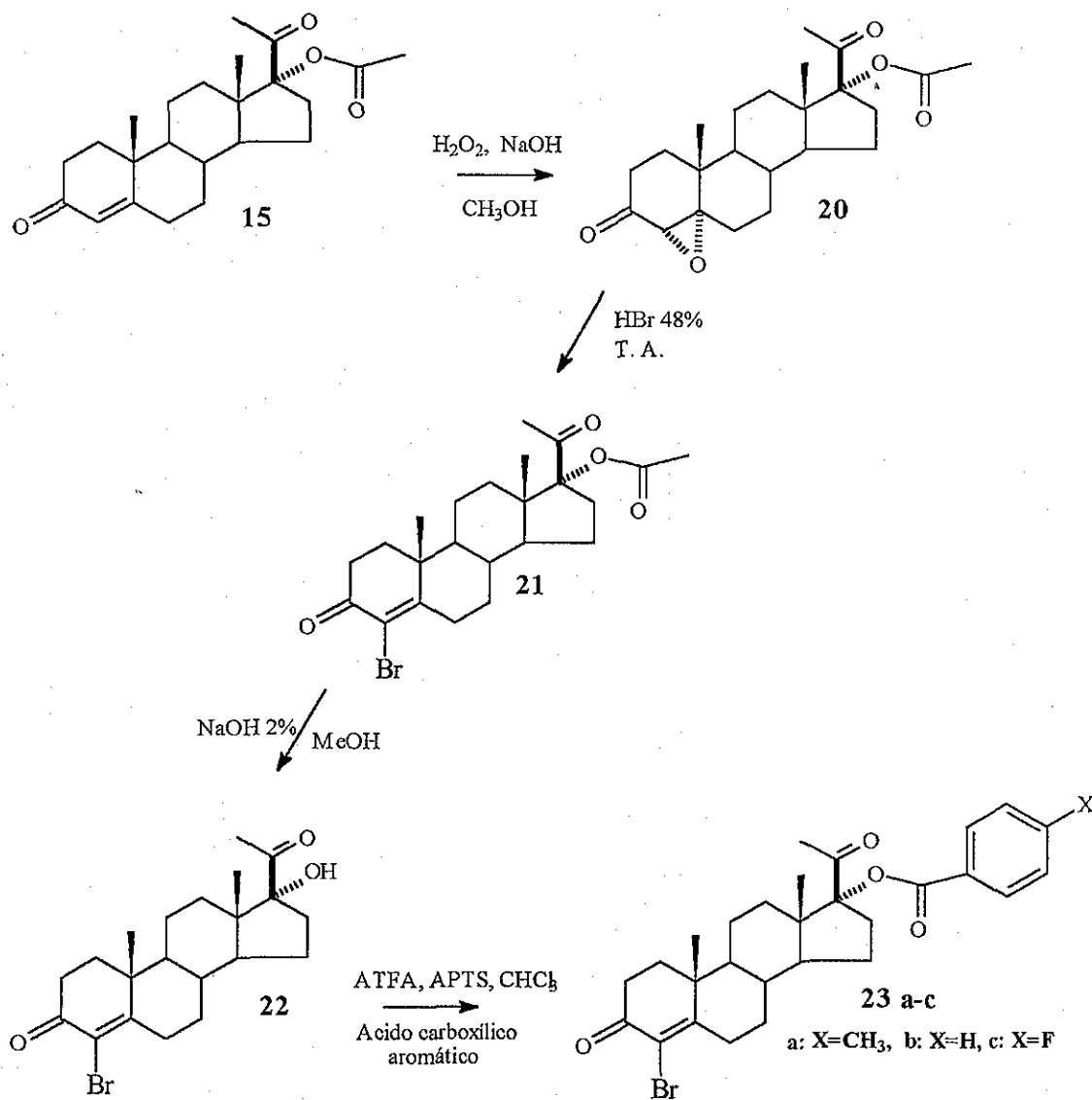
USAI
02/OCTUBRE/2001
Dr. Eugenio Bratoeff/Eugenio Flores
6-exo-DB2-He/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
TGA



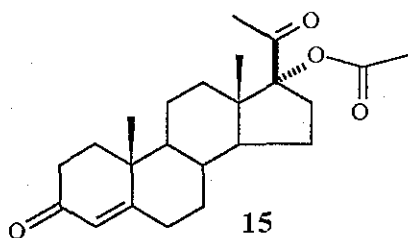
Espectro XXB

Discusión de la Tercera Parte. Compuestos 23 a-c

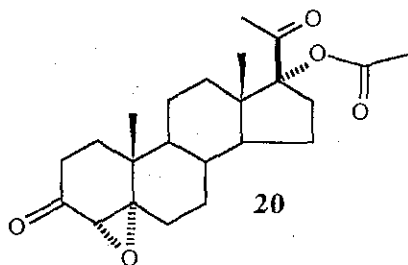
En esta última parte, se pretendió determinar la influencia que ejercería el átomo de bromo unido al C-4 en conjunción con el efecto del sustituyente en el anillo aromático del éster y para ello se desarrolló el siguiente esquema de síntesis:



Se propuso que el proceso de síntesis iniciara con la materia prima **15** (su caracterización física y espectroscópica fue descrita en la segunda parte de este trabajo, ver páginas 41-42 y 54), porque tiene los grupos funcionales necesarios para alcanzar el objetivo propuesto: un sistema 4-en-3-ona susceptible de ser oxidado con agua oxigenada con una adición nucleofílica tipo Michael y así obtener un epóxido que puede ser convertido en un sistema 4-bromo-4-en-3-ona mediante un tratamiento con HBr y por otra parte tiene un éster en el C-17 que puede ser hidrolizado y esterificado de nueva cuenta con los diferentes ácidos carboxílicos propuestos:



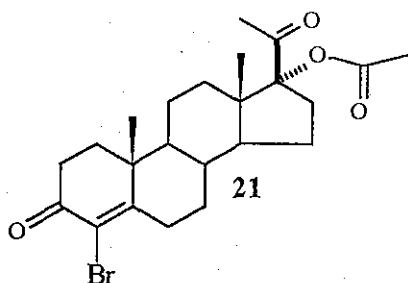
Por lo tanto, la materia prima fue sometida a un tratamiento con H₂O₂ en medio básico, de modo que el anión hidroperóxido se adicionó a la doble ligadura conjugada para producir el epoxido α **20** con un rendimiento del 98 % (el metilo β -axial en el C-19 impide la adición del anión por la cara β).⁵⁸ El espectro de IR del compuesto **20** muestra 2 bandas intensas en 1722 (C=O) y 1252 (C-O) cm⁻¹ que se adjudican al carbonilo del éster; una banda que se ubica en 1712 cm⁻¹ para los carbonilos en C-20 y C-3, la presencia del epóxido se confirma pues en el espectro de UV no se observa absorción alguna.



El espectro de RMN de ^1H (Espectro XXIA) tiene algunas diferencias con el espectro del compuesto **15**, por ejemplo ya no aparece el protón en 5.8 ppm que correspondía al protón 4 del sistema conjugado, en cambio aparece una señal simple en 3.0 ppm que integra para un protón y que se asigna al protón 4 base del epóxido, las señales restantes presentan los mismos desplazamientos en ambos espectros. En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro XXIB) ocurre lo mismo, cuando existía el carbonilo conjugado, los carbonos C-4 y C-5 aparecían en 124 y 170 ppm, ahora están desplazados a campo alto en 60.3 y 70.1 ppm respectivamente. El espectro de masas muestra un ion molecular en 388 m/z.⁵⁹

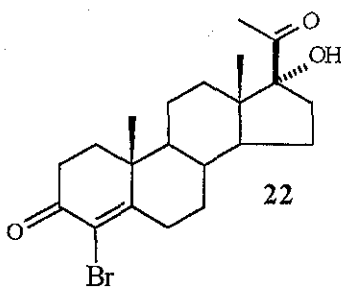
La siguiente etapa de la síntesis consistió en la apertura del oxirano en medio ácido, la que se inicia con la protonación del oxirano y la posterior adición nucleofílica del anión bromuro para producir una halohidrina con estereoquímica *anti*, que se deshidrata en las condiciones de la reacción y se conjuga con el carbonilo, siendo esta la fuerza motriz que propicia la eliminación de la molécula de agua para obtener el compuesto **21**.⁵⁹⁻⁶⁰

El derivado bromado **21** muestra de nueva cuenta, en su espectro de IR la presencia del carbonilo conjugado en 1671cm^{-1} además de los carbonilo del éster y en el C-20 en 1736 y 1710cm^{-1} respectivamente. El espectro de UV indica la regeneración del sistema 4-en-3-ona pues muestra un máximo de absorción en 240 nm. En el espectro de RMN ^1H (Espectro XXIIA) del derivado bromado ya no presenta la señal simple que se asignó a la base del epóxido en 3.0 ppm, además



el espectro de ^{13}C (Espectro XXII B) muestra que los carbonos 4 y 5 están desplazados hacia campo bajo, ahora se localizan en 121.6 y 167.5 ppm cuando que antes se visualizaban en 60.3 y 70.1 ppm respectivamente; el carbono al que está unido el éster se presenta en 96.5 ppm. El espectro de masas muestra un ion molecular en 450 m/z y la contribución isotópica en 452 m/z, lo que confirma la presencia del átomo de bromo en la molécula.⁵⁹⁻⁶⁰

La síntesis continuó con la saponificación del éster unido al C-17; para ello se calentó a reflujo el compuesto 21 en metanol con una disolución de NaOH al 2%, de esta manera se obtuvo el alcohol libre 22.⁵⁶⁻⁵⁷



El análisis de los datos espectroscópicos de IR del compuesto 22, muestra en 1656 y 1709 cm^{-1} las bandas para el carbonilo conjugado y el de C-20 respectivamente, (no están presentes las bandas en 1730 y 1256 cm^{-1} para el

grupo funcional éster), además se observa una banda intensa en 3400 cm^{-1} que se atribuye al alcohol libre.

El espectro de RMN de ^1H (Espectro XXIII A) del compuesto **22** no muestra la señal simple en 2.1 ppm que se asignaba al metilo del éster y en cambio ahora se visualiza una señal simple en 3.58 ppm que intercambia con agua deuterada que se adjudica al alcohol unido al C-17; el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro XXIII B) presenta solo dos carbonilos en 211.6 y 194 ppm (carbonilos en C-20 y C-3), a diferencia del espectro del compuesto **21** que muestra un carbonilo y un metilo más en 170.6 y 21.3 ppm. El carbono unido al alcohol se localiza en 89.8 ppm, cuando este carbono estaba unido al éster se ubicaba en 96.5 ppm. En la espectrometría de masas se observa un ion molecular en 408 m/z y la contribución isotópica en 410 m/z.

La información espectroscópica anterior se resume en las siguientes Tablas:

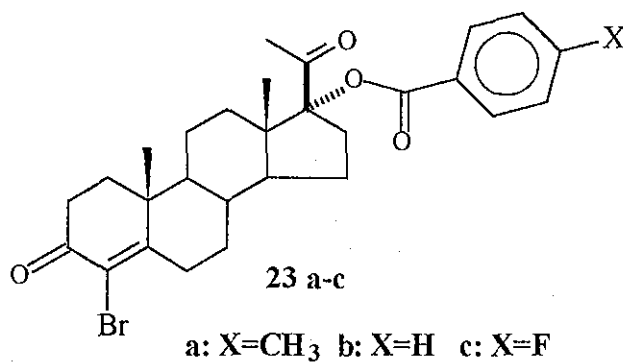
**Tabla No. 16 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H
de los compuestos 20-22**

Hidrógeno	20	21	22
4	3.0 s	-----	-----
Me-18	0.68 s	0.69 s	0.7 s
Me-19	1.2 s	1.2 s	1.2 s
Me 21	2.0 s	2.0 s	2.0 s
Me-éster	2.1 s	2.1 s	2.1 s
O-H	-----	-----	3.6

Tabla No. 17 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C
de los compuestos 20-22

Carbono	20	21	22
3	204.0 s	190.6 s	194.0 s
4	60.3 d	121.6 s	121.8 s
5	70.1 s	167.5 s	167.7 s
17	96.7 s	96.5 s	89.8 s
Me-18	14.8 c	14.9 c	15.0 c
Me-19	17.6 c	17.4 c	17.6 c
20	206.0 s	203.9 s	211.4 s
21	26.0 c	26.1 c	26.0 c
Me-éster	21.2 c	21.3 c	-----
C=O éster	170.7 c	170.6 c	-----

La etapa final de la síntesis fue la esterificación del alcohol **22** con los ácidos: benzoico, *p*-metil-benzoico y *p*-fluoro-benzoico, mediante el procedimiento descrito anteriormente en la primera parte de esta tesis (Ver páginas 16 y 27), para obtener los compuestos **23 a-c**, como se indica en la siguiente figura:



Los espectros de IR de los ésteres **23 a-c** presentan los siguientes grupos funcionales: 1730 cm^{-1} carbonilo del ester, 1715 y 1680 cm^{-1} los carbonilos en los carbonos C-20 y C-3 respectivamente; en los espectros de U.V. se observa el sistema conjugado en el intervalo de 240-253 nm. Los espectros de RMN de ^1H (Espectros XXIVA-XXVIA) presentan varios desplazamientos químicos semejantes: los metilos en los carbonos 18, 19 y 21 aparecen en 0.8, 1.2 y 2.1 ppm; los desplazamientos químicos de los protones aromáticos de los ésteres son similares a los ya discutidos previamente en la primera parte de este trabajo. (Ver página 18, ésteres **14b** y **14e**). Los espectros de RMN de ^{13}C (Espectros XXIVB-XXVIB) muestran 3 señales simples desplazadas a campo bajo en 203.9, 192.0 y 170.7 ppm que se atribuyen a los carbonilos en C-20, C-3 y éster; los metilos 18, 19 y 21 aparecen en 14.8, 18.0 y 21.0 ppm; los carbonos de la doble ligadura se localizan en 121 y 167 ppm. Los espectros de masas indican que el patrón de fragmentación es similar al patrón explicado para los ésteres **14b** y **14e** (Ver página 18). En las siguientes Tablas se condensa la información espectroscópica:

**Tabla No. 18 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H
de los compuestos **23 a-c****

Hidrógeno	23a	23b	23c
Me-18	0.78 s	0.8 s	0.8 s
Me-19	1.2 s	1.2 s	1.2 s
Me 21	2.0 s	2.0 s	2.0 s
Espectros	XXIVA	XXVA	XXVIA

**Tabla No. 19 Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C
de los compuestos 23 a-c**

Carbono	23a	23b	23c
3	190.3 s	190.8 s	190.6 s
4	128.3 s	130.8 s	128.5 s
5	167.0 s	167.5 s	167.7 s
Me-18	14.5 c	14.9 c	15.0 c
Me-19	17.6 c	18.3 c	18.2 c
20	203.9 s	204.6 s	203.4 s
21	26.0 c	24.3 c	25.3 c
Me-Anillo aromático	21.7 c	-----	-----
C=O éster	170.7 s	170.4 s	170.5 s
Espectro	XXIVB	XXVB	XXVIB

Evaluación farmacológica de los compuestos 23 a-c.

Los compuestos 23 a-c también fueron evaluados biológicamente en la fracción membranal de próstata de hámsters, de la misma manera que se describió en la segunda parte de esta Tesis (página 57). En la siguiente tabla se observan los valores de la concentración de inhibición al 50 % de la enzima 5 α -reductasa.

Tabla No. 20 Inhibición al 50 % de los compuestos 23 a-c

Compuesto	C.I. ₅₀
23a	114 μ M
23b	100 μ M
23c	0.28 mM
Finasterida	10 nM

El compuesto **23c** fue probado también en cultivos de *Penicillium crustosum*, con la finalidad de determinar su posible efecto inhibitorio sobre la enzima 5 α -reductasa y con sus resultados evaluar la posibilidad de sustituir el modelo biológico. Los resultados son los siguientes:

Los valores de K_m y V_m de la enzima 5 α -reductasa en *P. crustosum* son: $0.22 \pm 0.07 \mu\text{M}$ y $0.83 \pm 0.05 \text{ pmol de DHT / mg de micelio / dia}$.

Los valores de K_i para finasterida es $1.54 \pm 0.25 \mu\text{M}$ y para el compuesto **23c** es de $12.6 \pm 2.5 \text{ nM}$ a una concentración de $60 \mu\text{M}$.

Finasterida y **23c** presentan inhibición competitiva a 60 y 20 μM , si embargo a $40 \mu\text{M}$ la inhibición no es competitiva.

Conclusiones de la Tercera Parte.

El valor tan alto de K_m para la enzima 5 α -reductasa presente en *P. crustosum*, indica que posee baja afinidad por su sustrato. Adicionalmente, su V_m señala que la máxima velocidad se obtiene cuando la enzima existe totalmente en la forma del complejo enzima:sustrato.

Además, los valores de K_i muestran que la afinidad de finasterida hacia la enzima es menor en comparación a la afinidad que presenta el compuesto **23c**; es decir en *P. crustosum* el compuesto **23c** es un mejor inhibidor que finasterida.

Por otra parte, los valores obtenidos a partir de la evaluación realizada en la fracción membranal de próstata de hamsters, muestran que el compuesto que menos inhibe a la enzima 5 α -reductasa, es precisamente **23c**, el mejor es **23b** y le sigue **23a**.

Por lo tanto, si se quiere sustituir un modelo biológico por otro, es necesario seleccionar al compuesto que presente la mejor inhibición en *P. crustosum* y probarlo en tejidos animales y humano, considerando que debe haber consistencia en los resultados de los modelos para validar la sustitución.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Procedimiento experimental de la Tercera Parte. Compuestos 23 a-c.

Caracterización de 17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (15).

(Ver página 41-42).

17 α -acetoxi-4 α ,5 α ,-epoxi-pregnan-3,20-diona (20)

En un matraz bola de 100 ml se disolvió 1 gramo (2.7 mmol) del compuesto 15 en 50 ml de metanol y se calentó hasta la disolución del compuesto, posteriormente se agregó 1 ml (2.7 mmol) de NaOH al 10% y 1.4 ml (12.3 mmol) de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas, al termino de la reacción se vertió en agua, precipitando de esta manera el compuesto 20, el cual fue filtrado y lavado con agua hasta pH neutro. El producto se secó al vacío.⁵⁸ El producto se recrystalizó de metanol. Rendimiento=98% (1 gramo), P.M.: 388, Punto de Fusión: 192-194°C, IR ν : 2948, 1722, 1712, 1252 cm^{-1} cm^{-1} . RMN de ^1H (Espectro XXIA): Tabla No.16, RMN de ^{13}C (Espectro XXIB): Tabla No. 17.

4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (21).

En un matraz bola de 100 ml, se disolvió 1 gramo (2.57 mmol) del compuesto 20 en 60 ml de metanol y se añadieron 15 ml (88.9 mmol) de HBr al 48%, la reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina. La mezcla de reacción se vertió en 150 ml de agua para precipitar al compuesto 21, fue filtrado y lavado con suficiente agua hasta pH neutro. El producto fue recrystalizado de metanol.⁵⁹⁻⁶⁰ El producto se recrystalizó de metanol. Rendimiento=90% (1 gramo), P.M.: 450, Punto de Fusión: 195-196°C, IR: 2945, 1736, 1671, 1254 cm^{-1} UV: 240 nm, RMN de ^1H (Espectro XXIIA): Tabla No.16, RMN de ^{13}C (Espectro XXIIB): Tabla No. 17

4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (22).

Se realizó el mismo procedimiento experimental descrito anteriormente, para la obtención del compuesto **19**,⁵⁶⁻⁵⁷ utilizando al compuesto **21** como materia prima (páginas 45 y 55) Rendimiento = 70% (0.63 gramos). El producto se recrystalizó de metanol. P.M.: 408, Punto de Fusión: 204-206°C, IR v: 3400, 2948, 1709, 1656 cm⁻¹ UV: 255 nm, RMN de ¹H (Espectro XXIIIA): Tabla No.16, RMN de ¹³C (Espectro XXIIIB): Tabla No. 17. Las características espectroscópicas de los compuestos **20-22**, se localizan en las Tablas No. 16-19

**Tabla No. 21 Espectrometría de Masas y rendimientos
de los compuestos 20-22**

	Espectrometría de Masas	Rendimientos
20	388 M ⁺ (10), 346(15), 345(14), 303(40), 285(100)	98 %
21	450 M ⁺ (2), 452 M ⁺ + 2(2), 410(15), 408(14), 365(40), 347 (100)	90 %
22	408 M ⁺ (18), 410 M ⁺ + 2(18), 365(40), 347(100)	70 %

Obtención de los ésteres 23 a-c

La metodología experimental desarrollada para la síntesis de los ésteres antes mencionados, es idéntica al método descrito en las páginas 16 y 27, utilizando como materia prima al compuesto **22**. Los rendimientos de cada éster, así como sus características físicas y espectroscópicas se localizan en las Tablas No. 18-19 y 22-23.

**Tabla No. 22 Datos de IR, UV y Punto de Fusión
de los compuestos 23 a-c**

	IR cm ⁻¹	UV	P f °C
23a	2949, 1733, 1715, 1692, 1260	241	196-198
23b	2947, 1736, 1715, 1672, 1250	254	225-228
23c	2948, 1730, 1709, 1656, 1254	252	188-190

**Tabla No. 23 Espectrometría de Masas y rendimientos
de los compuestos 23 a-c**

	Espectrometría de Masas	Rendimientos
23a	526 M ⁺ (2), 528 M ⁺ + 2(2), 119(100)	52 %
23b	511 M ⁺ (3), 513 M ⁺ + 2(3), 105(100)	50 %
23c	530 M ⁺ (1), 532 M ⁺ + 2(1), 123(100)	45 %

Determinación de la inhibición de la conversión de Testosterona a 5 α -dihidrotestosterona en fracción membranal de próstata a pH=7, por los compuestos 23 a-c.

El procedimiento experimental realizado en la evaluación de los compuestos 23 a-c, es el mismo que se utilizó para la evaluación de los compuestos 6 a-f, explicado en las páginas 57-58.

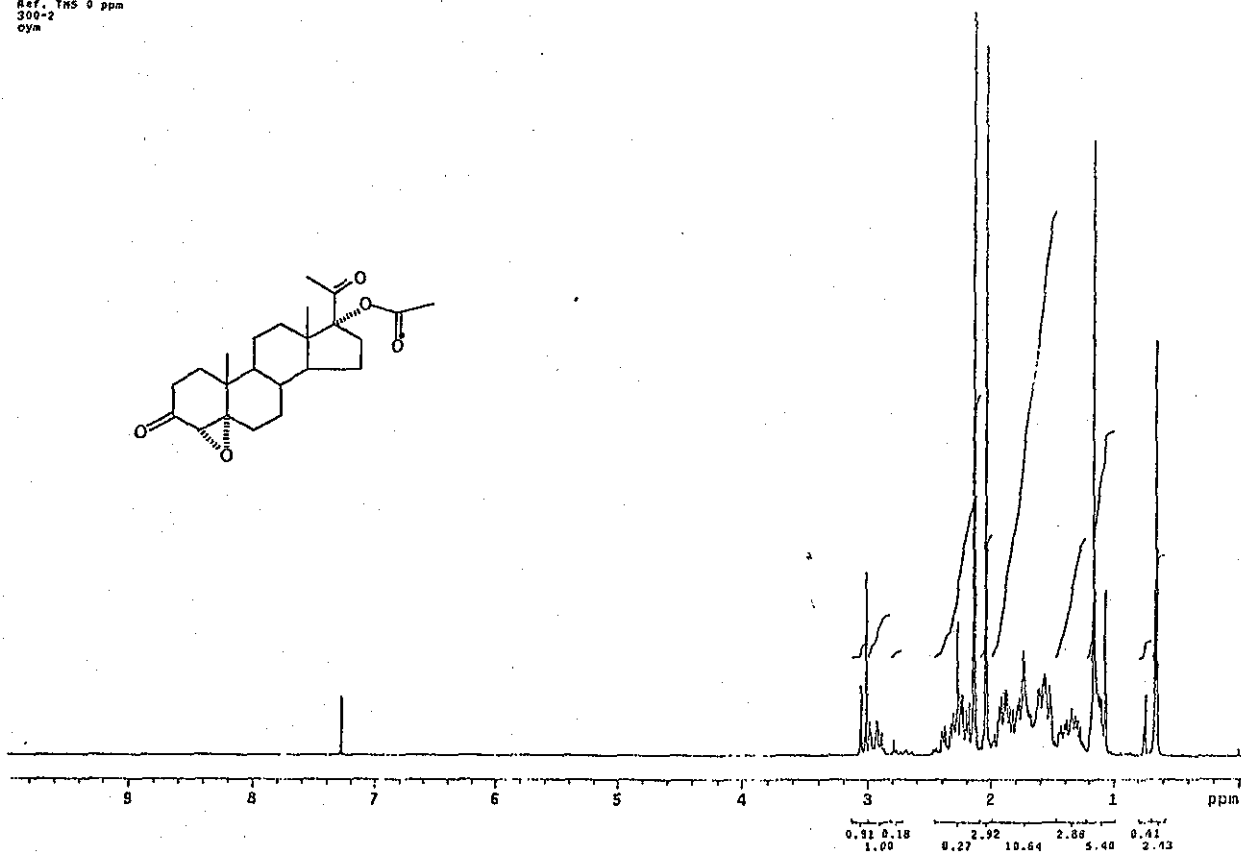
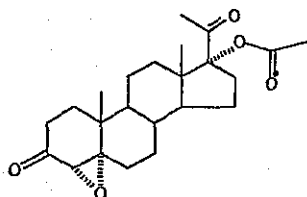
Determinación del patrón de inhibición de la enzima 5α -reductasa localizada en cultivos de *P. crustosum* y de la V_{max} y K_{max} para los compuestos finasterida y **23c**.

El patrón de inhibición de finasterida y de **23c** fue determinado en cultivos de *P. crustosum* incubados durante 5 días por triplicado en presencia de testosterona tritiada (actividad específica 85-100 Ci 7 mmol) y de diferentes concentraciones de testosterona no marcada (9-288 nM en 20 μ l de etanol) y 60 μ M de finasteride o con tres diferentes concentraciones de **23c** (20, 40 y 60 μ M) diluidos en 10 μ l de etanol. La reacción inició por la adición de 0.5 mM de NADPH a pH = 6 en un volumen final de 1 ml y las mezclas fueron incubadas en un baño de agua a 25°C.

Las reacciones terminaron por la adición de 1 mL de diclorometano y los esteroides fueron extraídos (3 X 1 ml) con diclorometano. La fase orgánica fue separada, evaporada hasta sequedad y redisolta en 500 μ l de metanol. El esteroide aislado fue purificado junto con testosterona y dihidrotestosterona por cromatografía en capa fina utilizando un sistema de elución cloroformo: acetona 9:1.

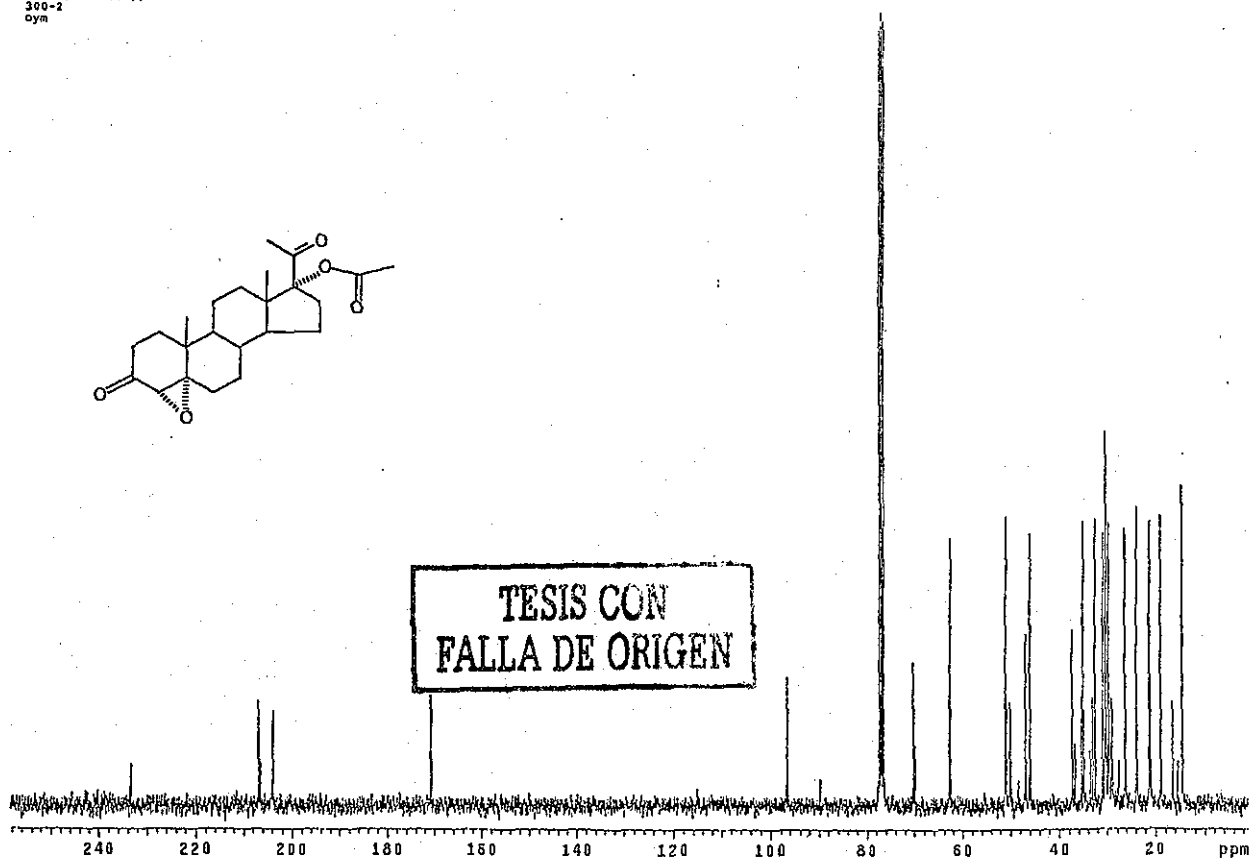
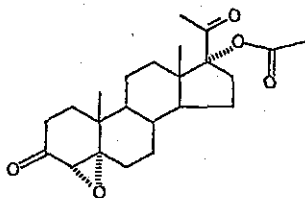
Los esteroides fueron detectados usando ácido fosfomolibdico y una lámpara de U.V. (254 nm). La zona correspondiente a DHT (R_f 0.49) fue cortada a partir de la placa y la fracción fue colocada en un vial. La radioactividad fue detectada en espectrometro tri-carb 2100TR de cintilación líquida. La eficiencia en la determinación de la testosterona tritiada fue del 68%. La pérdida de radiactividad durante el procedimiento fue calculada de acuerdo con los resultados obtenidos a partir del control sin los hongos. La formación de DHT fue calculada y expresada en fmol de DHT / mg de micelio / día.

USA1
3 octubre 2002
Dr. Eugene Srtsoeff / Eugenio Flores
EPOX / CDCl3
1H 299.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



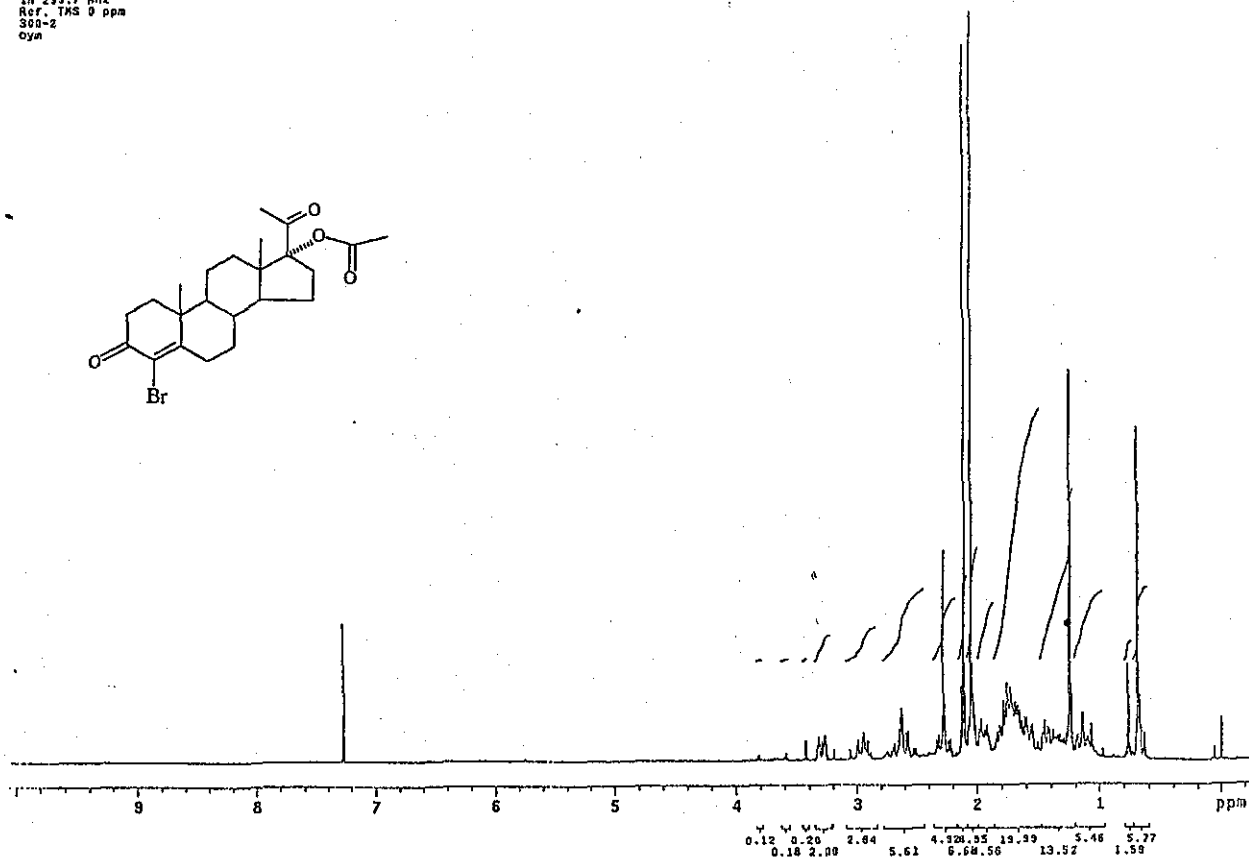
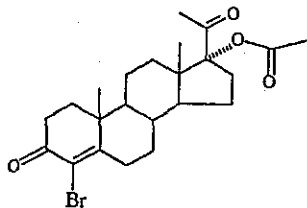
Espectro XXIA

USA1
3 octubre 2002
Dr. Eugene Srtsoeff / Eugenio Flores
EPOX / CDCl3
13C 75.5MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym



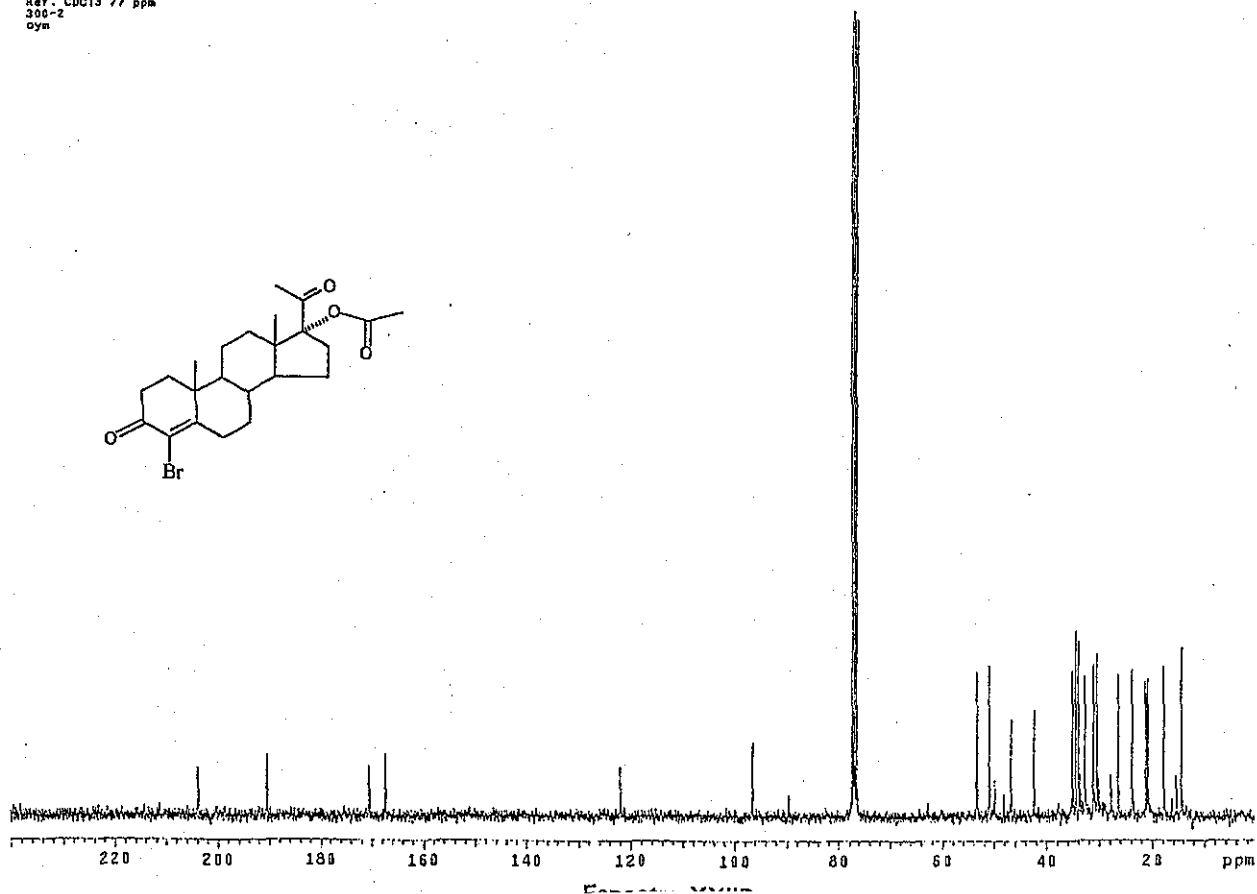
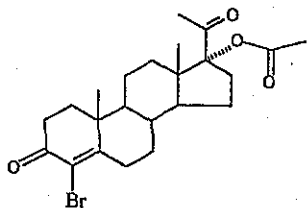
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USAI
4 octubre 2002
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
Br-AcetoXI / CDC13
1H 299.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym

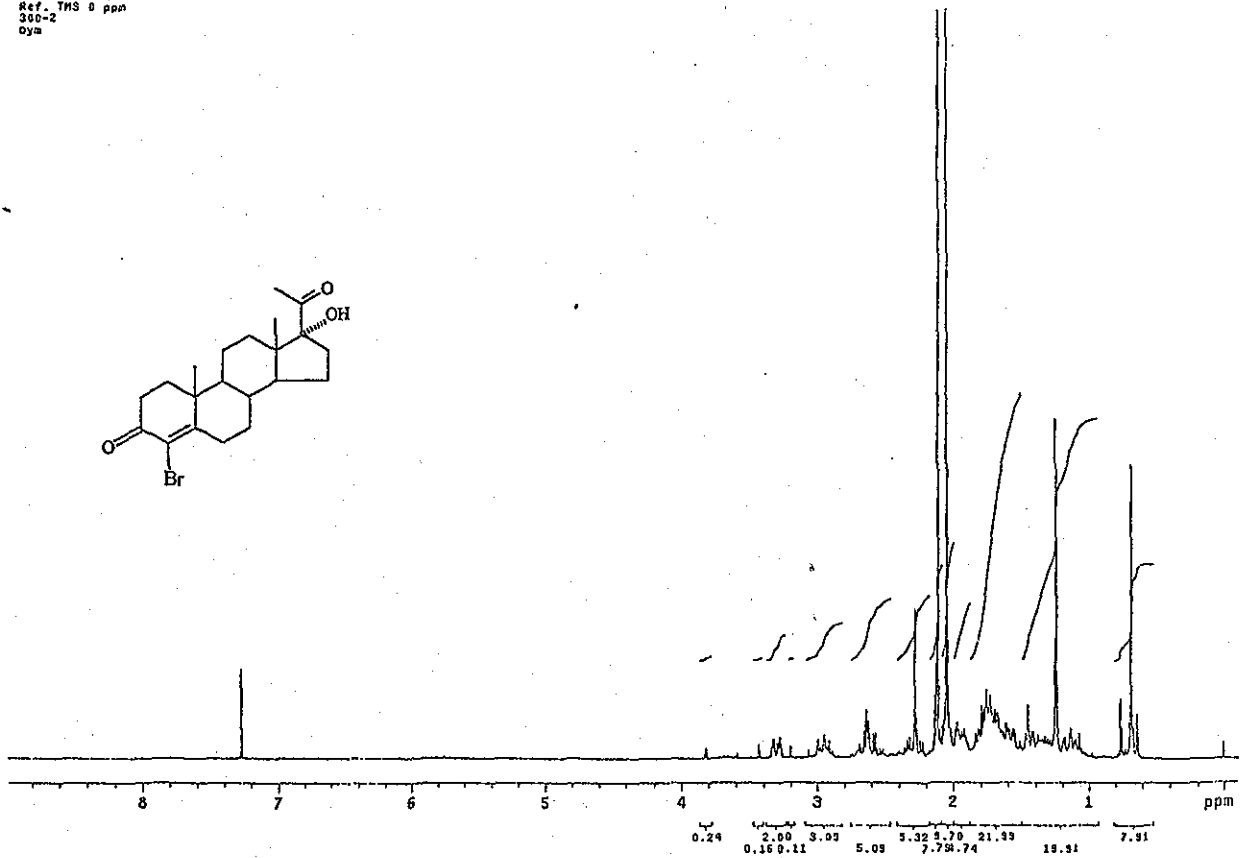
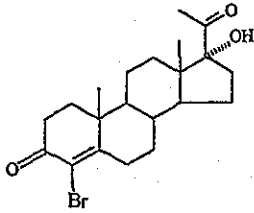


Espectro XXIIA

USAI
4 octubre 2002
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
Br-AcetoXI / CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym

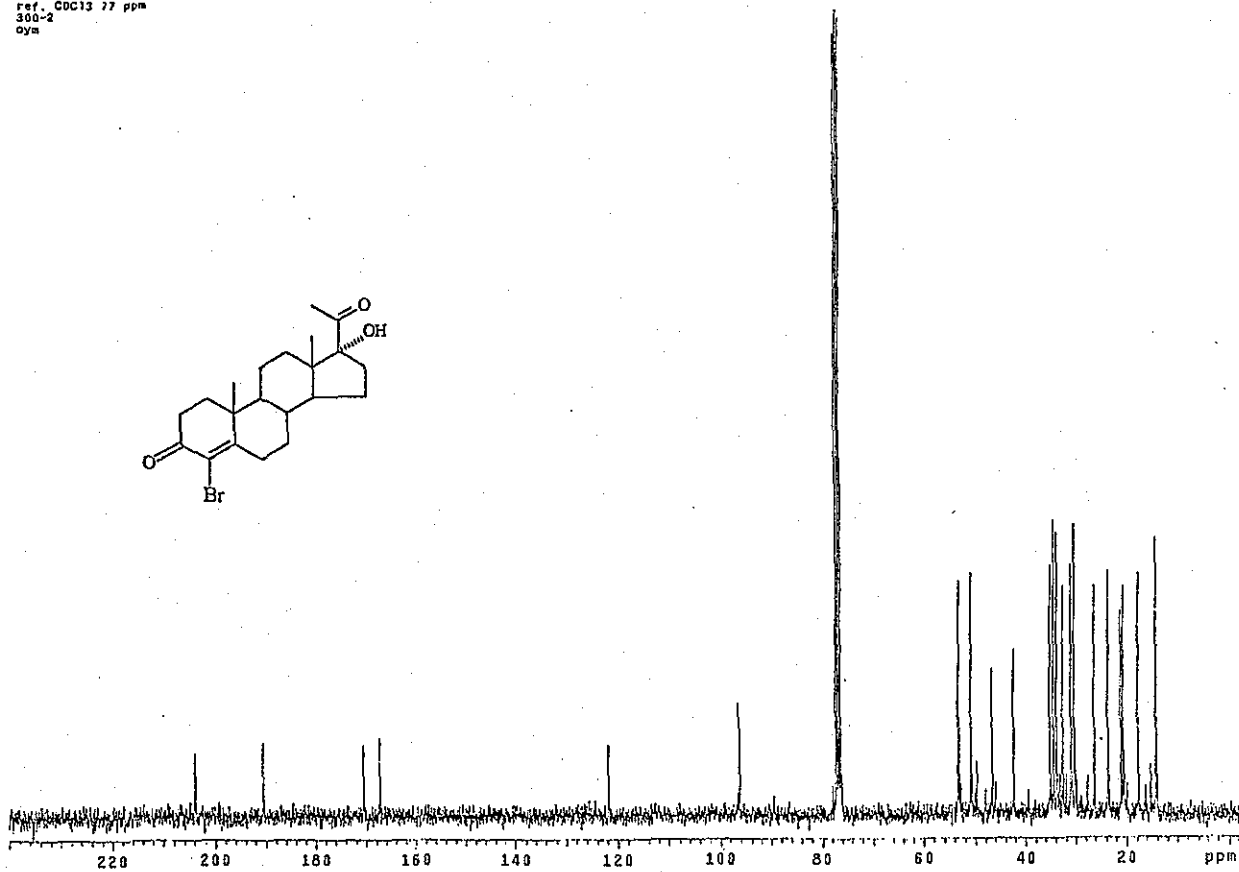
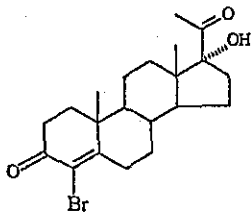


USA1
1 octubre 2002
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
Br-OH / CDCl₃
IH 299.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym

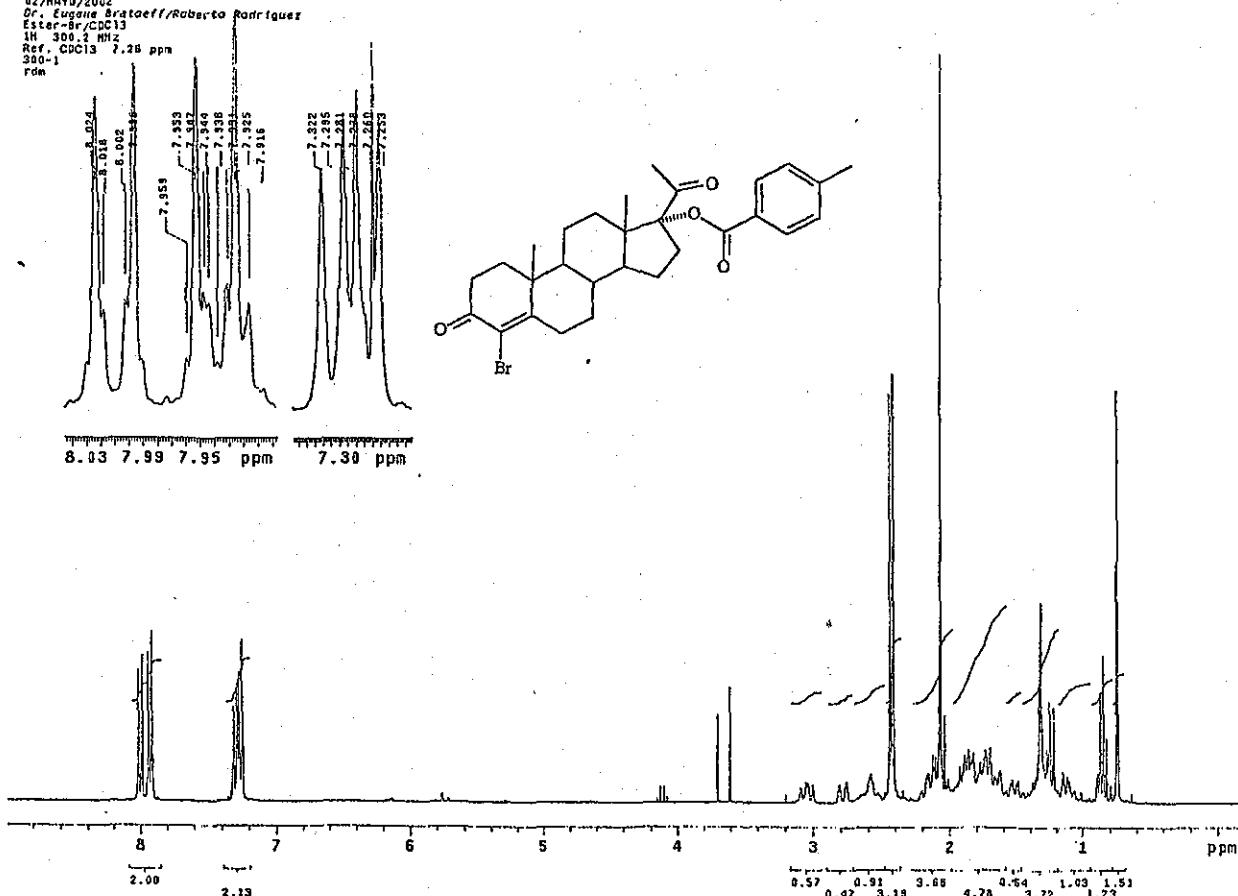


Espectro XXIII A

USA1
1 octubre 2002
Dr. Eugenio Bratoeff / Eugenio Flores
Br-OH / CDCl₃
13C 75.5 MHz
Ref. CDCl₃ 77 ppm
300-2
oym

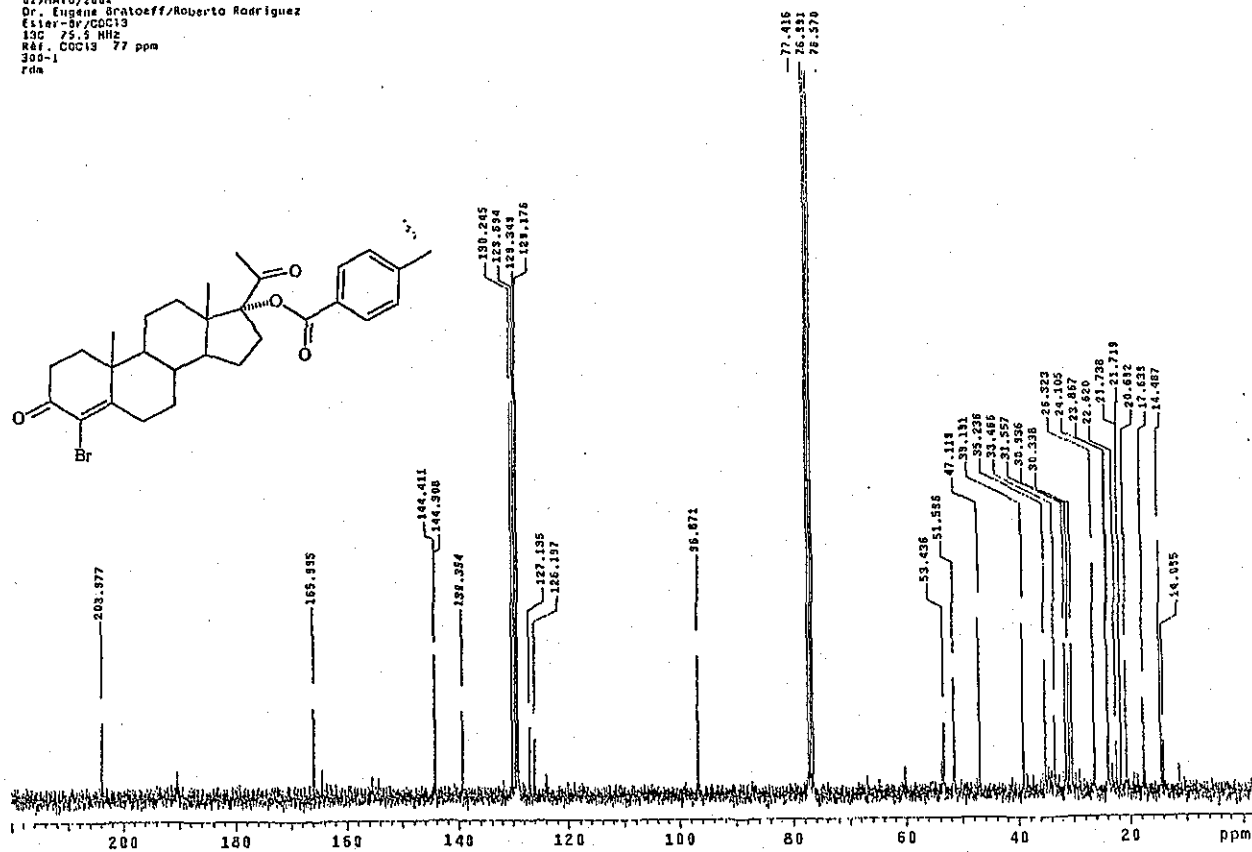


USA1
02/MAY/2002
Dr. Eugene Bratoeff/Roberto Rodriguez
Ester-Br/CDC13
1H 300.2 MHz
Ref. CDC13 7.28 ppm
300-1
rdm

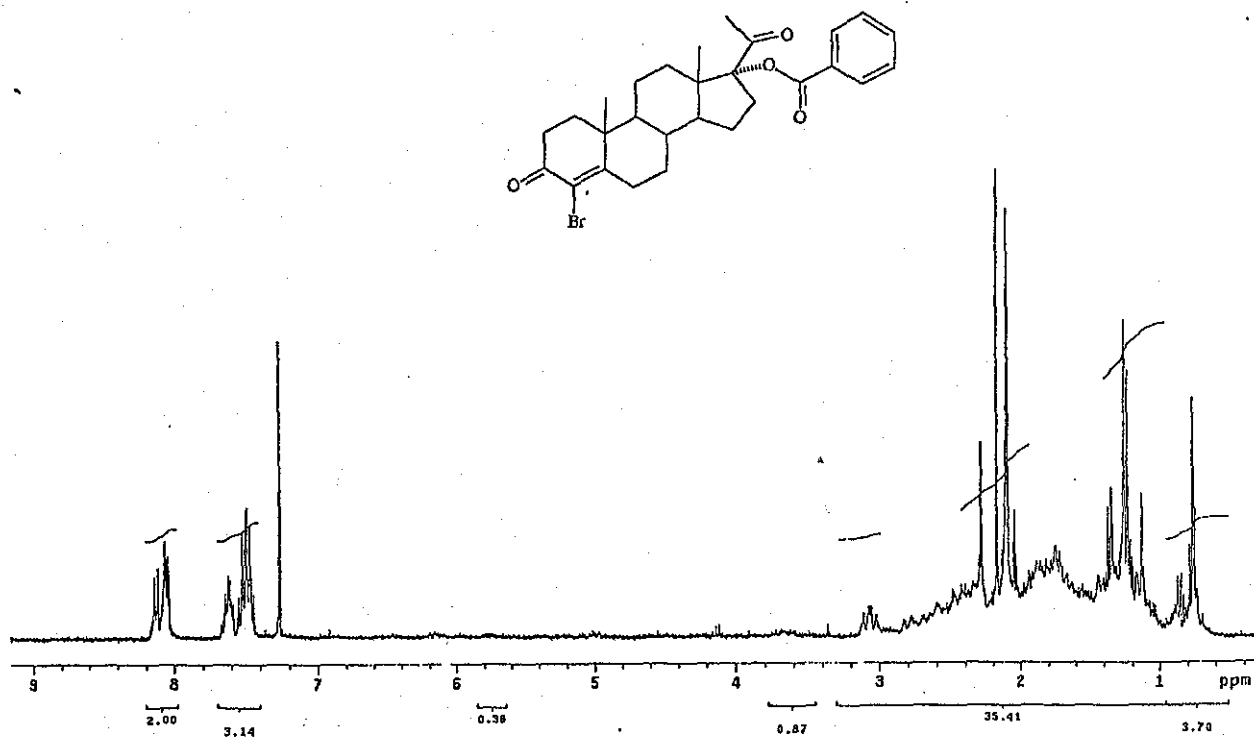


Espectro XXIVA

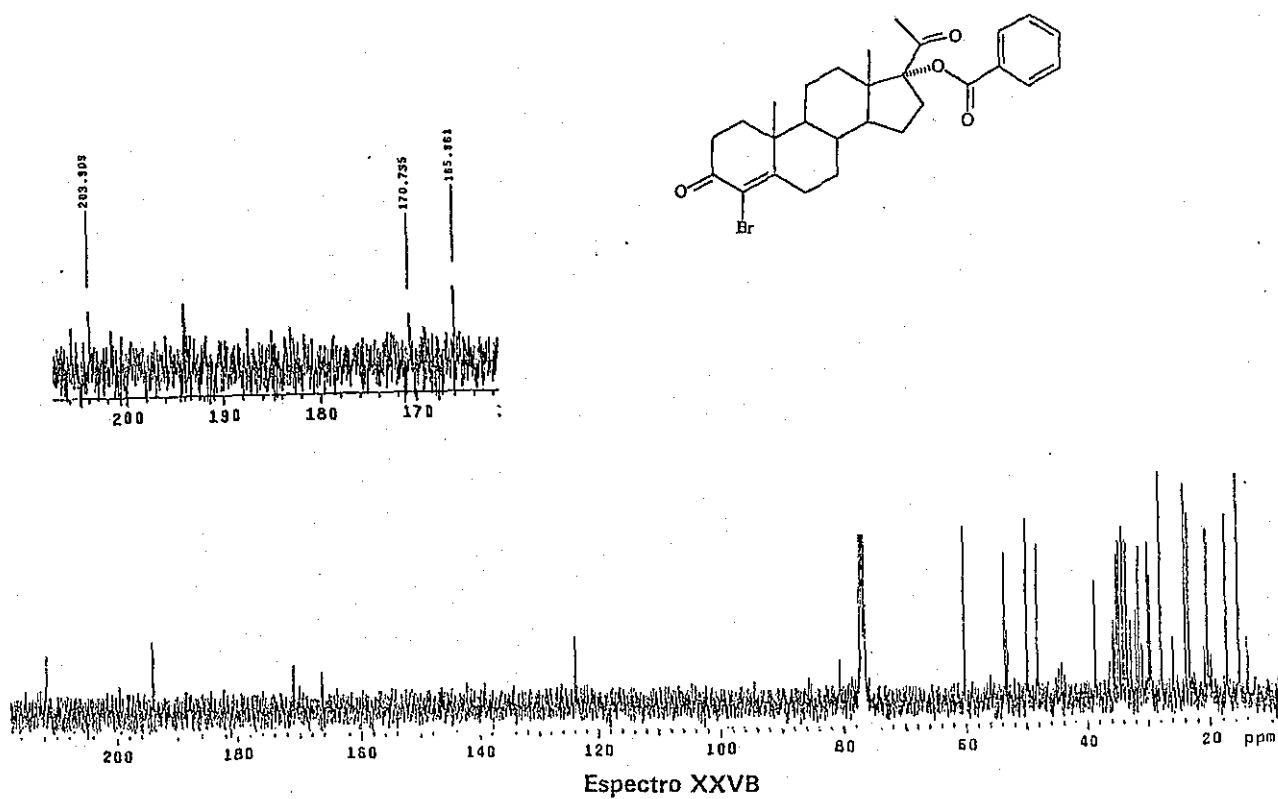
USA1
02/MAY/2002
Dr. Eugene Bratoeff/Roberto Rodriguez
Ester-Br/CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
rdm



Espectro XXIVB

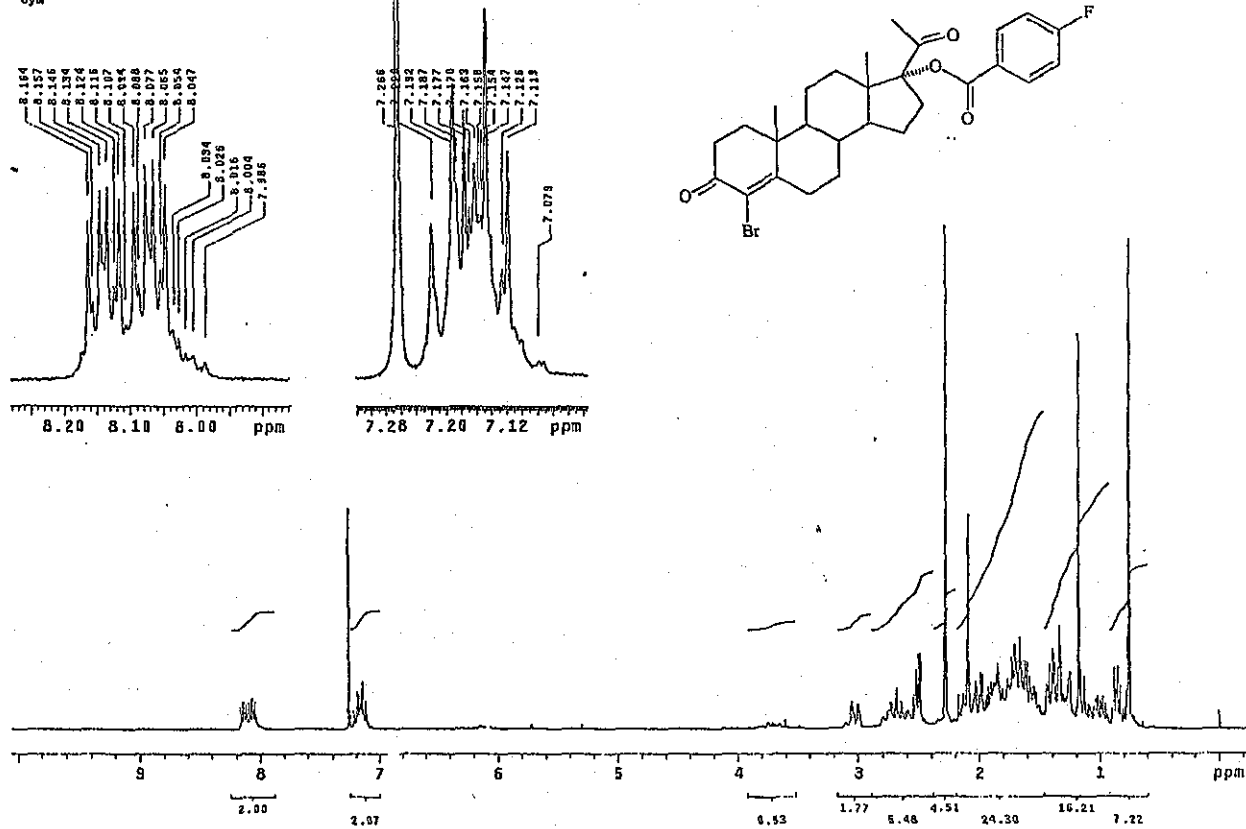


Espectro XXVA



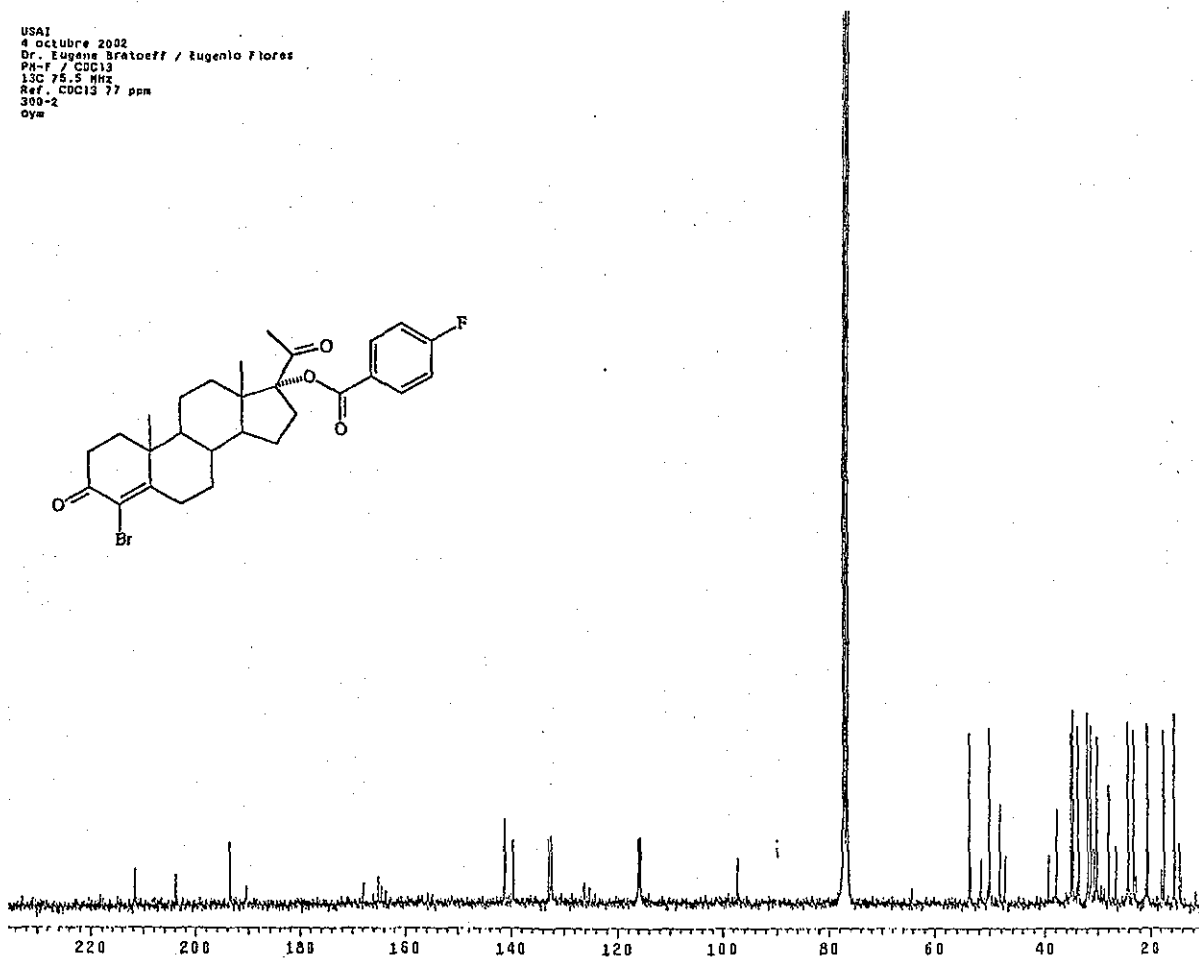
Espectro XXVB

USA1
4 octubre 2002
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
PM-F / CDCl3
1K 293.7 MHz
Ref. TMS 0 ppm
300-2
oym



Espectro XXVIA

USA1
4 octubre 2002
Dr. Eugene Bratoeff / Eugenio Flores
PM-F / CDCl3
13C 75.5 MHz
Ref. CDCl3 77 ppm
300-2
oym



Conclusiones Generales

Primera parte.

Se sintetizaron 5 compuestos de tipo diendiona **14 a-e**, de los cuales 4 son nuevos **14 b-e** y 5 de tipo triendiona **5 a-e** todos ellos son nuevos. Se realizó la evaluación farmacológica metabólica *in vitro* con las vesículas seminales de hamsters castrados y se observó que las triendionas son más activas que las diendionas.

Lo anterior verifica la hipótesis planteada, pues las triendionas tienen mayor coplanaridad que las diendionas y reaccionan preferentemente con el NADPH de la enzima 5 α -reductasa. Las triendionas **5 a, b y d** disminuyen con mayor efectividad la velocidad de formación de DHT que finasterida, esto significa que son inhibidores más potentes que finasterida siendo el compuesto **5b** el mejor de ellos.

Este trabajo fue aceptado para su publicación y la cita bibliográfica es: Flores E, Bratoeff E, Cabeza M, Ramírez E, Quiroz A and Heuze I. Steroid 5- α -reductase Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. (2003)

Segunda parte

Se sintetizaron 7 esteroides nuevos **19 y 6 a-f** y fueron evaluados en fracciones membranales de próstata de hamster, resultando el compuesto **19** el más efectivo en la inhibición de la enzima, incluso su C.I.₅₀ es muy cercana al valor que posee finasterida.

Por otra parte los compuestos **6d y 6f** (ésteres aromáticos) son más efectivos en la inhibición de la enzima en comparación a los compuestos **6a y 6e** y mucho

más que **6b** y **6c** (todos son ésteres alifáticos), esta parte de la investigación, será enviada para su publicación en un futuro cercano.

Tercera parte

En esta parte del trabajo, se sintetizaron y evaluaron biológicamente los compuestos **23 a-c** en dos modelos diferentes; en uno de ellos **23c** inhibe en mayor proporción a la enzima presente en cultivos de *Penicillium crustosum* en comparación a finasterida, sin embargo el mismo compuesto en el modelo de fracciones membranales de próstata de hamsters es el que presenta la menor inhibición de la enzima, porque su valor de C.I.₅₀ está muy lejano del valor correspondiente de finasterida.

Esta parte del trabajo fue enviada para su publicación a *Steroids* y se anexa la carta de aceptación.

Por otra parte, comparando los valores de C.I.₅₀ de los compuestos **19**, **6 a-f** y **23 a-c**, se concluye que los compuestos 6-metilen (**19** y **6 a-f**) son mejores inhibidores de la enzima que los compuestos **23 a-c** (siendo **19** el mejor de todos ellos). Es decir, con los datos disponibles hasta la fecha y que están incluidos en esta tesis, se concluye que la hipótesis de Petrow es válida, siendo necesario evaluar en esta modalidad a los compuestos **14 a-e** y **5 a-e** para confirmarla.

BIBLIOGRAFIA

1. Tortora G, Anagnostakos N. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Harla. Tercera Edición. México D.F. (1984).
2. Cesorsimo R, Carr D. Therapy Update *Am. J. Health-Syst. Pharm* 53 381 (1996).
3. Seidman H, Mushinski MH, Gelbs K, Silverberg E. Probabilities of eventually developing or dying of cancer. *CA Cancer J. Clin.* 35 35-36 (1985).
4. Carter HB, Coffey DS. The prostate: an increasing medical problem. *The prostate* 16 39-48 (1990).
5. Thiessen E. Concerning a familial association between breast cancer and both prostatic and uterine malignancies. *Cancer* 34 1102-7 (1974).
6. Waterhouse J, Muir C, Shanmugaratnam K. Cancer incidence in five continents. Cancer incidence. Lyon France: *International Agency for research in Cancer. Publication* 42 6 (1982).
7. Fincham SM, Hill GB, Hanson J, Waayasinghe C. Epidemiology of prostatic cancer: a case control study. *Prostate* 17 189-206 (1990).
8. Honda GD, Bernstein L, Ross RK, Greenland S, Gerkins V, Henderson BE. Vasectomy, cigarette smoking and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle aged. *Br. J. Cancer.* 57 326-31 (1988).
9. Snowdon DA, Phillips RL, Choi W. Diet obesity and risk of fatal prostate cancer. *Am. J. Epidemiol.* 120 244-250 (1984).
10. Mishina T, Watanabe H, Araki H, Nakao M. Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis. *Prostate* 6 423-6 (1985).
11. Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J. Exp. Med.* 42 753-7 (1925).
12. Boyd AS. An overview of the retinoids. *Am. J. Med.* 86 568-574 (1989).
13. Hirayama T. Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 53 149-55 (1979).

14. Mettlin C, Selenskas S, Natarajan N, Huben R. β -Carotene and animal fats and their relationships to prostate cancer risk. A case control study. *Cancer* 64 605-12 (1989).
15. Ross RK, Bernstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson B. Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *J. Natl. Cancer. Inst.* 76 45-8 (1986).
16. Ross JK, Pusateri DJ, Schultz TD. Dietary and hormonal of men at different risks for prostate cancer: fiber intake, excretion and composition with *in vitro* evidence for an association between steroid hormones and specific fiber components. *Am. J. Clin. Nutr.* 51 365-70 (1990).
17. Wynder EL, Mabuch K, Whitmore W. Epidemiology of the prostate cancer. *Cancer* 28 344-60 (1971).
18. Oesterling JE, Martin SK, Bergstralh EJ, Lowe FC. The use of prostatic specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. *J. Am. Med. Assoc.* 269 57-60 (1993).
19. Hanks GE, Scardino PT. Does screening for prostate cancer make sense ?. *Scientific American* 275 80-1 (1996).
20. Jepsen J and Bruskewitz R. Surgical and nonsurgical invasive treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drugs of today* 34 353 (1998).
21. McConell JD. Androgen ablation and blockade in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. N. Amer.* 17 661-70 (1990).
22. Machetti F. and Guarna A. Novel inhibitors of 5α -reductase. *Expert. Opin. Ther. Patents.* 12 201-215 (2002).
23. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5α -reductase: two genes / two enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 63 25-61 (1994).
24. Kenny B, Ballard S, Blagg J and Fox D. Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Med. Chem.* 40 1293-1315 (1997).
25. Neumann F. The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Clin. Exp. Endocrinol.* 102 1-32 (1994).

26. Wilde MI, Goa KL. Finasteride: an update of its use in the management of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Drugs* 57 557-81 (1999).
27. Li X, Singh SM, Coté J, Laplante S, Veilleux R and Labrie F. Synthesis and in vitro evaluation of 4-substituted N-(1,1-dimethylethyl)-3-oxo-4-androstene-17 β carboxamides as 5 α -reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.* 38 1456 (1995).
28. Brueggemeier R. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Ed. John Wiley Inc. 5th Ed. Capítulo 42 (1996).
29. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Murillo E, Ramírez E and Lira A. New progesterone esters as 5 α -reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 49 1081-1084 (2001).
30. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramírez E and Martínez R. Evaluation of new pregnane derivatives as 5 α -reductase inhibitors *Chem. Pharm. Bull.* 49 525-530 (2001).
31. Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Solórzano K, Murillo E, Quiróz A, Cabeza M. Antiandrogenic effect of 16-substituted, non-substituted and D-homopregnane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 48 1249-55 (2000).
32. Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, Murillo E, Ramírez E and Flores G. Synthesis and pharmacological evaluation of 4-halo progesterone derivatives as antiandrogens. *Chem. Pharm. Bull.* 47 1232-1236 (1999).
33. Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, and Ramírez E. Androgenic and antiandrogenic effects of progesterone derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position. *Steroids* 64 413-421 (1999).
34. Bratoeff E, Rubio M, Ramírez E, Flores G, García J, Ramírez G. Pharmacological and theoretical evaluation of new antiandrogens. *Chemistry Today* 16 33-35 (1998).
35. Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Valencia N. The pharmacology of the antiandrogens. *Chimica Oggi* 15 67-9 (1997).

36. Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Calderón D, Hernández E. Síntesis de nuevos inhibidores de 5α -reductasa. *Rev. Mex. Cien. Farm.* 28 13-9 (1997).
37. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. Crystal structure of 17α -acetoxy-6-chloro- 16β -methyl-4,6-pregnadien-3,20-dione. *Analytical Sciences* 14 459-61 (1998).
38. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. 17α -acetoxy- 17β -methyl- 16β -phenyl-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-dione: Synthesis and crystal structure determination of a new rearranged pregnane derivatives. *J. Chem. Crystallography.* 28 487-91 (1998).
39. Cabeza M, Gutiérrez E, Miranda R, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G. Synthesis and pharmacological effect of 6-halo- 16β -methyl-pregnane derivatives. *Proc. West. Pharmacological Soc.* 41 87-8 (1998).
40. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E. 17α -acetoxy-6-bromo- 16β -methyl-4,6-pregnadien-3,20-dione. *Acta Crystallographica* 2022-24 (1998).
41. Cabeza M, Quiroz A, Heuze I, Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Murillo E. Antiandrogenic effect of new synthetic steroids. *Proc. West. Pharmacological Soc.* 43 1-2 (2000).
42. Soriano M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre G. Crystal structure and synthesis of 17α -(5-bromo-valeroyloxy)- 16β -methyl-pregna-4, 6-diene-3,20-dione. *Analytical Sciences* 17 911-2 (2001).
43. Soriano M, Ramírez E, Bratoeff E, Cabeza M, Aguirre G. Crystal structure and synthesis of 17α -hexanoyloxy)- 16β -methyl-pregna-4,6-diene-3,20-dione. *Analytical Sciences* 17 1245-6 (2001).
44. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramírez E, Martínez R, Murillo E. Inhibition of sodium acetate incorporation into lipids by novel steroids in hamsters flank organs. *Proc. West. Pharmacological Soc.* 44 99-101 (2001).
45. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramírez E, Martínez R, Murillo E. Inhibition of the conversion of the testosterone to dihydrotestosterone by novel steroids in

cultures of *Penicillium crustosum*. *Proc. West. Pharmacological Soc.* 44 103-5 (2001).

46. Ramírez E, Cabeza M, Heuze I, Gutiérrez E, Bratoeff E, Membrillo A, Lira A. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50 15-20 (2002).

47. Ramírez López Elena Guadalupe. Síntesis de 6-halo-16 β -metil-17 α -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM (1998).

48. Flores Rodríguez Gregoria. Síntesis de 6-bromo-16 β -metil-17 α -propioniloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona. Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM (1999)

49. Trost BM. *Comprehensive Organic Synthesis* 6 323-379 Pergamon Press (1991).

50. Iwasaki Otake D. Síntesis de 17 α -benzoiloxi-16 β -metil-pregna-4,6-dien-3,20-diona como un antiandrógeno esteroidal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM (2000).

51. Soriano M, Hernández S, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G. Crystal structure of 17 α -benzoyloxy-16 β -metil-pregnadiene-3,20-dione. *Analytical Sciences* 15 1-3 (1999).

52. Djerassi C. *Steroid Reactions An outline for Organic Chemists*. Holden-Day Inc. (1963).

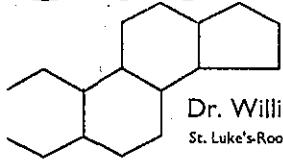
53. Membrillo Rosete Marisol. Síntesis de 17 α -butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM (1999).

54. Bratoeff E, Ramírez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 6 1107-1123 (1999).

55. Petrow V, Wang Y and Lack L. 6-Methylene-4-pregnen-3-ones as irreversible inhibitors of rat prostatic 5 α -reductase. *Steroids* 38 121 (1981).

56. Burn D, Cooley G, Davies MT, Ducker B, Ellis B, Feather P, Hiscok AK, Kirk DN, Leftwick AP, Petrow V, and Williamson DM. Steroidal 6-formyl-alkoxy-3,5-dienes and some of their transformations. *Tetrahedron* 20 597-609 (1964).
57. King Ligon King S. Síntesis de derivados de progesterona con actividad antiandrogénica potencial. Tesis de Maestría, Facultad de Química UNAM (1978)
58. Henbest HB and Jacson WR. Directive effects of remote substituents on the alkaline epoxidation of 3-oxo-4-en steroids. *J. Chem. Soc. C* 2459 (1967)
59. Mancera O and Ringold HJ. The synthesis of halogenated steroid hormones, 4-chloro-19-nor hormone analogs. *Can. J. Chem.* 37 1785 (1959)
60. Ringold HJ, Batres E, Mancera O, Rosenkrans G. Synthesis of 4-halo hormone analogs. *J. Org. Chem.*- 21 1432 (1956).

Steroids



editors-in-chief

Dr. William Rosner & Dr. Richard B. Hochberg
St. Luke's-Roosevelt Hospital Yale University

editors

Dr. John A. Cidlowski
Natl Institute Environmental Health Sciences

Dr. John A. Katzenellenbogen
University of Illinois Urbana-Champaign

Dr. Cedric H.L. Shackleton
Children's Hospital Oakland

Dr. Jerome F. Strauss III
University of Pennsylvania

editorial office

Steroids
Orentreich Foundation for the
Advancement of Science, Inc.
855 Route 301
Cold Spring, NY 10516 USA

phone (845) 265-2621

fax (845) 265-3706

e-mail steroidsoffice@juno.com

managing editor Angela Tremain

October 7, 2002

Dr. Marisa Cabeza Salinas
Biological Systems Dept
Metropolitan University - Xochimilco
Calzada del Hueso #1100
04890 Mexico, D.F.
Mexico
525 724 5237

Dear Dr. Cabeza:

Re: MS 54038 [Effect of a novel steroid (PM9) on the inhibition of 5α -reductase present in *Penicillium crustosum* broths, Flores Eugenio, Cabeza Salinas Marisa, Quiroz Alexandra, Bratoeff Eugene, Garcia Genoveva, Ramirez Elena.]

We are pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication in *Steroids*.

You will receive galley proofs and a Copyright Transfer form directly from the publisher within two to three months.

Sincerely,

William Rosner, MD

Richard B. Hochberg, PhD

Effect of a novel steroid (PM9) on the inhibition of 5α -reductase present in *Penicillium crustosum* broths.

Eugenio Flores^b Marisa Cabeza^a, Alexandra Quiroz^a, Eugene Bratoeff^b, Genoveva García^c and Elena Ramírez^b

Department of Biological Systems, Metropolitan University-Xôchimilco^a, Mexico D. F., Mexico, Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry^b and Biology Institute^c of National University of México, Mexico D. F.

Running Title: 5α -reductase inhibition in *P. crustosum* broths.

Address correspondence to:

MARISA CABEZA Ph.D.
BIOLOGICAL SYSTEM DEPARTMENT
METROPOLITAN UNIVERSITY-X
CALZADA DEL HUESO No. 1100
04960 MEXICO D.F., MEXICO
PHONE(52-55) 5483-72-60
FAX (52-55) 5483-72-37
e-mail: marisa@cueyatl.uam.mx

Abstract

The conversion of testosterone (T) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) has been demonstrated in *P. crustosum* broth obtained from fermented pistachios, lemons and corn tortillas. Furthermore, the presence of 5 α -reductase enzyme, which is responsible for this conversion, has been established by electrophoretical techniques in these cultures.

5 α -Reductase enzyme is also present in animal and human androgen dependent tissues as well as in prostate and seminal vesicles. The increase of the conversion of T to DHT in prostate gland, has been related to some illnesses such as benign prostate hyperplasia and prostate cancer. Furthermore, treatment with 5 α -reductase inhibitors as finasteride reduces the prostate growth. These data have stimulated research for the synthesis of new molecules with antiandrogenic activity, whose biological effect needs to be demonstrated.

The purpose of this study is to determine the inhibition pattern of 5 α -reductase in *P. crustosum* by finasteride and the new steroidal compound PM-9. K_m and V_{max} values for T, were determined in the broths by Lineweaver-Burk plots using different testosterone concentrations. The K_m value was 0.22 μ M and V_{max} 0.833 pmol of DHT/mg of mycelium/day. The inhibition pattern of finasteride and PM-9 was also determined by Lineweaver-Burk using different concentrations of T and inhibitors. Results show that finasteride and PM-9 inhibit 5 α -reductase present in the broth in a competitive manner.

Keywords: 5 α -Reductase, PM9, *Penicillium crustosum*, antiandrogens.

1. Introduction

Androgens, particularly 5 α -dihydrotestosterone (DHT), are required to maintain the size and function of the prostate in men and are thought to play a major role in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia [1, 2] and prostate cancer [3]. 5 α -Reductase enzyme, which catalyzes the irreversible conversion of testosterone 1 (T) to dihydrotestosterone 2 (DHT), Figure 1, is potentially the dominating enzyme of the whole intraprostatic androgen metabolism [4, 5]. There is a well-documented finding that higher concentration of DHT is present in the prostate than in the corresponding plasma or skeletal muscle [6, 7]. These observations have led to the development of human 5 α -reductase inhibitors as potential therapeutic agents for benign prostatic hyperplasia and cancer.

5 α -Reductase, is also present in *Penicillium crustosum* broths; its presence has been demonstrated by the conversion of T to DHT and this fact has been established by electrophoretical techniques in these broths [8, 9]. This model has been used by our group as a screening assay for determination of 5 α -reductase inhibitory effect [10].

Recently several new inhibitors of 5 α -reductase have been described as potential clinical candidates for the treatment of benign prostatic hyperplasia and cancer [11-12]. Finasteride 3 is the first 5 α -reductase inhibitor approved in the USA for the treatment of this illness. This drug has a greater affinity for 5 α -reductase type 2 than for type 1 enzyme, both present in human prostate [13].

In view of the fact that several fluoro and nitrogen containing pregnane derivatives have shown high antiandrogenic activity [14], the purpose of this study is to determine the inhibition pattern of 5 α -reductase enzyme by finasteride and PM-9 using *P. crustosum* broth that avoids the sacrifice of many animals.

2. Experimental

2.1 Materials and methods

Chemical and Radioactive Material: Solvents were laboratory grade or better. Melting points were determined on a Fisher Johns melting point apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C were taken on Varian Gemini 200 and VRX-300 respectively. Chemical shifts are given in ppm relative to that of Me_4Si ($\delta=0$) in CDCl_3 . The abbreviations of signal patterns are as follows: s, singlet, d, doublet; t, triplet; m, multiplet. Mass spectra were obtained with a HP5985-B spectrometer. I.R. were recorded on a Perkin-Elmer 200s spectrometer.

(1,2,6,7- ^3T) Testosterone [^3T], specific activity: 95 Ci / mmol, was provided by New England Nuclear Corp. (Boston MA, U.S.A.). Radioniert T and $5\alpha\text{DHT}$ were supplied by Steraloids (Wilton, NH, U.S.A.). D(α)-Glucose, was purchased from Merck (Mexico). Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.) supplied NADH^+ and the finasteride was obtained by extraction from Proscar (Merck, Sharp & Dohme).

2.2 Synthesis of the steroidal compounds

17- α Acetoxy-4, 5-epoxypregnan-3, 20-dione (5). To a solution of 4 (1g, 2.57 mmol) in methanol (30 ml) was added 0.7 ml, 10% (1.75 mmol) of sodium hydroxide and 1.4 ml, 30 %, 14.6 mmol of hydrogen peroxide. The mixture was stirred for 24 h at room temperature. The methanol was evaporated in vacuum. Upon cooling the desired compound 5 precipitated as colorless crystals, 0.99g, 2.55 mol (99%). Mp 192-194°C. I.R. (KBr): 1712, 1722, 1730 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.65 (3H, s), 1.16 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.14

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(3H, s), 3.01 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$, δ : 14.4 (C-18), 16.4 (C-19), 18.9 (C-19), 170.7 ($\text{CH}_3\text{-COO}$), 203.9 (C-20). MS (m/z): 388 (M^+).

17- α -Acetoxy-4-bromo-4-pregnene-3, 20-dione (6) To a solution of **5** (1g, 2.6 mmol) in methanol (30 ml) was added concentrated hydrobromic acid (15 ml). The mixture was stirred for 12h at room temperature, water (100 ml) was added and upon cooling the desired crude compounds **6** precipitated 0.98g. The crude product was recrystallized from methanol to give 0.70g, 1.5 mmol (60 %) of the pure compound **6**. mp 195-196°C. UV: 260 nm ($\log \epsilon$, 4.12). IR (KBr): 1671, 1710, 1736 and 614 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.68 (3H, s), 1.24 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.11 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$, δ : 14.3 (C-18), 17.8 (C-19), 21.2 (C-21), 170.0 ($\text{CH}_3\text{-COO}$), 203.0 (C-20), 123.9 ($\text{C}=\text{C-Br}$), 190.0 (C-3). MS (m/z): 450 (M^+).

17- α -Hydroxy-4-bromo-4-pregnene-3, 20-dione (7) To a solution of **6** (1g, 2.6 mmol) in methanol (100 ml) was added a 2% solution of sodium hydroxide (25ml) and the mixture was allowed reflux for 30 min. The methanol was evaporated in vacuum and to the aqueous phase it was added water (20 ml). The mixture was extracted 3 times with chloroform and the combined organic phases were washed repeatedly with water until a pH of 7. The chloroform solution was dried with sodium sulfate and the organic solvent was evaporated in vacuum. The crude product was purified by column chromatograph (hexane:AcOEt=6:4) and recrystallized from methanol to give 0.71g, 1.74 mmol (66%) of the compound **7**. mp 204-206°C. UV: 259 nm ($\log \epsilon$, 4.10). IR (KBr): 1657, 1709, 3400 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.74 (3H, s), 1.17 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.57 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$, δ :

15.4 (C-18), 17.5 (C-19), 20.44 (C-21), 89.8 (C-17), 170.0 (CH₃-C=O), 211.6 (C-20), 123.9 (C=C-Br), 199.5 (C-3). MS (m/z): 408 (M⁺).

4-bromo-17 α -(*p*-fluorobenzoyloxy)-4-pregnene-3, 20-dione (PM-9). A solution of trifluoroacetic anhydride (5.18g; 0.024 mmol), *p*-fluorobenzoic acid (3.46g; 0.024 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (0.3g; 0.0017 mmol) was stirred under nitrogen for 3h at room temperature. Compound 7 (1.0g; 0.0024 mmol) dissolved in chloroform (5 ml) was added and the resulting solution was allowed to stir for 3h at room temperature. Water (5 ml) was added and the mixture was neutralized with an aqueous solution of sodium bicarbonate to a pH of 7. The reaction mixture was extracted with chloroform, the combined organic extracts were washed with water, dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent evaporated in vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography (hexane:AcOEt=7:3) eluted 0.58g; 0.001 mmol (44.57%) of the pure PM-9 compound. mp 188-190°C. UV: 253 nm (log ϵ , 4.12). IR (KBr): 1268, 1702, 1718 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.77 (3H, s), 1.24 (3H, s), 2.15 (3H, s), 7.2 (2H, m), 8.1 (2H, m). ¹³C-NMR, δ : 14.5 (C-18), 18.2 (C-19), 21.3 (C-21), 170.3 (CH₃-C=O), 203.4 (C-20), 128.5 (C=C-Br). MS (m/z): 531 (M⁺).

3. Measurement of 5 α -reductase activity.

5 α -Reductase activity was determined in cultures of *P. crustosum*, as described earlier [8, 9]. The broths were incubated for 5 days in triplicate with [³H]T (specific activity 85-100 Ci/mmol) plus different concentrations of unlabeled T (9-288nM in 20 μ l of ethanol). The reaction was started by adding 0.5mM of NADPH in a final volume of one ml

at pH 6, and the mixtures were incubated in a water bath at 25°C. As earlier indicated we demonstrated *Penicillium crustosum* growths in potato dextrose agar medium at 25°C. The optimum growth was observed at the fifth day of growth and no contamination was observed under the incubating conditions (8,10).

The inhibition pattern by finasteride or PM-9 was determined in cultures of *P. crustosum* [8, 9] incubated for 5 days in triplicate in the presence of [³H]T (specific activity 85-100 Ci/mmol) plus different concentrations of unlabeled T (9-288nM in 20µl of ethanol) and 60 µM of finasteride or three different concentrations of PM-9 (20, 40, 60 µM) diluted in 10µl of ethanol. The reaction was started by adding 0.5mM of NADPH at pH 6 in a final volume of one ml at pH 6, and the mixtures were incubated in a water bath at 25°C.

All reactions were stopped by adding one ml of dichloromethane, and the steroids were extracted (3X60 seconds) using one ml of dichloromethane. The organic phase was separated, evaporated to dryness and redissolved in 500 µl of methanol. The isolated steroid was purified with steroid carriers (T and DHT) by thin layer chromatographic system (chloroform:acetone=9:1). The steroid carriers were detected using phosphomolibdic acid reagent and an ultraviolet lamp (254 nm). The zone corresponding to DHT (Rf 0.49) was cut out from the plate and the fraction was placed into a counting vial. Radioactivity was detected in a tri-carb 2100TR liquid scintillation spectrometer using Ultima Gold (Packard, Downers Grove, IL, USA) as the counting vehicle. The counting efficiency of [³H] was 68%. The losses of radioactivity during the procedure were calculated in agreement with

the results obtained from the control experiment without the fungi. The formation of DHT was calculated and expressed in fmol of DHT/mg of mycelium/ day.

K_m and V_{max} values were derived from Lineweaver- Burk plots [15]; from both values, regression lines were computed by the method of least squares. The inhibition patterns as well as K_i values of finasteride and PM-9 were determined by Lineweaver-Burk plots.

4. Results

4.1 *K_m* and *V_{max}* values of 5 α -reductase in *P. crustosum* broths.

K_m and *V_{max}* values for 5 α -reductase were determined in *P. crustosum* broth from Lineweaver-Burk plots [15], Fig. 2, using different T concentrations (9-288nM). The mean value for *K_m* was 0.22 ± 0.07 μ M and that for *V_{max}* 0.83 ± 0.05 pmol of DHT/mg of mycelium/day.

3.2 Determination of *K_i* values and the inhibition pattern of 5 α -reductase by finasteride and PM-9.

In *P. crustosum* broth, the *K_i* values as well as the pattern of inhibition of 5 α -reductase by finasteride and PM-9 were determined from Lineweaver-Burk plots [15] using different testosterone concentrations (9-288nM). Since finasteride was used as a control, only one concentration was applied (60 μ M), the mean of *K_i* values for finasteride was 1.54 ± 0.25 μ M and *K_i* for PM-9 at 60 μ M was 12.6 ± 2.5 nM.

Lineweaver-Burk plots (Fig. 3) show that finasteride at a concentration of 60 μ M, is a competitive inhibitor for 5 α -reductase enzyme present in *P. crustosum* broth. Figure 4 shows that PM-9 at concentrations of 20 and 60 μ M is a competitive inhibitor for the enzyme; whereas at concentration of 40 μ M, the enzyme 5 α -reductase was inhibited in an uncompetitive manner.

5. Discussion

In this study, we determined for the first time, the enzymatic activity of 5α -reductase present in *P. crustosum* broth. Furthermore, we also evaluated the inhibitory effect of finasteride and the new steroidal compound PM-9 (Figure 1) on this enzyme. In this model the enzyme 5α -reductase was inhibited by finasteride and PM-9, both compounds inhibited also the enzyme present in seminal vesicles of gonadectomized testosterone-treated hamsters. The affinity of finasteride for 5α -reductase present in this system (K_i $1.54\pm 0.25\mu\text{M}$) is lower than that for compound PM-9, because a higher concentration of finasteride is necessary to obtain a similar inhibitory effect (K_i $12.6\pm 2.5\text{ nM}$) [8, 9]. The Lineweaver-Burk plots (Figs. 3 and 4) show that both finasteride and PM-9 at a concentration of $60\mu\text{M}$, are competitive inhibitors for the 5α -reductase present in *P. crustosum* broth. The same competitive inhibition pattern is also observed at a concentration of $20\mu\text{M}$ of PM-9 (Fig 4). Competitive inhibition occurs when the term "slope X V_{max} " is increased by the inhibitor [15] as is the case of finasteride and PM9. However at concentration of $40\mu\text{M}$ the mechanism of inhibition is different due to the presence of an altered pattern, thus indicating an uncompetitive process. These data show that the pattern of inhibition of PM-9 changes with different concentrations. In the maximum and minimum it produces a competitive pattern whereas in the middle, it is uncompetitive.

The K_m value ($0.22\pm 0.07\mu\text{M}$) for 5α -reductase enzyme present in *P. crustosum* broth indicates that it possesses a low affinity (high K_m) for its substrate. Furthermore V_{max} value ($0.83\pm 0.05\text{ pmol of DHT/mg of mycelium/day}$) shows that the maximum

velocity is obtained when the 5α -reductase enzyme exists completely in the form of enzyme:substrate complex [15].

The overall data from this study indicate that the enzyme 5α -reductase present in *P. crustosum* broths has low affinity for T however it can be effectively inhibited by finasteride and compound PM-9. These findings can be used for the screening assay of several new steroidal compounds in order to select the most active 5α -reductase inhibitor. However when the best compound in the *P. crustosum* model is selected, it is still imperative to determine its activity in animal and human androgen dependent tissues.

References

1. Krieg M, Tunn S (1990). Androgen and human benign prostatic hyperplasia (BPH). In: Nieschlag E, Behre HM (eds). Testosterone Action, deficiency, substitution. Springer Verlag, Berlin, pp 219-244.
2. Griffin JE, Wilson JD (1989). The androgen resistance syndromes: 5α -reductase deficiency, testicular feminization, and related syndromes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic Basis of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, pp. 1919-1944.
3. McConnell JD, Stoner E (2001). 5α -reductase inhibitors. In: Anson ML and Edsall JT (eds). Advances in Protein Chemistry Vol 56. Academic Press, San Diego, pp. 143-180.
4. Tunn S, Hochstrate H, Grunwald I, Flüchter St H, Krieg M (1988). Effect of aging on kinetic parameters of 5α -reductase in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. J. Clin Endocrinol and metabolism 67:979-985.
5. Tunn S, Haumann R, Hey J, Flüchter St H, Krieg M (1990). Effect of aging on kinetic parameters of $3\alpha(\beta)$ -hydroxysteroid oxidoreductases in epithelium and stroma of human normal and hyperplastic prostate. J Clin Endocrinol Metab 71:732-739.
6. Krieg M, Bartsch W, Herzer S, Becker H, Voight KD (1977). Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and hormone-binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy. Acta Endocrinol (Copenh) 86:200-215.
7. Belis JA (1980). Methodological basis for the radioimmunoassay of endogenous steroids in human prostatic tissue. Invest Urol 17:332-336.

8. Cabeza M, Gutiérrez E, García G, Avalos AH, Hernández MA (1999). Microbial transformations of testosterone to 5α -dihydrotestosterone by two species of *Penicillium*: *P. chrysogenum* and *P. crustosum*. *Steroids* **64**:379-384.
9. Cabeza M, Quiroz A, Bratoeff E, Heuze I, Ramírez E & Murillo E (2000). Fungi test for evaluation of new antiandrogenic molecule. *Proc West Pharmacol Soc* **43**:29-30.
10. Cabeza M, Heuze I, Bratoeff E, Ramírez E, Martínez R & Murillo E (2001). Inhibition of the conversion of testosterone to dihydrotestosterone by novel steroids in cultures of *Penicillium crustosum*. *Proc West Pharmacol Soc* **44**:103-105
11. Rasmusson GH, Reynolds GF, UTNE T, Jobson RB, Primka RL, Berman C, Brooks JR. (1984). Azasteroids as inhibitors of prostatic 5α -reductase. *J. Med Chem.* **27**:1690-1701.
12. Gormley GJ (1991). Role of 5α -reductase inhibitors in the treatment of prostatic carcinoma. *Urol Clin North Am* **18**:93-98.
13. Weisser H, Tunn S, Debus M, Krieg M. (1994). 5α -reductase inhibition by finasteride (Proscar^R) in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. **59**:616-620.
14. Grane A, Silvestre Y, Castañer Y. (1999) Dutasteride, steroid 5α -reductase inhibitor. Treatment of BPH. *Drugs of the Future* **24** (3): 246-253.
15. Lineweaver H and Burk D (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* **56**:658-666.

Figure 1. Steroid structures. Testosterone **1**, dihydrotestosterone **2**, finasteride **3** and the synthesized steroids.

Figure 2. Determination of K_m and V_{max} values for 5α -reductase enzyme present in *P. crustosum* broths by the Lineweaver-Burk plot.

Figure 3. Lineweaver-Burk plots for the inhibition of *P. crustosum* 5α -reductase enzyme by finasteride. The inhibitory effect of the steroid was determined in *P. crustosum* assay which was carried out with varying testosterone concentrations in the presence of NADPH. Zero value indicates no inhibitor.

Figure 4. Lineweaver-Burk plots for the inhibition of *P. crustosum* 5α -reductase by PM-9 in three different concentrations. The inhibitory effect of the steroids was determined in *P. crustosum* assay which was carried out with varying testosterone concentrations in the presence of NADPH. Zero value indicates no inhibitor.

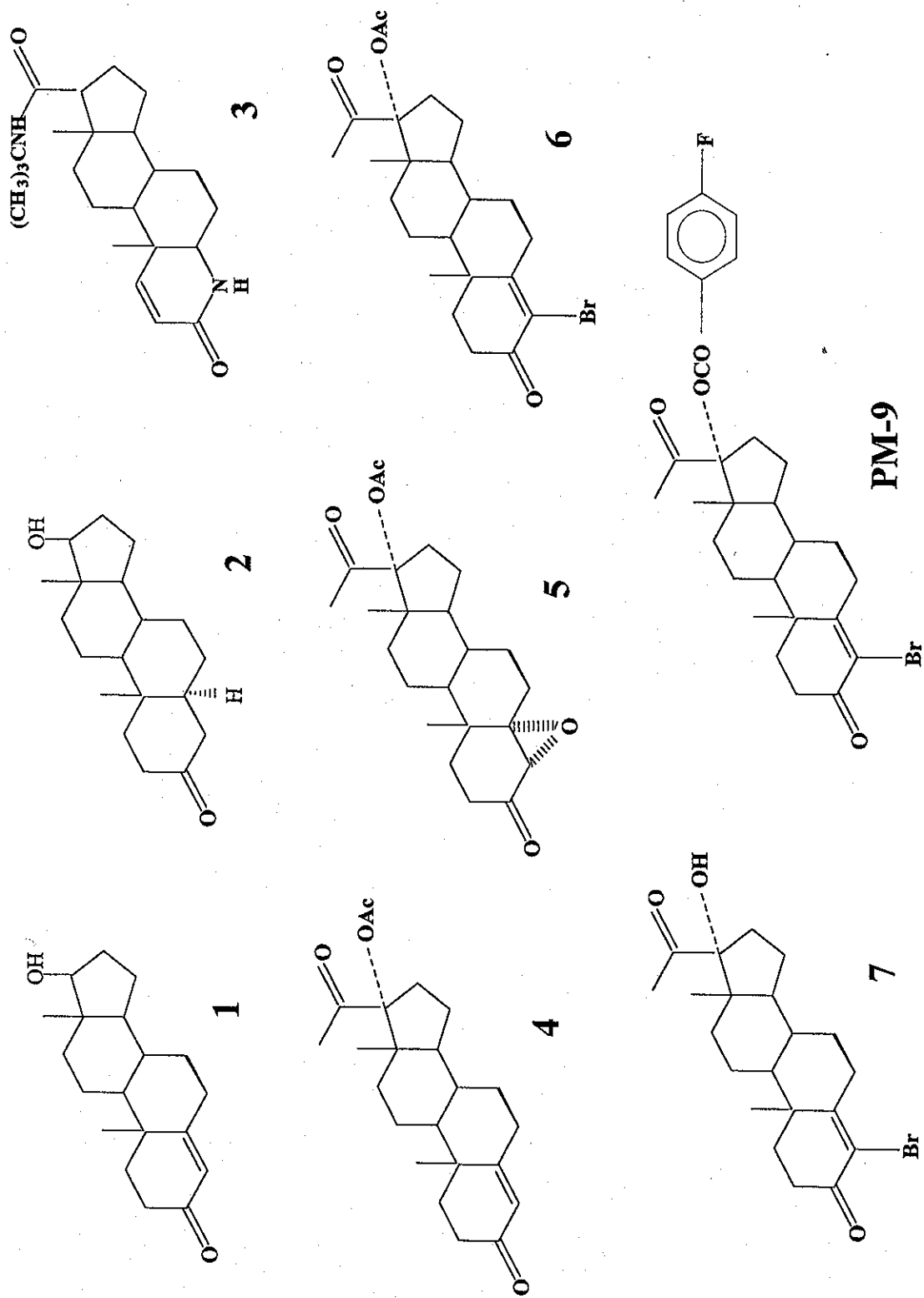
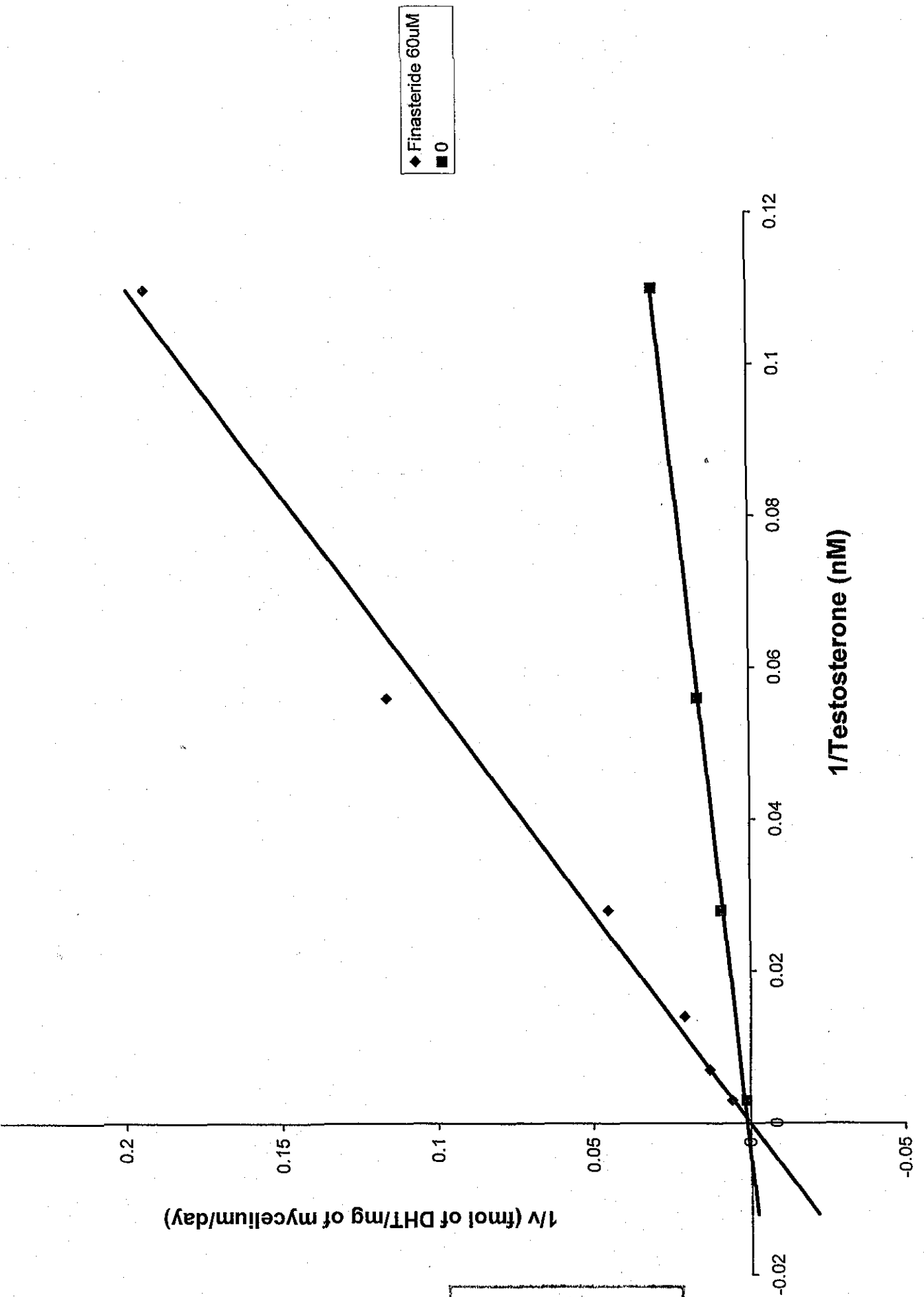
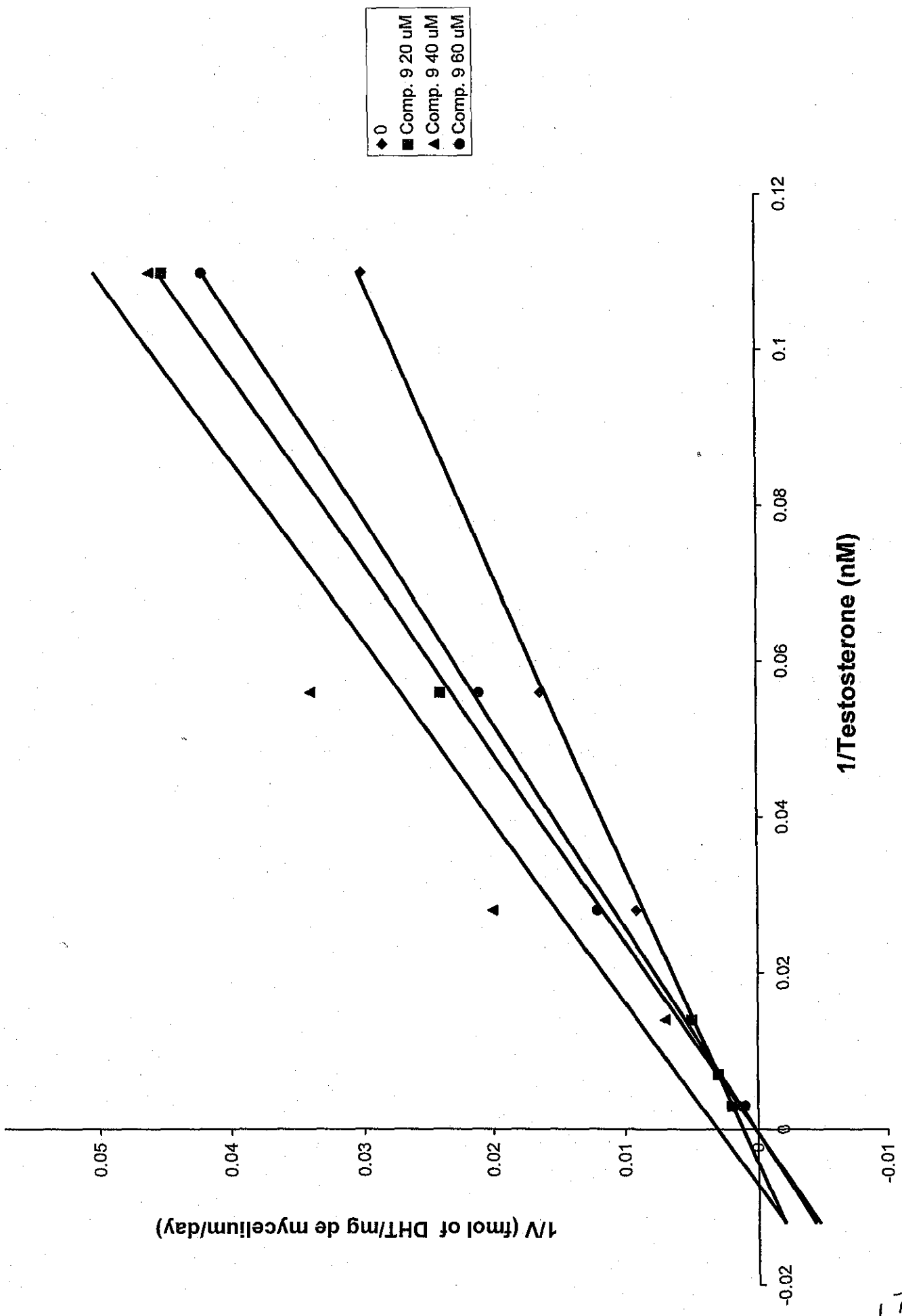


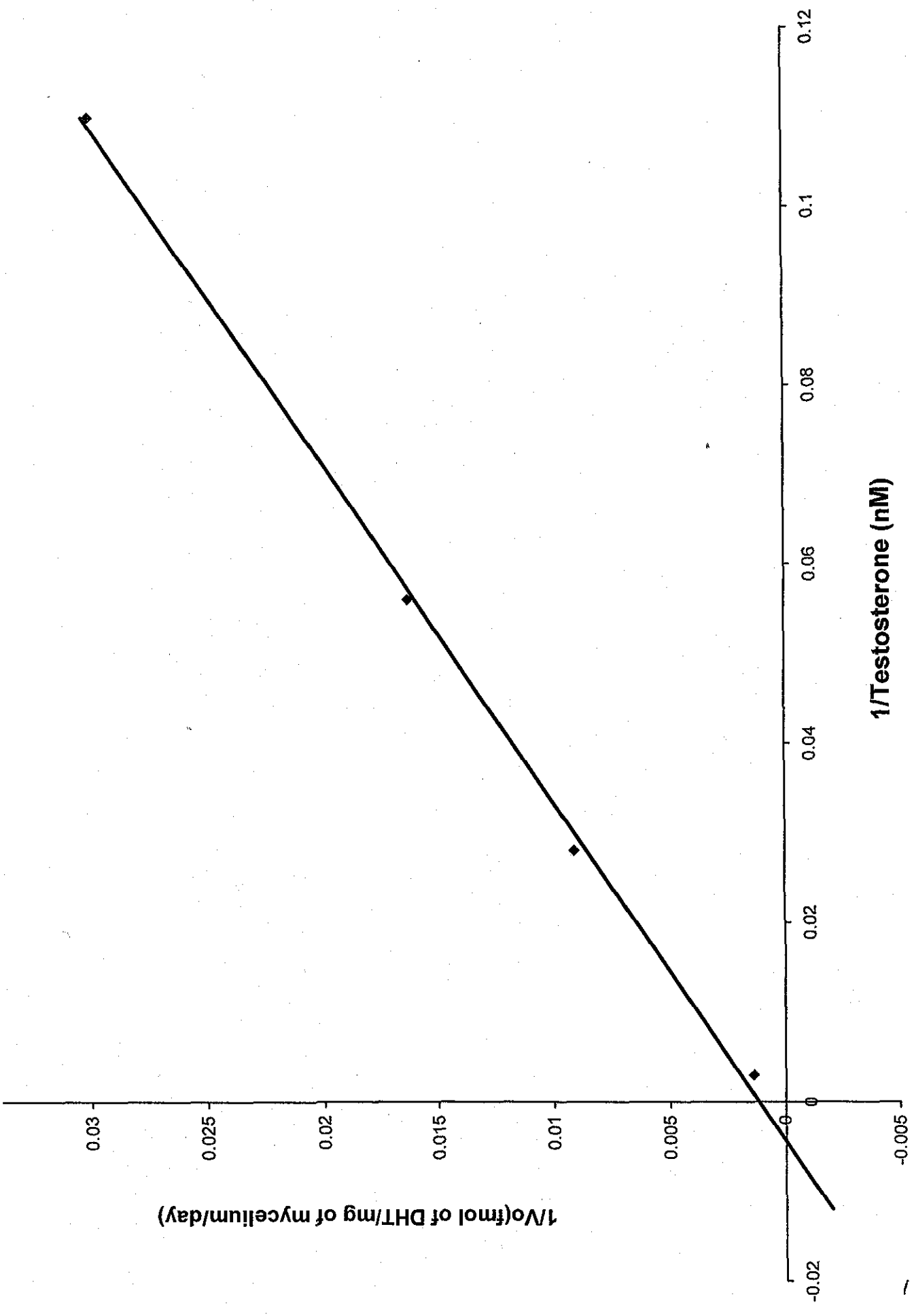
Figure 1. Steroidal structures.



◆ Finasteride 60uM
 ■ 0

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN





Steroid 5 α -Reductase Inhibitors

Eugenio Flores, Eugene Bratoeff*, Marisa Cabeza, Elena Ramirez, Alexandra Quiroz and Ivonne Heuze

National University Mexico D.F. and Metropolitan University Mexico D.F.

Abstract: The objective of this study is to synthesize new steroidal compounds based on the progesterone skeleton with a high inhibitory activity for the enzyme 5 α -reductase. Presently similar compounds are being used for the treatment of androgen dependent diseases such as: hirsutism, androgenic alopecia, benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Dihydrotestosterone 2 (Fig. (1)), a 5 α -reduced metabolite of testosterone 1 has been implicated as a causative factor in the progression of these diseases, largely through the clinical evaluation of males who are genetically deficient of steroid 5 α -reductase enzyme. As a result of this study, the inhibition of this enzyme has become a pharmacological strategy for the design and synthesis of new antiandrogenic drugs. The advent of finasteride 8 (Fig. (4)) a 5 α -reductase inhibitor has gratefully alleviated the symptoms associated with benign prostatic hyperplasia.

In our laboratory we recently synthesized several new 16 β -methyl-pregnadiene-3,20-diones derivatives 27 (Fig.(6)), 38-42 (Fig. (11)), 16 β -phenyl-pregnadiene-3,17a-dione derivatives 32-33 (Fig. (7)), 16 β -phenyl-pregnatriene-3,17a-diones, 30, 31 (Fig. (7)) and 16 β -methyl-pregnatriene-3,20-diones 43-46 (Fig. (11)). These compounds were evaluated as 5 α -reductase inhibitors in the following biological models: *Penicillium crustosum* broths, the flank organs of gonadectomized male hamsters, the incorporation of radiolabeled sodium acetate into lipids, the effect of the new steroids on the reduction of the weight of the seminal vesicles and on the *in vitro* metabolism of [³H]T to [³H]DHT in seminal vesicles homogenates of gonadectomized male hamsters. All trienones 30, 31, and 43-46 in all biological models showed consistently a higher 5 α -reductase inhibitory activity than the corresponding dienones 27, 32, 33 and 38-42. We believe that with these compounds the 5 α -reductase enzyme is inactivated by an irreversible Michael type addition of the nucleophilic portion of the enzyme to the conjugated double bond of the steroid. The trienones having a more coplanar structure react faster with the enzyme and thus show a higher inhibitory activity.

INTRODUCTION

The mechanism of action of steroid hormones begins when they migrate from the blood stream to the cell across the cell membrane by a simple diffusion mechanism. Once inside the cells, the steroids form complexes with intracellular binding proteins called receptors which are specific protein tissues. Steroid receptors were discovered by Jensen and Suzuki in 1968 [1], changing the concept of the mechanism of action of steroid hormones of those days. Latter Gorski [2] demonstrated that hormone receptor binding, triggers a cascade of events that permits the expression of specific genes.

Inside the cells, the uptaken steroid hormones undergo modifications in its molecule producing active metabolites that trigger a cascade of reactions. These molecular changes are due to the presence of enzyme specific tissues. In the prostate for example, the 5 α -reductase enzyme type II [3] catalyzes the conversion of testosterone 1 (T) to 5 α -dihydrotestosterone 2 (DHT), (Fig. (1)). This metabolite is

responsible for the induction of some enzymes such as the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase and the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase [4].

The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase has the capacity to convert testosterone to androstenedione and this compound is converted to 5 α -androstenedione by the 5 α -reductase action. The 5 α -androstenedione is transformed to androstenediol by the action of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme [4-6].

Presently there are several compounds available that can inhibit the mechanism of action of steroid hormones. These inhibitions are carried out at different levels such as: 1) blocking the receptors using an antagonist, 2) inhibiting metabolic enzymes involved in steroidogenesis by chemical agents, 3) inhibiting the mechanism of activation of receptors on molecules that interact with chaperone or Fos and Jun proteins, 4) inhibiting the phosphorylation changes in receptor molecules and 5) modifying the hypothalamic-pituitary axis.

Reports in the literature describe a variety of natural or synthetic steroids having antiandrogenic action. Voight *et al.* in 1970 [7] demonstrated that progesterone 3 and deoxycorticosterone 4 inhibit the DHT formation by competing with Δ^4 -3-keto site of the testosterone molecule for 5 α -reductase enzyme. In 1974 Hsia and Voight [8] also

*Address correspondence to this author at the Facultad de Quimica, Edif. "E", Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico; Phone: 525-622-5290; Fax: 525-622-5329 E-Mail: eugene@servidor.unam.mx

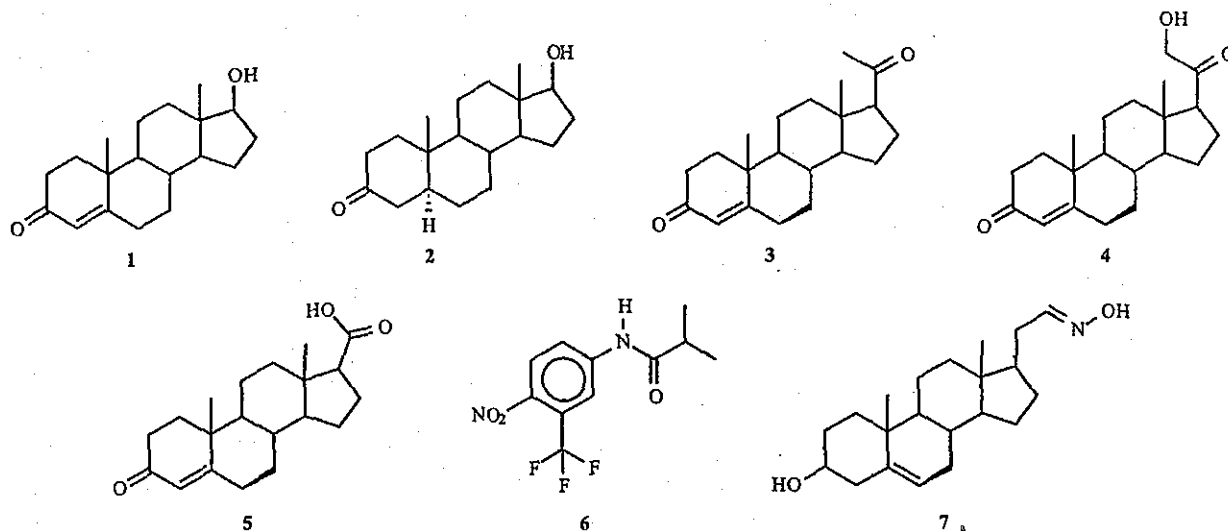


Fig. (1). Structures of Testosterone, Dihydrotestosterone and several commercially available 5 α -reductase inhibitors.

demonstrated that 17 β -carboxy-4-androsten-3-one 5, a product of degradation of deoxycorticosterone is a potent inhibitor of DHT formation. In most of the synthetic and natural steroids, loss of the C-19 methyl group reduces the potency of the steroid to be recognized by 5 α -reductase [8].

The effects of the inhibitors on the genoma had been evidenced by the works of Ziboh *et al.* [9], who in 1970 demonstrated that dehydroepiandrosterone inhibited the glucose-6-phosphatodehydrogenase activity and that of Cabeza *et al.* who showed that levonorgestrel changes lipid composition in flank organs of the treated animals [10].

Furthermore Sciarra [11] and Griffiths *et al.* [12] reported that flutamide 6 prevents the increase of the epidermal growth factor (EGF) as well as the increase of its receptors in androgen dependent tissues produced by testosterone, dihydrotestosterone and 3 α -androstenediol. This action of flutamide on the androgen dependent tissues demonstrates that testosterone and its metabolites as well as the EGF downregulate epidermal growth factor receptor (EGFR) and exhibit a growth-promoting effect by androgens in the prostate gland, mediated by peptide growth factors [11, 12]. This mechanism is in agreement with that reported earlier for other tissues, that require the participation of cAMP as a

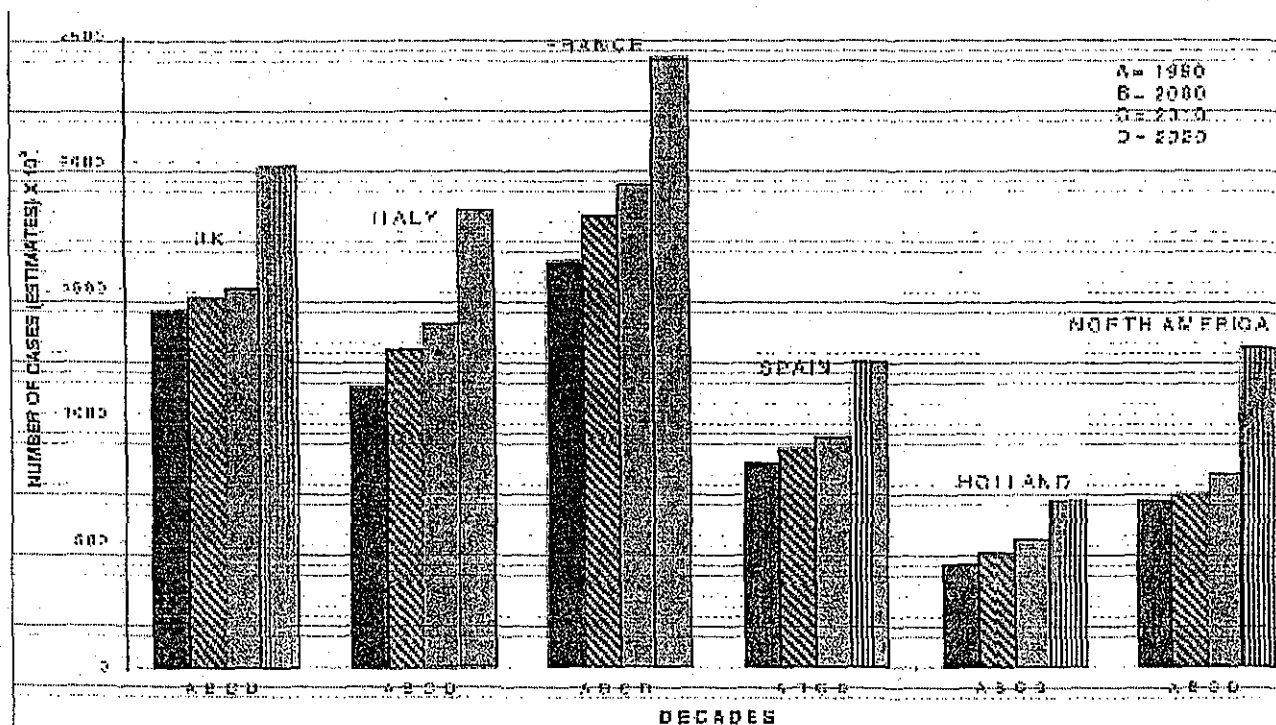


Fig. (2). Diagrammatic Representation of Cancer Increase.

signal molecule for its growth and differentiation, suggesting that in this case β adrenoreceptors are involved. It is well known fact that testosterone increases β adrenoreceptors in prostate cell membranes. Collins *et al.* [13] and Guthrie *et al.* [14] demonstrated that testosterone, but not dihydrotestosterone increases β receptors in prostate gland, which in addition increases the prostate binding, essential for the prostate differentiation [15].

An analysis of these concepts leads to an alternative hypothesis that androgens and β adrenergic pathways may be involved indirectly in the growths of local growth factors or other intracellular mediators which regulate the growth and differentiation programs displayed by specialized target cells as is the case with the prostate gland.

ANDROGEN ANTAGONISTS

Androgen antagonists offer a potentially useful treatment for androgen mediated diseases such as: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, polycystic ovary syndrome, hirsutism in women, seborrhea, androgenic alopecia and precocious puberty [16]. A recent report from the World Health Organization [17] revealed that carcinoma of the prostate is the second most commonly diagnosed cancer after skin cancer in the male population of the USA and the second most common cause of death from cancer after that of lung.

The age adjusted mortality rates per 100,000 vary in different regions of the United States from 18.9 for white males in Arkansas to 55.5 for black men in North Carolina, probably the highest mortality rate in the world [17, 18]. Overall, around the world, the incidence of prostatic cancer is increasing at an annual rate of approximately 2% to 3% (Fig. (2)), with the lifetime risk of the disease developing in North American men, being nearly 10% [19]. Most of the antiandrogens are synthetic substances with exception of progesterone 3 (Fig. (1)), which has a moderate antiandrogenic activity. No ailment is more common among middle aged males or cause more apprehension than prostate troubles or a prostatic operation; it is the operation men fear most. Although surgery presently represents the most acceptable treatment for prostatic cancer, about 400,000 resections are performed annually in USA [17, 18]; there are also several other modalities available for the treatment of both benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. The most important therapeutic methods available today are: inhibition of androgen production by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist [18], inhibition of androgen action by androgen receptor antagonists [19], inhibition of testosterone 1 conversion to dihydrotestosterone 2 by 5 α -reductase enzyme inhibitors [19, 20], β adrenoreceptors antagonists [21, 22] and several other less common therapies [3].

5 α -REDUCTASE INHIBITORS

Enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of testosterone 1 are attractive target for drug design and drug development. The phenotypic consequences of genetic

steroid 5 α -reductase deficiency however do suggest a strategy for the development of drugs that may be useful in the treatment of benign prostatic hyperplasia, acne, male pattern baldness and prostate cancer.

At birth male with steroid 5 α -reductase deficiency have ambiguous external genitalia. They are common raised as a girls. At puberty, there is a striking change with the development of a typical male phenotype including enlargement of the phallus to become a functional penis. Such male pseudohermaphrodites, initially identified in the Dominican Republic by Imperato [23], as steroid 5 α -reductase deficient, were referred by local townspeople as guevedoces (penis at age 12). Post puberty affected individuals demonstrated a tiny prostate, no temporal recession of the hairline and no acne. The deficiency in steroidal 5 α -reductase, the NADPH-dependent enzyme that converts testosterone to 5 α -dihydrotestosterone, results in very low circulating dihydrotestosterone levels and a much elevated testosterone: dihydrotestosterone ratio compared with normal men [23].

The study of these individuals allows roles for those two androgens at puberty to be assigned.

Testosterone Induced

Male sex drive performance

Muscle mass increase

Penis enlargement

Scrotum enlargement

Vocal cord enlargement

Spermatogenesis

Dihydrotestosterone Induced

Increase facial, body hair

Acne

Scalp hair recession

Prostate enlargement

Since testosterone 1 and dihydrotestosterone 2 share a common receptor, it appears surprising that the effect of dihydrotestosterone is not mimicked by testosterone. Dihydrotestosterone amplifies the androgen signal (compared with that of testosterone) as a result of its severalfold higher affinity for the androgen receptor. It has also been suggested that the dihydrotestosterone-receptor complex has a higher affinity for acceptor site in the nuclear chromatin than does the testosterone-receptor complex [24].

The local conversion of testosterone to dihydrotestosterone by 5 α -reductase enzyme probably serves as an androgen amplification mechanism. Such amplification

may be less critical in tissues where testosterone suffices for the androgen effect (anabolic development), but essential for dihydrotestosterone dependent tissues (prostate, seminal vesicles and sebaceous glands).

Dihydrotestosterone **2** is therefore essential for differentiation of male external genitalia including the prostate, during embryogenesis. It is not yet certain whether dihydrotestosterone is required for the growth of the differentiated prostate, although dihydrotestosterone propionate administration to an affected subject for one year did result in an increase in prostate size [24]. Dihydrotestosterone depletion should have positive therapeutic consequences without having adverse effects on the desirable masculine characteristics mediated by testosterone.

The 5α -reductase enzyme 3-oxo-steroid-4-ene-dehydrogenase is a hydrophobic protein formed by 259 amino acids. Its molecular weight is 29,462 and is located in the microsomal fraction on the target cell. [3-6].

Species differences between the prostatic steroid 5α -reductase of rat, dog and human have been demonstrated with a series of 4-aza-steroidal inhibitors containing varying substituent at position 17 [25, 26]. These compounds with a 17β -dialkylcarbamoyl group are approximately equipotent inhibitors of the rat and the human enzyme, but are only 0.1-15 % as potent inhibitors of the dog enzyme. Inhibitors with a b-spiroether substituents are most potent with the rat enzyme being only 15-50 % and 0.2-0.4 % as effective against the activity derived from dog and human respectively. Appropriate substitution at C-17 is therefore of particular importance in inhibitor design. Furthermore, the pH optimum of the enzyme activity varies between the human (pH 4.8-5.2), dog (pH 6.2-6.8) and rat (pH 6.5-7.0).

A mechanism of action (Fig. (3)) consistent with the known regio and stereochemistry of reduction involves direct hydride donation from NADPH to the 5-position of

testosterone, thus leading to enolate formation at C-3, C-4. The enolate presumably would be stabilized by some electrophilic residue (E^+) in the active site. This process may be viewed alternatively as activation of the enone by (E^+) leading to a positively polarized species which accepts a hydride from NADPH at C-5. Enzyme mediated tautomerism then leads to the product dihydrotestosterone with the release of $NADP^+$.

The enzyme 5α -reductase responsible for the reduction of testosterone to dihydrotestosterone exists in two forms: 5α -reductase isozymes type 1 and 2. Type 1 occurs in the skin, liver, ventral prostate and acts in acidic and basic medium. The type 2 enzyme is expressed in ventral prostate, epididymis and other reproductive tissues. It acts in acidic medium. Humans, monkeys and rats have both types of the enzyme that can be distinguished on the basis of substrate affinity, pH optimum and inhibition to certain 4-azasteroids. This enzyme serves as an important regulator of hormone action in androgen sensitive cells [27], and is absent in some androgen sensitive tissues such as muscles and testes of old human males.

The most extensively studied class of 5α -reductase inhibitors are the 4-azasteroids [28] which includes the drug finasteride **8** (Fig. (4)). Finasteride is the first 5α -reductase inhibitor approved in the USA for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). This drug has approximately a 100-fold greater affinity for type 2 5α -reductase enzyme than for the type 1 enzyme demonstrating an IC_{50} value of 4.2 nM for type 2 enzyme [28]. In humans, finasteride decreases prostatic DHT levels by 70-90 % and reduces prostate size [29], while testosterone tissue levels remain constant. The use of finasteride **8** demonstrated a sustained improvement in the treatment of BPH and a reduction in prostate specific antigen (PSA) levels [30, 31]. Related analogs **9**, **10** and **11** have also demonstrated effectiveness *in vitro* and *in vivo* [32-35]. A new 6-azasteroid **12** has also shown potential inhibition of 5α -reductase [36].

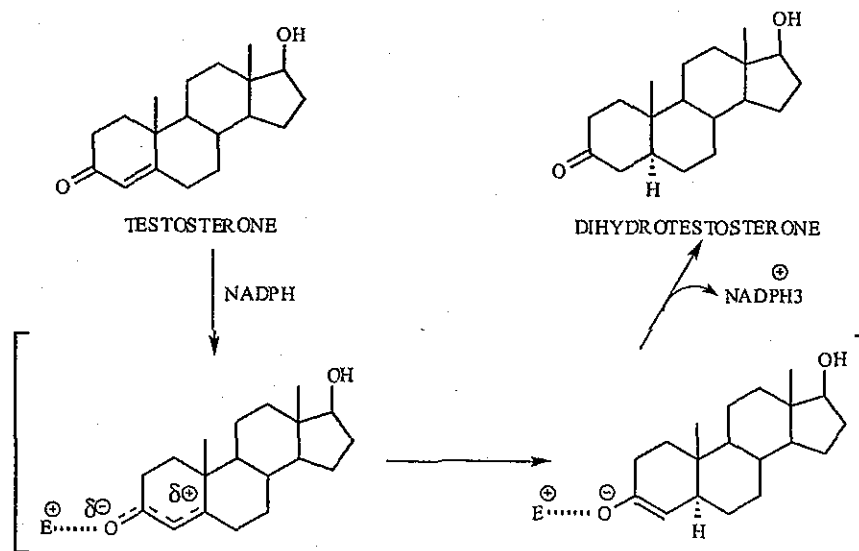


Fig. (3). Mechanism of Testosterone Reduction.

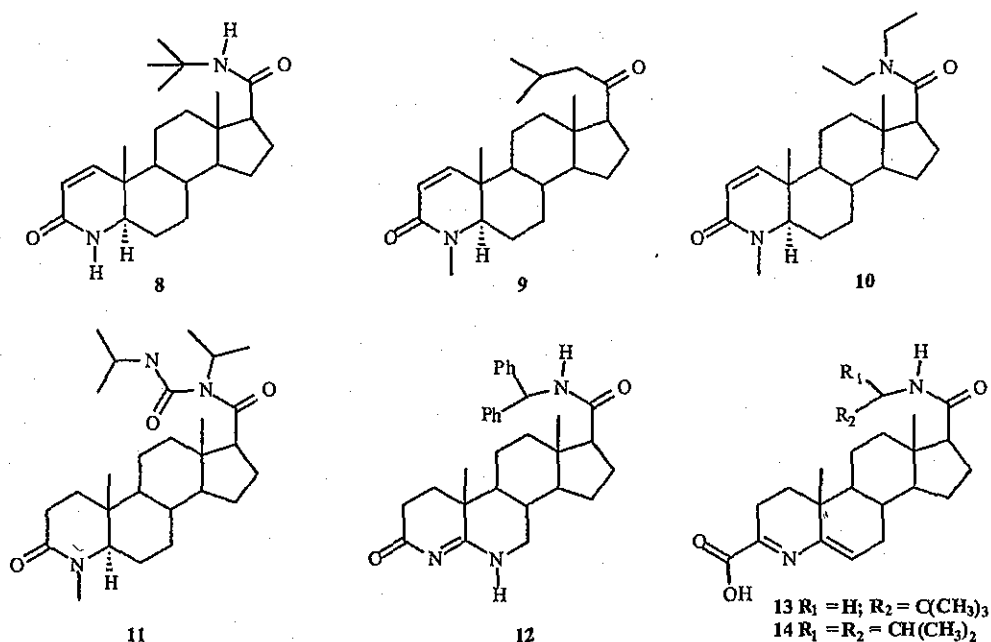


Fig. (4). Structures of Finasteride and analogs steroidal 5 α -reductase inhibitors.

Androstadiene-3-carboxylic acids 13 and 14 (Fig. (4)) were recently synthesized and have shown a potent uncompetitive inhibition of type 2 5 α -reductase [37, 38]. Epristeride 13 [39] has exhibited the ability to lower serum DHT levels by 50% in clinical trials [40, 41]. Other analogs with acidic functionality at the C-3 position include 15 and 16 (Fig. (5)) and the estratriene carboxylic acid 17 have also demonstrated a high inhibitory activity [42]. Finally the allenic secosteroid 18 and compound 19 have shown a potent irreversible inhibitory action to 5 α -reductase, even

though it was originally developed as an irreversible inhibitor of 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase-D-4,5-isomerase [42-44].

Recently Hartman *et al.* [45] synthesized novel steroidal oxime inhibitors for 17 α -hydroxylase/C-17,20 lyases and 5 α -reductase types 1 and 2 having the basic structure as shown in 7 (Fig. (1)). This compound showed an excellent inhibitory activity toward the human 5 α -reductase types 1 and 2 and a reasonable activity toward the rat enzyme

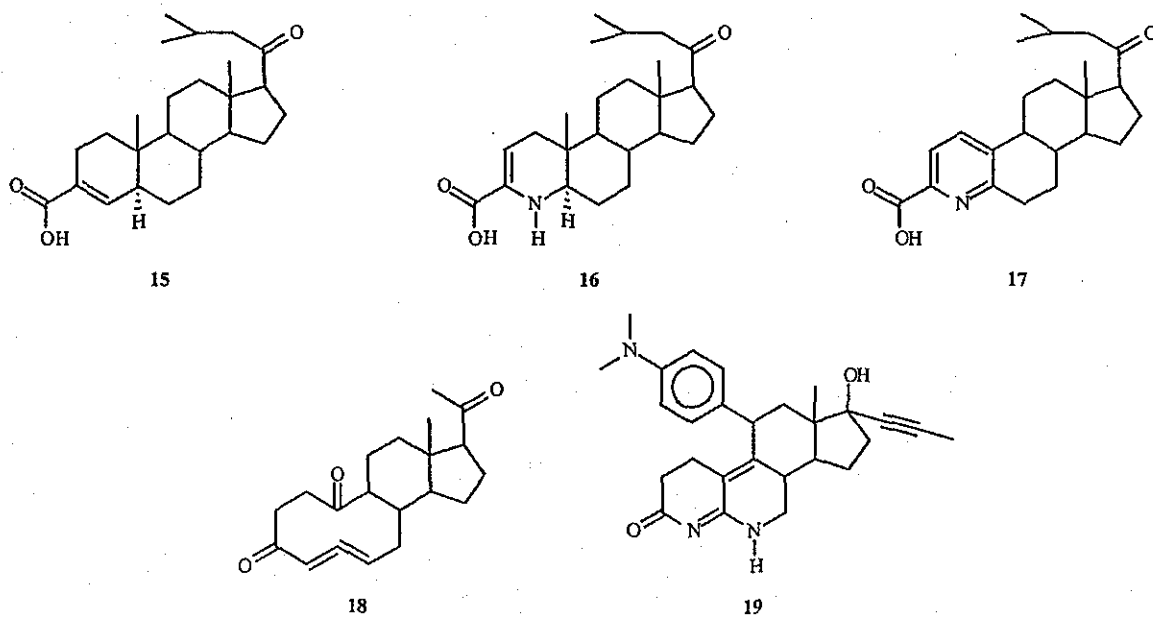


Fig. (5). Commercially available steroidal 5 α -reductase inhibitors.

Synthesis and Pharmacological Evaluation

In this paper we describe the synthesis and pharmacological evaluation of several new 16-methyl

substituted pregnane compounds (Fig. (6)) and phenyl substituted D-homo-pregnane steroidal derivatives (Fig. (7)). The biologically active compounds 21, 26 and 30-33 were prepared from the commercially available 16-

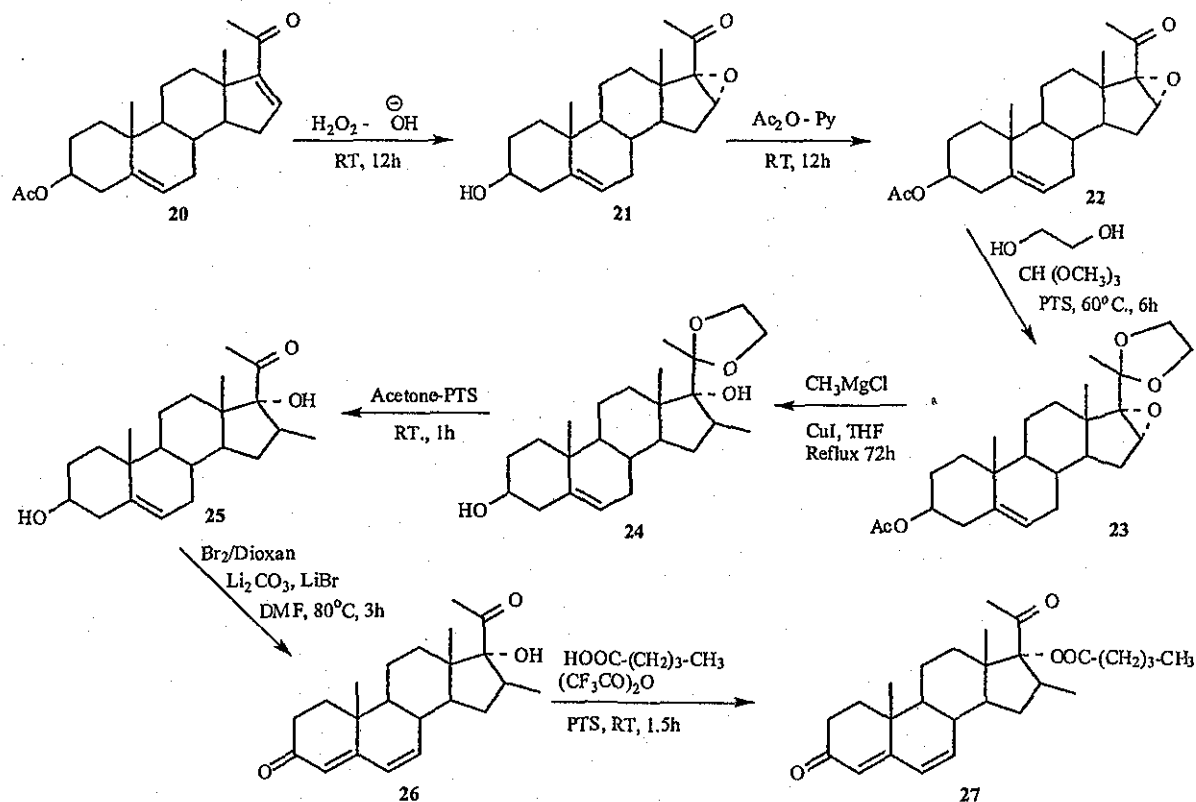


Fig. (6). Reaction sequence for the synthesis of the biologically active compounds.

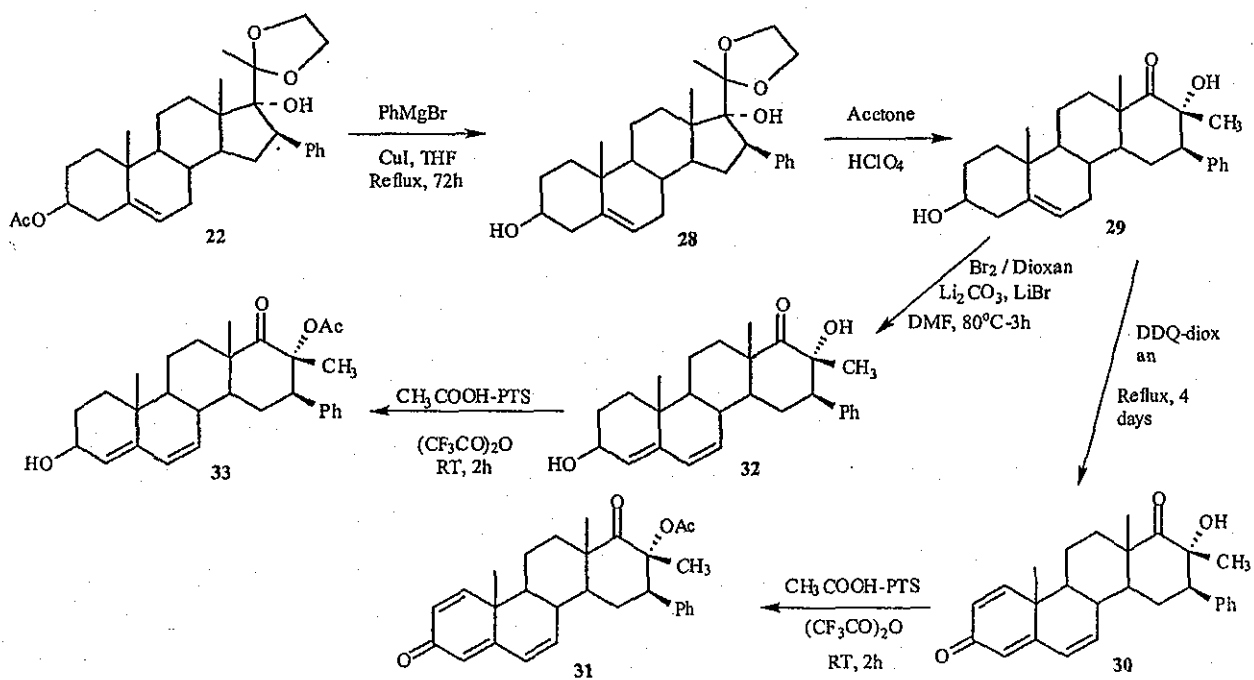


Fig. (7). Reaction sequence for the synthesis of the biologically active compounds.

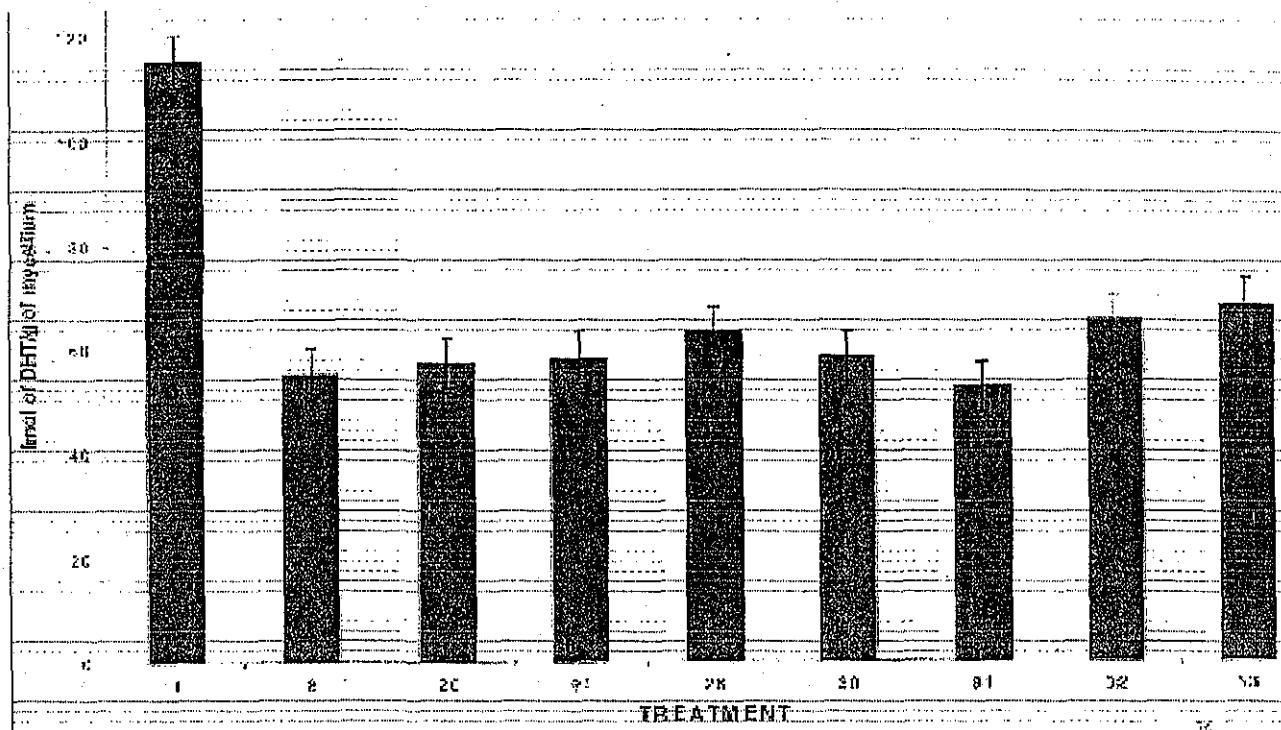


Fig. (8). Effect of different synthetic steroids on the conversion of [^3H]T to [^3H]DHT in *P. crustosum*.

dehydropregnenolone acetate **20**; surprisingly this compound showed a small pharmacological activity (Fig. (6)) [46-48]. The *in vitro* biological activity of these compounds was determined by following the transformation of testosterone (T) (**1**) to dihydrotestosterone (DHT) (**2**) produced by 5 α -reductase enzyme in *P. crustosum* broths [49, 50], by the *in vivo* steroid action upon the flank organs where the DHT is bound to its cognate receptor [47, 51] and also by the incorporation of radiolabeled sodium acetate into lipids in these glands [52, 53].

Conversion of T to DHT has been demonstrated in *P. decumbens* and *P. crustosum* broths obtained from fermented pistachios, lemons and corn tortillas [49,50]. For the determination of the biological activity of the new steroids **20**, **21**, **26** and **30-33** as 5 α -reductase inhibitors, we used the conversion of T to DHT in *P. crustosum* broths as shown in (Fig. (8)). Radiolabeled T in the incubated medium significantly increased its conversion to DHT as compared to T plus finasteride **8** or a combination of steroids **20**, **21**, **26** and **30-33** with testosterone (T). Finasteride **8** decreased the conversion of [^3H]T to [^3H]DHT ($p < 0.005$) effected by the fungi. These data indicate that **8** as well as the above mentioned steroids are good inhibitors for the conversion of T to DHT in this model.

In another experiment, we used the flank organs of gonadectomized male hamsters to test the 5 α -reductase inhibitory activity of these steroids [47, 52]. Hamster flank organs are dorsal spots on the skin that are composed of pilosebaceous tissue. These glands are androgen-dependent and upon castration, the diameter of the spot decreases; daily injection of T restores the original size. The flank organs can

convert T to DHT and are used for the screening of new antiandrogenic drugs [51,54]

The flank organs are larger in males than in females and are capable of synthesizing lipids, furthermore they can modify the sebum lipid composition under T or progesterone stimuli [52,53]. In this experiment, the diameter of the pigmented spot on the glands 15 days after castration significantly decreased ($p < 0.005$) as compared to that of the uncastrated animals. Subcutaneous injection of the vehicle alone did not change this condition. However treatment with T restored the original diameter of the spot.

Finasteride **8** [54, 55] as well as steroids **20**, **21**, **26** and **30-33** significantly decreased ($p < 0.005$) the diameter of the pigmented spot on the flank organs as compared to that of the T treated animals Table 1. The most effective compounds in these experiments were steroids **20** and **31** which reduced the diameter of the pigmented spot to 1.5 mm, followed by finasteride, 2.5 mm and steroids **30**, **32** and **33**. These data suggest that compounds **20** and **30-33** are strong inhibitors of the conversion of T to DHT and this confirms the validity of this model for the determination of 5 α -reductase inhibitory activity. Table 1 also shows the percentage of [1,2- ^{14}C] sodium acetate incorporation into lipids as well as the rate of this incorporation. Compounds **20**, **30** and **31** exhibited a much lower percentage of sodium acetate incorporation than finasteride **8**. These data which are the result of two different experiments performed in duplicate confirm the importance of sex hormones in lipid metabolism in the flank organs [52]. The vehicle treated control sample showed a higher percentage of sodium acetate incorporation although it is much lower than that of T

Table 1. Effect of Different Compounds on Male hamster Flank Organ Diameter (mm \pm S.D.) and *In vitro* Incorporation of [14 C] Acetate in Lipids

	Treatment(mg)	Diameter of the pigment spot (mm)	Percentage of incorporation	Incorporation 1,2- 14 C acetate into lipids (nmol/gland)
CONTROL		2.5 \pm 0.9	0.46	0.125 \pm 0.004
T	0.2	6.0 \pm 2.0	0.96	0.255 \pm 0.002
T + 8	0.2	2.5 \pm 0.9	0.31	0.080 \pm 0.005
T + 20	0.2	1.5 \pm 0.4	0.07	0.055 \pm 0.001
T + 21	0.2	3.0 \pm 1.0	0.35	0.090 \pm 0.004
T + 26	0.2	4.3 \pm 1.0	0.76	0.115 \pm 0.004
T + 30	0.2	2.0 \pm 0.5	0.15	0.080 \pm 0.009
T + 31	0.2	1.5 \pm 0.5	0.07	0.056 \pm 0.001
T + 32	0.2	2.0 \pm 0.3	0.78	0.115 \pm 0.008
T + 33	0.2	2.0 \pm 1.0	0.70	0.100 \pm 0.004

Results are expressed as percentage of nmol/per gland \pm S.D. Significant difference was observed between the diameter of gland, as well as in the incorporation of [14 C] acetate in lipids ($p < 0.005$) from castrated control animals (control) and T-treated (T). Finasteride (8) decreased both the diameter of the glands as well as the incorporation of [14 C] acetate in lipids ($p < 0.005$). New steroids (20, 21, 30-33) significantly inhibited ($p < 0.005$) the diameter of the flank organs as well as the incorporation of [14 C] acetate in lipids.

treated hamsters. These experiments indicate that *P. crustosum* broths can be used as a model for the evaluation of 5 α -reductase inhibitory effect of a variety of steroidal compounds and thus replace the animal model which involves the sacrifice of dozens of hamsters. In the *P. crustosum* broths, finasteride as well as compounds 20, 21,

26 and 30-33 inhibited the conversion of T to DHT, thus confirming the presence of 5 α -reductase enzyme in the fungal culture [47].

As we expected, the decrease of the diameter of the pigmented spot on the flank organs produced by compounds

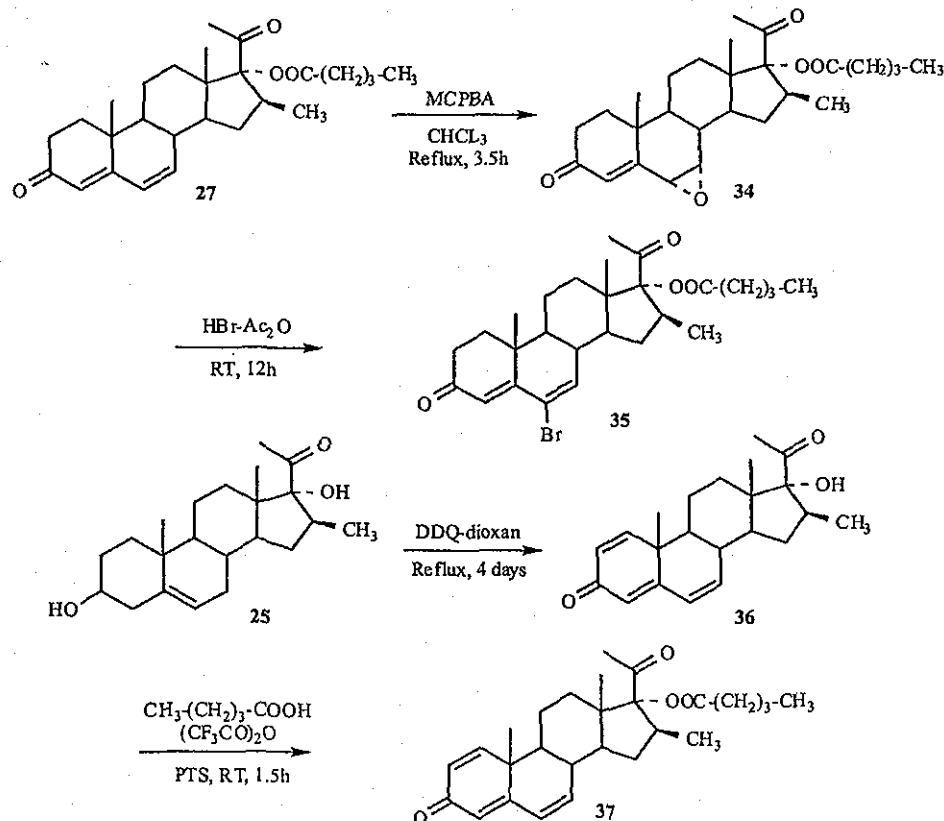


Fig. (9). Reaction sequence for the synthesis of the biologically active compounds.

20 and 30-33 correlates well with the reduction of the labeled sodium acetate incorporation into lipids. This corroborates the fact that the 5 α -reductase inhibitory effect is related to the labeled sodium acetate incorporation. However the observed effect could also be the result of the antagonistic activity of the novel steroids on the androgen receptor. It is important to emphasize that the results from the three experiments correlate very well, thus confirming the fact that steroids 20 and 30-33 are powerful 5 α -reductase inhibitors.

In another study we determined the 5 α -reductase inhibitory activity of several 16-methyl substituted pregnane derivatives such as: the dienones 27, 35, the epoxy compound 34 and the trienones 36 and 37 all synthesized in our laboratory (Fig. (9)). The pharmacological evaluation of

these compounds was carried out in flank organs, seminal vesicles and the effect of the new steroidal compounds on the *in vitro* metabolism of [³H]T to [³H]DHT in seminal vesicles homogenates of gonadectomized male hamsters [47].

In the flank organs model Table 2 the diameter of the pigmented spot on the glands 15 days after castration significantly decreased ($p < 0.005$) as compared to that of the uncastrated animals. The new steroids 27 and 34-37 decreased the diameter of the pigmented spot as compared to that of testosterone (T), thus suggesting an inhibitory effect on the enzyme 5 α -reductase. The most effective compound in this model was steroid 37 which reduced the diameter of the pigmented spot to 1.8 mm. Table 2 also shows the 5 α -reductase inhibitory effect of steroids 27 and 34-37 related to

Table 2. The Diameter of Flank Organs and Weight of the Seminal Vesicles were Measured from Animals that Received Several Treatments of C-16 Substituted Steroids. The Results are Given \pm Standard Deviation

	Treatment(mg)	Diameter of the pigment spot (mm)	Weight of seminal vesicles (mg)
CONTROL		2.75 \pm 0.05	177.45 \pm 30.7
T	0.2	4.25 \pm 0.50	317.83 \pm 30.1
T + 8	0.2	3.00 \pm 0.02	216.00 \pm 27.8
T + 27	0.2	3.00 \pm 0.00	265.15 \pm 30.4
T + 34	0.2	2.00 \pm 0.00	208.75 \pm 24.5
T + 35	0.2	3.00 \pm 0.50	246.00 \pm 49.1
T + 36	0.2	3.00 \pm 0.50	231.25 \pm 35.2
T + 37	0.2	1.80 \pm 0.50	202.00 \pm 30.1

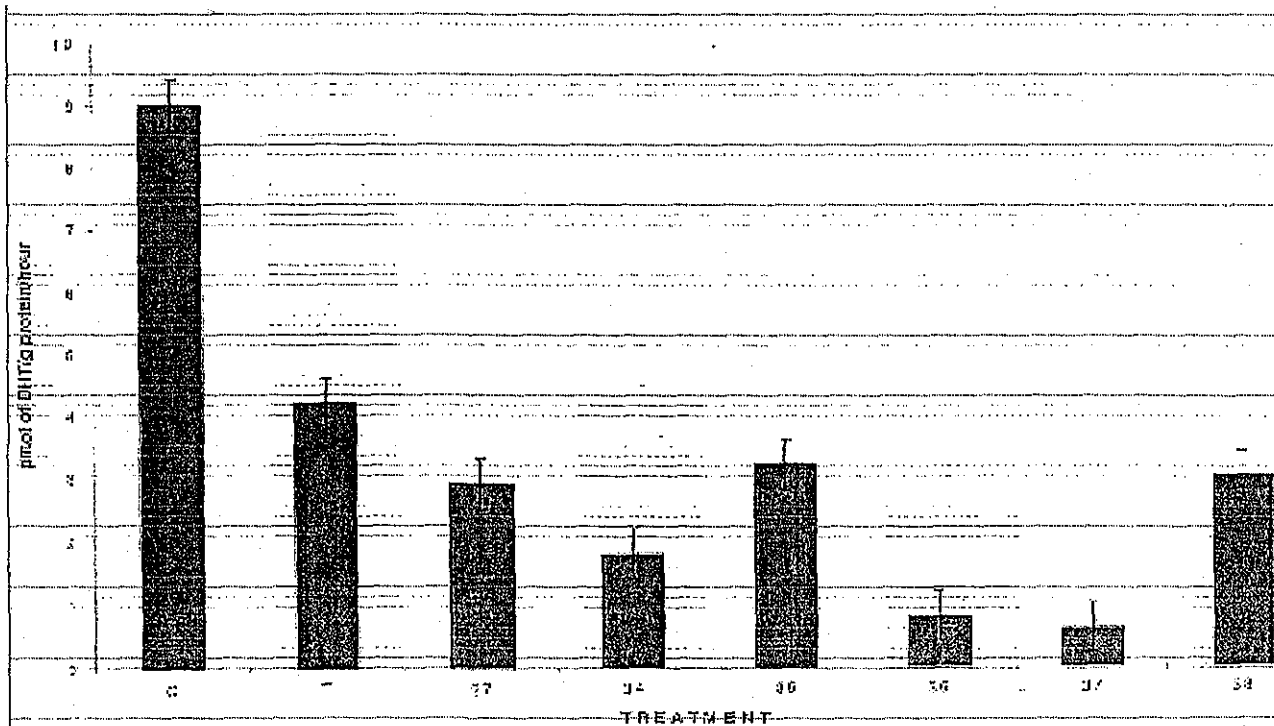


Fig. (10). Effect of different synthetic steroids on *in vitro* conversion of [³H]T to [³H]DHT in castrated male hamster flank organs.

the weight of the seminal vesicles of castrated male hamsters treated with T, a combination of T plus finasteride **8** and T plus steroids **27** and **34-37**. These data show that the new steroidal compounds decreased the weight of the seminal vesicles as compared to the T treated hamsters, thus indicating a high 5α -reductase inhibitory effect. Steroids **34** and **37** exhibited a higher biological activity than compounds **27**, **35** and **36**. As can be seen from (Fig. (10)), (DHT formation expressed as pmol of DHT/g of protein per hour) the trienones **36**, **37** and the epoxy compound **34** showed a higher biological activity than the corresponding dienone **27** (Fig. (9)), [47, 55-58].

Tables 1 and 2 exhibit the 5α -reductase inhibitory activity of several dienone and trienone steroidal compounds all showing a high biological activity. In order to extend the scope of this study and obtain a greater variety of data from steroidal compounds, we prepared several new dienones **38-**

42 and trienones **43-46** (Fig. (11)). The pharmacological activity of these compounds as 5α -reductase type 2 inhibitors were determined by measuring the amount of dihydrotestosterone produced, expressed as pmoles of protein per hour. Compounds **38-42** and **43-46** (Fig. (12)) were administered to castrated hamsters at a dose of 200 μ g 15 days after castration and the DHT formation was measured. These data show very convincingly that the trienones **43**, **44** and **45** inhibited more effectively the DHT synthesis than the control sample finasteride **8**, the drug of choice today for the treatment of benign prostatic hyperplasia. On the other hand, the steroidal dienones **38-42** exhibited a lower 5α -reductase inhibitory activity [59]. As previously observed [47], compounds having the 4,6-diene-3-one moiety **27** (Fig. (6)), **32**, **33** (Fig. (7)) and **38-42**, (Fig. (11)) always exhibited a lower 5α -reductase inhibitory activity than the 1,4,6-trien-3-one system, compounds **30**, **31**, (Fig. (7)) and **43-46**, (Fig. (11)).

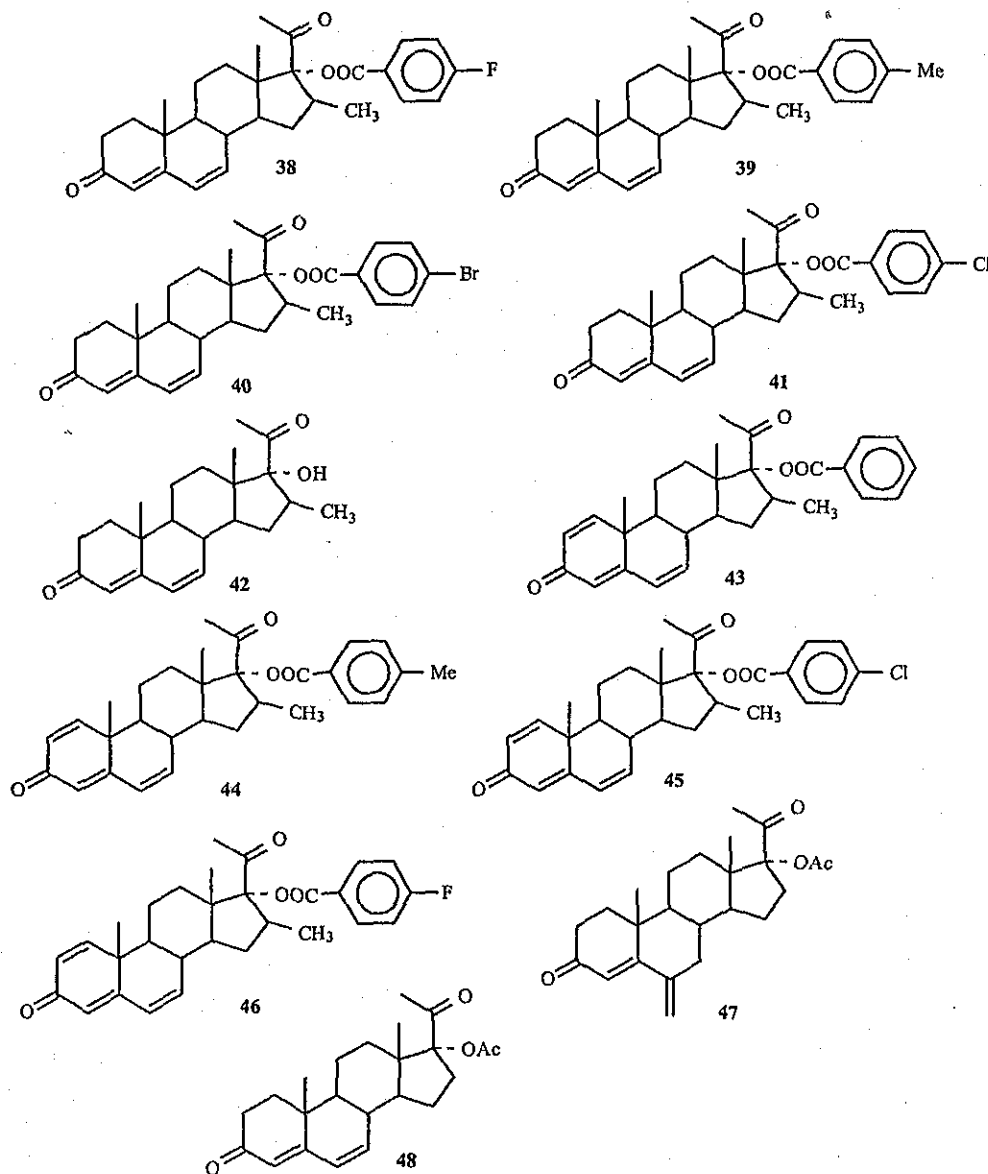


Fig. (11). Structure of biologically active dienones and trienones.

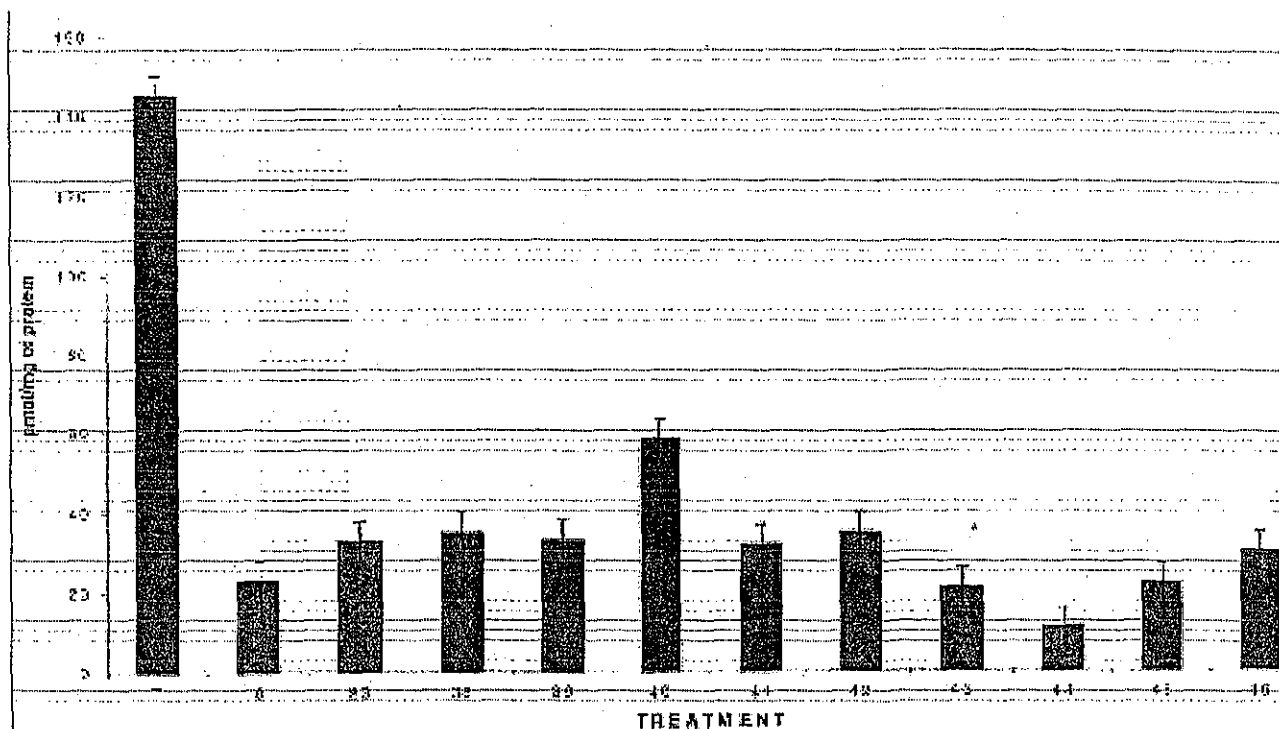


Fig. (12). Effect of different synthetic steroids on *in vitro* conversion of [³H]T to [³H]DHT in castrated male hamster flank organs.

Several years ago we carried out a theoretical computer assisted study [58] with similar compounds. The results from this work indicated that the first step in the inhibition of the enzyme 5 α -reductase consists in the formation of an enzyme-steroid activated complex. In a subsequent step, the nucleophilic portion of the enzyme (amino group) adds to the conjugated double bond of the steroid in a Michael type addition reaction to form an irreversible adduct with a concomitant inhibition of the enzyme 5 α -reductase. This fact explains very well the higher biological activity of the trienones 30, 31 and 43-46 as compared to the dienones 27, 32, 33 and 38-42. 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 [59].

This hypothesis explains also the fact that 17 α -acetoxy-6-methylenepregn-4-ene-3,20-dione 47 has much higher 5 α -reductase inhibitory activity than the corresponding 17 α -acetoxypregna-4,6-diene-3,20-dione 48, (Fig. (11)), both compounds previously synthesized and evaluated by Petrow [60]. The 6-methylene compound 47 having an exocyclic double bond can react much easier with the enzyme in a Michael type addition reaction than the corresponding endocyclic diene 48.

In the case of the active epoxy compound 34 (Fig. (9)) having a flatter B-ring, it is also possible that the nucleophilic portion of the enzyme reacts with the electrophilic carbon atom C-7 of the oxiran ring with a subsequent opening of the epoxy ring thus forming a stable steroid-enzyme adduct [59]. As a result of this, the enzyme 5 α -reductase is inhibited and this explain the high pharmacological activity of the epoxy compound 34.

At the present time, we are synthesizing several new exocyclic and endocyclic dienones and trienones with the purpose of enlarging the scope of this hypothesis. The intermediate compounds obtained in this synthesis 21-25 and 26 showed a low pharmacological activity.

CONCLUSION

This study reports the synthesis and pharmacological evaluation of several new 16-methyl substituted pregnadiene, pregnatriene and also 16-phenyl substituted D-homopregnane steroidal derivatives (Figs. (6, 7)). As can be seen in (Fig. (8)) compounds 20 and 30-33 decreased the conversion of [³H]T to [³H]DHT in *P. crustosum* broths [49, 50]. These data show very convincingly that the *P. crustosum* broths can be used as a model for the evaluation of 5 α -reductase inhibitory effect and thus can replace the animal model which involves the sacrifice of many hamsters. The same steroids decreased the diameter of the flank organs and also reduced the incorporation of radiolabeled sodium acetate into lipids (Table 1). The results from the three experiments correlate very well and thus confirm the fact that steroids 20 and 30-33 are powerful 5 α -reductase inhibitors.

In another study, the 5 α -reductase inhibitory activity of several dienones 27, 35 (Figs. (6 and 9)) and trienones 36, 37 (Fig. (9)) was determined. In this experiment, these steroids were evaluated in three different models: the flank organs, seminal vesicles and the effect of these steroidal compounds on the *in vitro* metabolism of [³H]T to [³H]DHT in seminal vesicles homogenates of gonadectomized male hamsters [47].

In the flank organs model, Table 2, the steroidal derivatives 27 and 34-37 decreased the diameter of the pigmented spot as compared to testosterone treated animals thus suggesting an inhibitory effect for the enzyme 5 α -reductase. The same steroidal compounds exhibited also a high biological activity in the seminal vesicles model (Fig. (10)).

In order to increase the scope of this study we synthesized several new dienones 38-42 and trienones 43-46 (Fig. (11)). These compounds were evaluated as 5 α -reductase inhibitors by measuring the amount of dihydrotestosterone produced (Fig. (12)). These data show very convincingly that the trienones 43, 44 and 45 inhibited more effectively the DHT synthesis than the control sample finasteride 8. On the other hand the dienones 38-42 exhibited a lower 5 α -reductase inhibitory activity [47, 59]. Computer assisted theoretical studies carried out in our laboratory [58] indicated that the first step in the inhibition of the enzyme 5 α -reductase consists in the formation of an enzyme-steroid activated complex. In a subsequent step, the nucleophilic portion of the enzyme (amino group) adds to the conjugated double bond of the steroid in a Michael type addition reaction to form a irreversible adduct with a concomitant inhibition of the enzyme 5 α -reductase. This hypothesis explains very well the higher biological activity of the trienones 30, 31 and 43-46 as compared to the dienones 27, 32,33 and 38-42.

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 [59]. This hypothesis was corroborated very well by Petrow [60] who determined that 17 α -acetoxypregna-4,6-diene-3,20-dione 48 has a lower 5 α -reductase inhibitory activity than the corresponding exocyclic diene 47. The 6-methylene compound 47 reacts much faster with the nucleophilic portion of the enzyme to form an enzyme-steroid activated complex and thus shows a higher inhibitory activity for the enzyme 5 α -reductase.

ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully acknowledge the financial support of DGAPA and Conacyt for the projects IN 204198, G33450-M and Doctoral fellowship 86616 for EAF.

REFERENCES

- [1] Jensen, E.U.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stmuff, W.E.; Jungblat, P.W.; De Sombre, E.R. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 632.
- [2] Gorski, J.; Troft, D.O.; Shymala, G.; Smith, D.; Notides, A. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 1968, 24, 45.
- [3] Jenkins, E.P.; Anderson, S.; Imperato-Mcginley, J.; Wilson, J.D.; Russell, D. *J. Clin. Invest.*, 1992, 89, 293.
- [4] Kniewal, J.; Osredecki, V.; Gojmerac, T.; Zechner, V.; Kniewal, Z. *J. Appl. Tox.*, 1995, 15, 215.
- [5] Anderson, S.; Bishop, R.W.; Russell, D.W. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 16249.
- [6] Anderson, S.; Russell, D.W. *Procc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 3640.
- [7] Voigt, W.; Fernandez, E.O.; Hsia, S.L. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 5594.
- [8] Hsia, S.L.; Voigt, W. *J. Invest. Dermatol.*, 1974, 62, 224.
- [9] Zibo, D.A.; Dreiza, M.A.; Hsia, S.L. *J. Lip. Res.*, 1970, 11, 346.
- [10] Cabeza, M.; Diaz de León, L. *Bol. Est. Med. Biol. Mex.*, 1994, 41, 20.
- [11] Sciarra, F. *Ann. New York Acad. of Sciences*, 1995, 761, 66.
- [12] Griffiths, K.; Morton, H.S.; Nicholson R.I. *European Urology*, 1997, 3, 24.
- [13] Collins S.; Quarmby, U.E.; French, F.S.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M.G. *FEBS Lett.*, 1998, 233, 173.
- [14] Guthrie, P.D.; Freeman, M.R.; Liao, S. *Mol. Endocrinol.*, 1990, 4, 1343.
- [15] Mallamo, J.; Pilling, G.; Wetzel, J. *J. Med. Chem.*, 1991, 35, 1963.
- [16] Melander, A.; Ericson, L.E.; Sundler, F.; Westgren, U. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1975, 73, 39.
- [17] Boyle, P. World Health Organization, Trends in Prostate Cancer, 1980-1988. *Who Weekly Epidemiological Record*, 1992, 281.
- [18] Zaridze, D.G.; Boyle, P. *Brit. J. Urol.*, 1987, 59, 493.
- [19] Bary, M.J.; Beckley, S.; Boyle, P. *Proceedings of the First International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia*, 1992, 13.
- [20] Jepsen, J.V.; Bruskevitz, C. *Drugs of Today*, 1998, 34 (4), 353.
- [21] Santen, R. *Intl. J. of Andrology*, 1989, 12, 165.
- [22] Brooks, R.; Berman, C. *Prostate*, 1991, 18, 215.
- [23] Imperato-Mc Ginley, J.; Peterson, R. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1980, 50, 15.
- [24] Raynaud, J.P. *The mechanism of Action of Antihormones in Advances in Pharmacology and Therapeutics*, Jacob, E. Ed. Receptors, Pergamon Press: Oxford, 1979, Vol. 14, p.259.
- [25] Raynaud, J.P.; Azadian-Boulanger, B.; Bonne, C.; Perronet, J.; Sakis, E. *Present Trends in Antiandrogen Research in Androgens and Antiandrogens*, Martini, L.; Motta, M. Ed. Raven Press: New York, 1977, 309.
- [26] Huggins, C.; Stevens, R.E.; Hodges, C.V. *Arch. Surg.*, 1941, 43, 209.
- [27] Sutherland-Bawlings, E.A.P. *Brit. Med. J.*, 1970, 111, 643.

- [28] Brooks, J.R.; Harris, G.S.; Sandler, M.; Smither, H.J.; Eds. *Design of Enzyme Inhibition as Drugs*, vol. 2. Oxford University Press, Oxford, 1994, 495.
- [29] Bruchowsky, N.; Wilson, J.D. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 2012.
- [30] Anderson, K.M.; Liao, S. *Nature*, 1968, 219, 277.
- [31] Fang, S.; Anderson, K.M.; Liao, S. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6584.
- [32] Fang, S.; Liao, S. *Mol. Pharmacol.*, 1969, 5, 420.
- [33] Daniel, C.W.; Silverstain, G.B.; Strickland, P. *Science*, 1984, 224, 1245.
- [34] Burton, J.L.; Laschet, U.; Shuster, S. *Brit. J. Dermatology*, 1973, 89, 487.
- [35] Jagarinec, N.; Givner, M.L. *Steroids*, 1974, 23, 561.
- [36] Lerner, L.J.; Bianchi, A.; Borman, A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 103, 172.
- [37] Orestano, F.; Altwein, J.E.; Knapstein, P.; Bandhauer, K.J. *Steroid Biochem.*, 1975, 6, 845.
- [38] Saunders, H.L.; Holder, K.; Kerwin, J.F. *Steroids*, 1964, 3, 687.
- [39] Hansson, V.; Trygotad, O., et al. *Nature (London)*, 1974, 250, 387.
- [40] Boris, A.; De Martino, L.; Trimal, T. *Endocrinol.*, 1971, 88, 1086.
- [41] Chang, E.; Mittelman, A., et al. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 913.
- [42] Holt, D.A.; Levy, M.A., et al. *J. Biol. Chem.*, 1990, 33, 943.
- [43] Cooke, G.M.; Rabaire, B. *J. Steroid Biochem.*, 1986, 24, 877.
- [44] Rabaire, B.; Covey D.F., et al. *J. Steroid Biochem.*, 1977, 8, 307.
- [45] Hartruann, R.W.; Hector, M.; Haidar, S.; Ehmer, P.B.; Reichert, W.; Jose, J. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 4266.
- [46] Bratoeff, E.; Flores G.; Ramírez, E. *J. Mex. Pharm. Assoc.*, 1997, 28, 13.
- [47] Cabeza, M.; Gutiérrez, E.; Miranda, R.; Heuze, I.; Bratoeff, E.; Flores, G.; Ramírez, E. *Steroids*, 1999, 64, 413.
- [48] Cabeza, M.; Heuze, I.; Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Martínez R. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, 49(5), 525.
- [49] Hollond, H.L.; Nguyen, D.H.; Rearson, N.M. *Steroids*, 1995, 60, 46.
- [50] Cabeza, M.; Gutiérrez, E.; García, G.; Avalos, A.; Hernández, M.A. *Steroids*, 1999, 64, 379.
- [51] Adachi, K. *Invest. Dermatol.*, 1974, 62, 217.
- [52] Cabeza, M.; Vilchis, M.; Lemus, E.A.; Díaz de León, L.; Pérez-Palacios, G. *Steroids*, 1995, 60, 630.
- [53] Cabeza, M.; Miranda, R. *Steroids*, 1997, 62, 782.
- [54] Takayasu, S.; Adachi, K. *Endocrinology*, 1972, 90, 73.
- [55] Chen, C.; Puy, A.; Semards, S.M.; Labrie, F. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, 105, 678.
- [56] Bratoeff, E.; Herrera, H.; Solorzano, K.; Murillo, E.; Quiroz, A.; Cabeza, M. *Chem. Pharm. Bull.*, 2000, 48, 1249.
- [57] Bratoeff, E.; Ramirez E.; Murillo, E.; Flores, G.; Cabeza, M. *Curr. Med. Chem.*, 1999, 6, 1107.
- [58] Bratoeff, E.; Rubio, M.; Ramirez E.; Garcia, J.; Ramirez, G. *Chemistry Today*, 1998, 16, 33.
- [59] Ramirez, E.; Cabeza, M.; Heuze, I.; Gutierrez, E.; Bratoeff, E.; Membrillo, M.; Lira, A. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, in press.
- [60] Petrow, V.; Yueh-Sha W.; Lack, L. *Steroids*, 1981, 38, 121.