



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE UN NUEVO DERIVADO
ESTEROIDAL CON ACTIVIDAD
ANTIANDROGENICA POTENCIAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN QUIMICA FARMACEUTICA

P R E S E N T A :

BIOL. CESAR MATEO FLORES ORTIZ



MEXICO, D. F.

ENERO DE 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR.

PREMER VOCAL: Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA.

SECRETARIO: M. en C. JOSE MANUEL MENDEZ STIVALET.

PRIMER SUPLENTE: Dr. RAYMUNDO CRUZ.

SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. ISABEL AGUILAR LAURENTS.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO 125 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISION DE
BIOQUIMICA Y FARMACIA. FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.**

SUSTENTANTE: Biol. CESAR MATEO FLORES ORTIZ.

ASESOR: Dr. EUGENE A. BRATOEFF T.

AGRADECIMIENTOS

- **A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES**
- **AL INSTITUTO DE QUIMICA POR EL REGISTRO DE LOS ESPECTROS DE MASAS Y DE RMN**
- **AL DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA DE LA FACULTAD DE QUIMICA POR EL REGISTRO DE LOS ESPECTROS DE UV, IR Y RMN**
- **AL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA PARA REALIZAR LOS ESTUDIOS DE MAESTRIA**
- **A LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) POR LOS RECURSOS OTORGADOS A TRAVES DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACION E INOVACION TECNOLOGICA (PAPIIT 95) IN 205295.**
- **A MIS AMIGOS:**
DANIEL CHAVEZ. GREGORIA FLORES. JOSE M. PANTING.
REMEDIOS SANCHEZ. ELENA RAMIREZ.
- **AL M. en C. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO POR HABER BRINDADO TODA CLASE DE FACILIDADES.**
- **ESPECIALMENTE AL Dr. EUGENE A. BRATOEFF T. POR SU CONFIANZA E INAGOTABLE PACIENCIA**

DEDICATORIA

CON TODO MI CARIÑO A:

NORMA CAROLINA SANCHEZ ARANDA

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	III
LISTA DE ESQUEMAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE ESPECTROS	VI
ANDROGENOS	1
ANTECEDENTES DE ANTIANDROGENOS	5
OBJETIVOS	21
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	22
EVALUACION FARMACOLOGICA	33
CONCLUSIONES	35
APENDICE A. PARTE EXPERIMENTAL	36
DETERMINACION DE CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS	36
METODOS DE SINTESIS, AISLAMIENTO Y PURIFICACION	37
CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE 5 α -REDUCTASA	48
APENDICE B. ESPECTROSCOPIA	49
REFERENCIAS	77

RESUMEN

COMO PARTE DE UN PROYECTO DE DISEÑO Y SINTESIS DE DERIVADOS DEL PREGNANO CON ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA POTENCIAL, SE REALIZO LA SINTESIS DEL COMPUESTO ESTEROIDAL NUEVO: 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.

PARA LA SINTESIS DE ESTE COMPUESTO, SE PARTIO DEL ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA Y SE TRANSFORMO A TRAVES DE UN RUTA DE SINTESIS LINEAL CON UN TOTAL DE NUEVE PASOS DE SINTESIS, DANDO UN RENDIMIENTO NETO DE 6.21%. EL COMPUESTO NUEVO OBTENIDO XXXII PRESENTA LAS FUNCIONES QUIMICAS QUE SE HAN RECONOCIDO COMO POTENCIADORAS DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA: UN ESTER VOLUMINOSO EN C-17 α ; SISTEMA 4,6-PREGNADIEN-3-ONA; UN HALOGENO EN C-6 Y UN METILO EN C-16 β .

EL COMPUESTO SINTETIZADO SE VALORO COMO ANTIANDROGENO POTENCIAL, UTILIZANDO COMO INDICE DE ACTIVIDAD, LA INHIBICION DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA. EN EXTRACTO DE TESTICULOS EL COMPUESTO NUEVO XXXII INHIBIO EN 68.34%, MIENTRAS QUE EL ACETATO DE CIPROTERONA REGISTRO 56.6% DE INHIBICION. EL COMPUESTO NUEVO XXXII MOSTRO MAYOR ACTIVIDAD QUE EL ESTANDAR Y EN EL FUTURO UNA EVALUACION FARMACOLOGICA MAS DETALLADA SE REALIZARA EN RATAS.

EN ADICION A LO ANTERIOR, SE REGISTRO LA ACTIVIDAD DE ALGUNOS DE LOS INTERMEDIARIOS DE LA SINTESIS DE COMPUESTO NUEVO, ENCONTRANDO QUE LA PRESENCIA DEL ESTER EN C-17 α ASI COMO LA SUSTITUCION CON EL BROMO EN C-6, AUMENTAN CONSIDERABLEMENTE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA. EN CONTRASTE LA PRESENCIA DEL EPOXIDO EN C6 α -C7 α (COMPUESTO XXXI) LA DISMINUYE TOTALMENTE.

ABSTRACT

As a part of a project related to the synthesis of pregnane derivatives with a potential antiandrogenic activity, a new steroidal derivative 6-bromo-17 α -butyryloxy-16 β -methyl-4,6-pregnadien-3,20-dione XXXII was prepared.

16-dehydropregnenolone acetate was used as starting material for this synthesis. The designed compound XXXII was obtained with a yield of 6.21%. This compound contains the necessary functional groups required for high antiandrogenic activity (a bulky ester in C-17 α , 4,6-pregnadien-3,20 dione moiety, a halogen atom at C-6 and β methyl group at C-16).

This compound was evaluated as antiandrogen, measuring its inhibitory activity on the enzyme 5- α -reductase. In the rat testicular extract, compound XXXII exhibited 68.34% activity, whereas the standard (cyproterone acetate) showed 56.6% of inhibitory activity. The new compound XXXII showed higher activity than the standard compound and in the future its pharmacological evaluation will be amplified with wistar rats.

In addition several intermediate compounds were also evaluated. It was shown that the presence of an ester group at C-17 and a halogen atom at C-6 is associated with a high antiandrogenic activity. On the other hand, the epoxy compound (XXXI) was completely inactive.

ABREVIATURAS

ACTH	HORMONA CORTICOTROPINA.
CCF	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.
Cit-P-450	CITOCROMO P-450.
¹³CRMN	RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO 13
D₂O	AGUA DEUTERADA.
DHT	4,5-DIHIOTESTOSTERONA.
DMF	DIMETIL FORMAMIDA.
DMSO	DIMETILSULFOXIDO.
DPA	ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA.
d	DOBLETE.
δ	DESPLAZAMIENTO QUIMICO.
ENZ	ENZIMA.
¹HRMN	RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA.
IR	INFRARROJO.
LH	HORMONA LUTEINIZANTE.
LHRH	HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANE.
λ_{max}	LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORBANCIA.
M+1	PESO MOLECULAR MAS 1.
m	MULTIPLETE.
MCPBA	ACIDO METACLOROPERBENZOICO.
NADPH	NICOTIN ADENIN DINUCLEOTIDO FOSFATO FORMA REDUCIDA.
pf	PUNTO DE FUSION.
PM	PESO MOLECULAR
ppm	PARTES POR MILLON.
pTSA	ACIDO PARATOLUEN SULFONICO.
RER	RETICULO ENDOPLASMICO RUGOSO.
s	SINGULETE.
SNC	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.
Tris	TRIS HIDROXIMETIL AMINOMETANO.
TMS	TRIMETIL SILICIO.
UV	ULTRAVIOLETA.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA	DESCRIPCION	PAGINA
ESQUEMA 1.-	DIAGRAMA INTEGRAL DEL EFECTO ANDROGENICO.	1
ESQUEMA 6.-	ANTIANDROGENOS ESTEROIDALES.	9
ESQUEMA 7.-	ANTIANDROGENOS NO ESTEROIDALES.	10
ESQUEMA 8.-	RUTA GENERAL DE SINTESIS.	23

LISTA DE TABLAS

TABLA No.		PAGINA
TABLA 1.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DE LA MATERIA PRIMA XXIII	37
TABLA 2.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPESTO XXIV	38
TABLA 3.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPESTO XXV	39
TABLA 4.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO CETAL XXVI.	40
TABLA 5.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO METILADO XXVII	41
TABLA 6.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO HIDROLIZADO XXVIII	42
TABLA 7.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO OXIDADO XXIX	43
TABLA 8.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO BUTIRATO XXX	44
TABLA 9.-	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO EXPOXIBUTIRATO XXXI	45
TABLA 10	PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO FINAL XXXII	46
TABLA 11.-	ASIGNACIONES DE DESPLAZAMIENTO QUIMICO DEL COMPUESTO FINAL EN ¹³CRMN	47

LISTA DE ESPECTROS

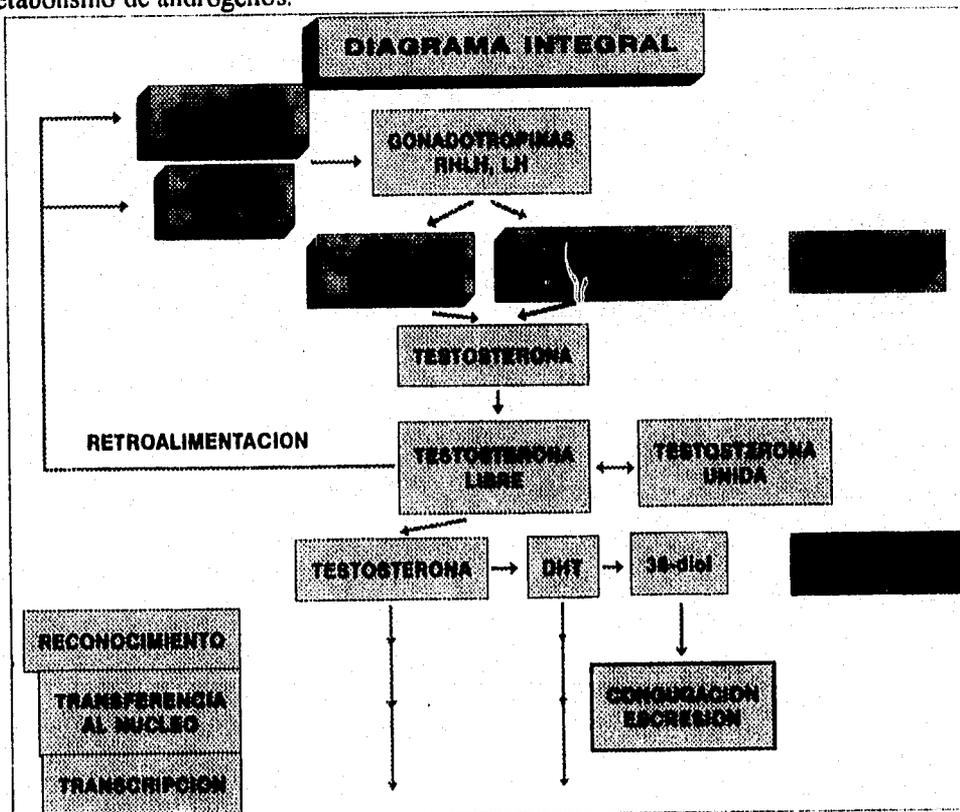
ESPECTRO 1.-	ESPECTRO DE UV DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA XXIII	49
ESPECTRO 2.-	ESPECTRO DE IR DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA XXIII	50
ESPECTRO 3.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA XXIII	51
ESPECTRO 4.-	ESPECTRO DE IR DE 16 α -17 α -EPOXI-3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA XXIV	52
ESPECTRO 5.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 16 α -17 α -EPOXI-3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA XXIV	53
ESPECTRO 6.-	ESPECTRO DE IR DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-5-PREGNEN-20-ONA XXV	54
ESPECTRO 7.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-5-PREGNEN-20-ONA XXV	55
ESPECTRO 8.-	ESPECTRO DE IR DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-5-PREGNEN-20-ETILENDIOXI XXVI	56
ESPECTRO 9.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-5-PREGNEN-20-ETILENDIOXI XXVI	57
ESPECTRO 10.-	ESPECTRO DE IR DE 20-ETIELENDIOXI-3 β ,17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNENO XXVII	58
ESPECTRO 11.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 20-ETIELENDIOXI-3 β ,17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNENO XXVII	59
ESPECTRO 12.-	ESPECTRO DE IR DE 3 β ,17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNEN-3,20-DIONA XXVIII	60
ESPECTRO 13.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 3 β ,17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNEN-3, 20-DIONA XXVIII	61
ESPECTRO 14.-	ESPECTRO DE UV DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX	62

ESPECTRO 15.-	ESPECTRO DE IR DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX	63
ESPECTRO 16.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX	64
ESPECTRO 17.-	ESPECTRO DE UV DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX	65
ESPECTRO 18.-	ESPECTRO DE IR DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX	66
ESPECTRO 19.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX	67
ESPECTRO 20.-	ESPECTRO DE UV DE 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METIL-4-PREGNEN-3-ONA XXXI	68
ESPECTRO 21.-	ESPECTRO DE IR DE 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METIL-4-PREGNEN-3-ONA XXXI	69
ESPECTRO 22.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METIL-4-PREGNEN-3-ONA XXXI	70
ESPECTRO 23.-	ESPECTRO DE UV DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	71
ESPECTRO 24.-	ESPECTRO DE IR DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	72
ESPECTRO 25.-	ESPECTRO DE ¹ HRMN DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	73
ESPECTRO 26.-	ESPECTRO DE ¹³ CRMN DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	74
ESPECTRO 27.-	ESPECTRO DE DEPT DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	75
ESPECTRO 28.-	ESPECTRO DE MASA CON IONIZACION QUIMICA DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,30-DIONA XXXI	76

ANDRÓGENOS

Los andrógenos son esteroides que regulan las características más importantes de fisiología y comportamiento sexual en varones (Gower D. 1984), estos tienen tres efectos principales: regulan la función de la próstata y las vesículas seminales; actúan como anabólicos y son responsables de la expresión de caracteres sexuales secundarios.

En el esquema 1 se puede observar un diagrama integral, donde se resume este fenómeno endocrinológico androgénico. Aquí se indican los cuatro elementos principales involucrados en la inducción y regulación del efecto androgénico: regulación de secreción de gonadotropinas, inducción de biosíntesis de testosterona, regulación de expresión genética y metabolismo de andrógenos.



Esquema 1. Diagrama integral del efecto androgénico. En esta relación global están contemplados los cuatro elementos del fenómeno: Regulación de secreción de gonadotropinas; Inducción de biosíntesis; Inducción de expresión genética, y metabolismo.

El diagrama anterior describe el proceso integral, el cual contempla mecanismos de control y que, en condiciones normales transcurre en un delicado equilibrio entre todos los factores; sin embargo, son frecuentes los casos patológicos donde los elementos de regulación se encuentran alterados, ya sea porque los niveles androgénicos son anormales, o porque la sensibilidad de los tejidos blanco está alterada a causa del cambio de afinidad de los receptores involucrados; o bien alteraciones en el transporte en la sangre y de la sangre a los tejidos. (Biffignandi P.*et.al.* 1987).

Los desordenes patológicos relacionados con antiandrógenos se clasifican en dos: baja cantidad de andrógenos (hipoandrogenismo), o altas cantidades (hiperandrogenismo). Todos los trastornos hipoandrogénicos reconocidos involucran en común deficiencias en la espermatogénesis, producción de andrógenos o ambas cosas. Las características clínicas en estos casos varían ampliamente dependiendo del tiempo de la enfermedad (Brooks, R 1984). Los síndromes más comunes son:

Síndrome de Klinefelter.- Es el tipo de hipogonadismo más común en los hombres y el cual se caracteriza por un cromosoma X extra en los tejidos de túbulos seminíferos y células de Leydig . Las características clínicas incluyen bajo peso testicular, azospermia y grados variables de enucoidismo, ginecomastia y anormalidades mentales. Además es común observar niveles normales de LH, mientras que la concentración de testosterona es invariablemente baja .

Anorchia.- Es una condición de falta de funcionalidad testicular, y aunque los pacientes tienen fenotipos masculinos, la enfermedad se hace evidente entre los 14 y 17 años, donde los cambios característicos de la pubertad no se llevan a cabo, e igual que en el caso anterior, los niveles de LH son normales mientras que la concentración de testosterona es baja.

Aplasia de células germinales.- En estos casos está afectada la espermatogénesis y debe a la falta del epitelio germinal, como lo demuestran las biopsias testiculares, en las cuales solo se pueden observar células de Sertoli con pequeños túbulos .

Por otro lado, los trastornos caracterizados con altos niveles de andrógenos (hiperandrogenismo), se han asociado con diferentes desordenes fisiológicos que se clasifican de la siguiente forma (Raynaud J. *et al* 1987):

Acné.- Es una condición crónica de las unidades pilosebáceas caracterizadas principalmente por la presencia de comedones y secundariamente por la inflamación de papulas, pústulas y cistitis. La razón de esta asociación con andrógenos, es porque el acné se ha inducido por la administración exógena de testosterona (Green M. *et al* 1983).

Hirsutismo.- Las patologías asociadas con andrógenos son una condición que está lejos de ser exclusiva del género masculino, como lo demuestra el porcentaje de 3%, de mujeres que padecen hirsutismo e hirsutismo idiopático, (Brooks R. 1984), las cuales son enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo de vello en lugares anatómicos donde éste debería corresponder a una característica sexual secundaria; además, el hiperandrogenismo en mujeres también se ha involucrado con acné, oligomenorrea, virilismo y cistitis ovárica.

Pubertad precoz.- La secreción precoz de andrógenos en niños puede ser causa de tumores en la corteza adrenal y las células intersticiales de los testículos (Brooks R. 1984).

Cáncer prostático.- Es un padecimiento hiperplásico en el cual existe un crecimiento anormalmente alto del peso de la próstata caracterizado por la hipertrofia de los tejidos de esta glándula en la cual actividades enzimáticas como fosfatasa ácida y cantidad de

Aplasia de células germinales.- En estos casos está afectada la espermatogénesis y debe a la falta del epitelio germinal, como lo demuestran las biopsias testiculares, en las cuales solo se pueden observar células de Sertoli con pequeños túbulos .

Por otro lado, los trastornos caracterizados con altos niveles de andrógenos (hiperandrogenismo), se han asociado con diferentes desordenes fisiológicos que se clasifican de la siguiente forma (Raynaud J. *et al* 1987):

Acné.- Es una condición crónica de las unidades pilosebáceas caracterizadas principalmente por la presencia de comedones y secundariamente por la inflamación de papulas, pústulas y cistitis. La razón de esta asociación con andrógenos, es porque el acné se ha inducido por la administración exógena de testosterona (Green M. *et al* 1983).

Hirsutismo.- Las patologías asociadas con andrógenos son una condición que está lejos de ser exclusiva del género masculino, como lo demuestra el porcentaje de 3%, de mujeres que padecen hirsutismo e hirsutismo idiopático, (Brooks R. 1984), las cuales son enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo de vello en lugares anatómicos donde éste debería corresponder a una característica sexual secundaria; además, el hiperandrogenismo en mujeres también se ha involucrado con acné, oligomenorrea, virilismo y cistitis ovárica.

Pubertad precoz.- La secreción precoz de andrógenos en niños puede ser causa de tumores en la corteza adrenal y las células intersticiales de los testículos (Brooks R. 1984).

Cáncer prostático.- Es un padecimiento hiperplásico en el cual existe un crecimiento anormalmente alto del peso de la próstata caracterizado por la hipertrofia de los tejidos de esta glándula en la cual actividades enzimáticas como fosfatasa ácida y cantidad de

colesterol están aumentadas. La enfermedad puede tener un curso de cáncer maligno con procesos de metástasis y diseminación sistémica que eventualmente conducen a la muerte. (Murphy G. 1985).

El cáncer prostático y la hiperplasia prostática son los padecimientos más comunes en hombres de edad avanzada (60 a 70 años). (Murphy G. 1985). Anualmente se registran alrededor de 100,000 casos y 26,000 muertes por este mal en Estados Unidos. (Mallamo J. *et al* 1972; Labrie C. *et al* 1991). Como consecuencia de esto, la prostatectomía ocupa el segundo lugar entre las cirugías practicadas en hombres de edad avanzada, practicándose cerca de 400,000 anualmente y debe suponerse que epidemiológicamente, estos datos representan solo del 20 al 25% de pacientes que exhiben los síntomas.

Aún, cuando la prostatectomía es un tratamiento aceptable para este mal, se deben contemplar los riesgos inherentes a las intervenciones quirúrgicas en pacientes mayores de edad, en los cuales, comúnmente se presentan enfermedades crónicas como: diabetes e hipertensión, que aumentan los riesgos de la cirugía; y hay que considerar que es una enfermedad recurrente (Mallamo J. *et al* 1972), por lo cual se justifican los esfuerzos realizados en el diseño y síntesis de compuestos útiles en la terapéutica de esta enfermedad.

ANTECEDENTES DE ANTIANDROGENOS

El cancer prostático representa un problema importante de salud en vista la alta incidencia que se observa. En este trabajo se llevó a cabo el diseño y síntesis de fármacos de naturaleza esteroidal con actividad antiandrogénica potencial. Tomando como base: los estudios de relación estructura actividad previamente descritos en la literatura; el mecanismo bioquímico de la acción de los andrógenos y antiandrógenos; y las actividades antiandrogénicas de fármacos previamente diseñados y sintetizados en el laboratorio donde se realizó este trabajo, se delinearon los requerimientos estructurales que un derivado del pregnano debe contener para que presente actividad antiandrogénica potencial.

La terapéutica de los padecimientos asociados con hiperandrogenismo, ha evolucionado de acuerdo a numerosos tratamientos que se han implementado, los cuales se pueden clasificar en: endocrinológicos y no endocrinológicos (Murphy G. 1985). Por un lado se puede mencionar que para el hirsutismo en mujeres, se han desarrollado tratamientos cosméticos que consisten en lavados con solución de H_2O_2 , depilación, cremas humectantes, electrocoagulación, electrólisis y terapias láser; sin embargo, siempre son de eficacia efímera e implican tortuosas sesiones terapéuticas. (Biffignandi P. 1987). Por otro lado, el cáncer prostático tiene su alternativa quirúrgica a través de la prostatectomía, desafortunadamente el éxito de la cirugía depende del avance que tenga la enfermedad y cerca del 50% de los casos registran recurrencia con metástasis diseminada, (Murphy G. 1985), lo cual hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento de estas enfermedades con la premisa de que un padecimiento hormonal debe ser tratado hormonalmente .

En consideración de lo antes expuesto, se han desarrollado una amplia gama de fármacos útiles para estos padecimientos, los cuales genéricamente se han clasificado como antiandrógenos. Por convención la definición aceptada de antiandrógenos es: " Los antiandrógenos puros son sustancias que previenen la expresión de los andrógenos en sus

tejidos blanco. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de estas sustancias debe diferenciarse de aquellos compuestos que disminuyen la síntesis o liberación de gonadotropinas del hipotálamo y la hipófisis anterior, o de aquellas que actúan directamente en las gónadas inhibiendo la biosíntesis o secreción de andrógenos ".

El diseño de antiandrógenos apropiados, se debe basar en una comprensión integral de la fisiología de los procesos bioquímicos involucrados en la enfermedad, así como métodos fieles de diagnóstico para la valoración del potencial antiandrogénico (Raynaud J. *et al* 1987).

Los principales objetivos metabólicos-moleculares que han conducido al diseño de antiandrógenos son (Mallamo J. *et al* 1972):

- Inhibición de la producción de LHRH por agonistas.**
- Inhibición de la conversión de testosterona a DHT por inhibidores de 5- α -reductasa.**
- Inhibición de andrógenos por inhibidores competitivos del receptor antiandrogénico.**
- Inhibición de la conversión de andrógenos a estrógenos por la inhibición de la aromatasa.**
- Relajación del musculo urogenital liso por antagonistas alfa adrenérgicos .**

Teniendo en mente los posibles puntos de acción de antiandrógenos se han desarrollado numerosos fármacos de origen esteroidal y no esteroidal que muestran una variada gama de efectos antiandrogénicos y efectos laterales de acuerdo al punto donde actúan y al mecanismo de acción del cual se sirven para antagonizar a los andrógenos. A continuación se enlistan estos fármacos clasificándolos en esteroidales y no esteroidales y sus estructuras se pueden observar en los esquemas 2 y 3 respectivamente.

ESTEROIDALES.

BOMT I (página 9).- Antagonista androgénico que actúa a nivel de la retroalimentación negativa de testosterona en SNC, exhibiendo imperceptibles actividades androgénicas estrogénicas y progestionales; sin embargo, tiene actividad antiandrogénica baja. (Clark C y Nowell N. 1979).

OXENDOLONA II (página 9).- Es un potente agente antiandrogénico con baja toxicidad en humanos y eficaz en el tratamiento de la hipertrofia prostática (Midgley A. y Fowkes.G. 1983).

EPITESTOSTERONA III (página 9).- Es el epímero de la testosterona. Se ha encontrado que inhibe significativamente la 5- α -reductasa (Stárka, L.; *et al* 1991).

SULFONILPIRAZOLANDROSTANO IV (página 9).- Demostró tener afinidad por el receptor de DHT y disminuir el crecimiento de la próstata inducido por testosterona (Christiansen R. y Bell M. 1990).

DES-A-ANDROSTANO V (página 9).- Exhibe una alta actividad antiandrogénica sin significativos efectos sistémicos. Se ha encontrado que interacciona con el receptor androgénico (Green M. *et al* 1983).

ESPIRONOLACTONA VI (página 9).- El descubrimiento de su actividad antiandrogénica se hizo en tratamientos crónicos de hipertensión, provocando cuadros característicos de ginecomastia (Biffignandi P. *et al* 1987).

BENCILSULFONILANDROSTANO VII (página 9).- Demostró inhibir la síntesis en glándulas sebáceas después de aplicación tópica, sin mostrar efectos colaterales adversos (Green M. *et al* 1983).

PROSCAR VIII (página 9).- Antiandrógeno que se ha caracterizado como inhibidor de la 5- α - reductasa (Merck & Co. 1992).

MEDROGESTRONA IX (página 9).- Inhibe la conversión de testosterona a DHT así como la síntesis de testosterona y progesterona.

CLORMADINONA X (página 9).- Potente antiandrógeno que se ha encontrado inhibe el crecimiento hiperplásico de la próstata (Honna S. *et al* 1977), así mismo sus derivados 2-oxo **XI** (página 9) y 2-aza **XII** (página 9) han mostrado actividad antiandrogénica elevada contra el aumento del tamaño de la próstata y vesículas seminales.

ACETATO DE CIPROTERONA XIII (página 9).- Antiandrógeno con actividad progestional parcial que ha demostrado reducción de LH plasmática (Clark C. y Nowell N. 1979), así como competencia por el receptor de DHT (Traish A; Muller E y Wotiz H. 1985), disminuyendo el crecimiento de la próstata e inhibiendo la 5- α -reductasa.

NO ESTEROIDALES

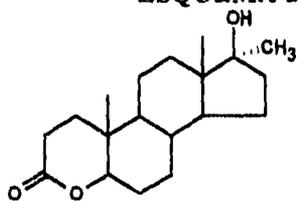
FLUTAMIDA XIV (página 10).- Se reconoce como un antiandrógeno puro que inhibe el reconocimiento de andrógenos por sus receptores sin efectos hormonales colaterales (Christiansen R. y Bell M. 1990), así mismo se ha reconocido que su metabolito hidroxilado **HIDROXIFLUTAMIDA XV** (página 10) es un 20% más activo que su precursor. Se ha relacionado la actividad de flutamida como en efecto desacoplante similar al del 2,4-dinitrofenol, potente desacoplante de la respiración mitocondrial.

ANANDRON XVI (página 10).- Se reconoce como un agonista androgénico parcial (Wakeling A. 1987).

DIETILESTILBESTROL XVII (página 10).- Es un agente estrogénico que disminuye la testosterona libre en plasma vía la proteína fijadora de testosterona y estradiol (Usui T. *et al* 1987).

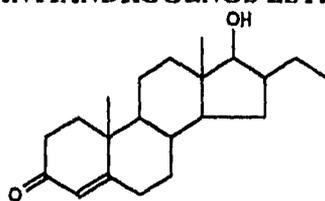
KETOCONAZOL XVIII (página 10).- Agente antifúngico que ha demostrado efectos antiandrogénicos en tratamientos de micosis crónicas, se sabe que es un inhibidor de la enzima citocromo P-450 (Eil C. 1992).

ESQUEMA 2. ANTIANDROGENOS ESTEROIDALES

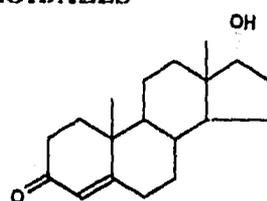


Br

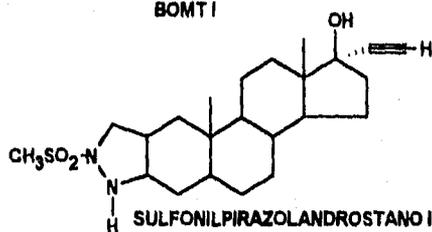
BOMT I



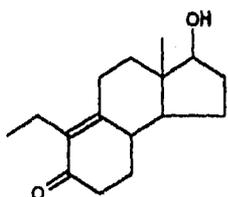
OXENDOLONA II



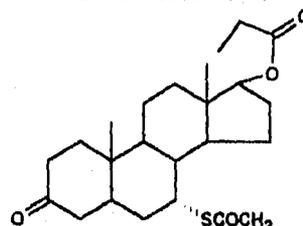
EPITESTOSTERONA III



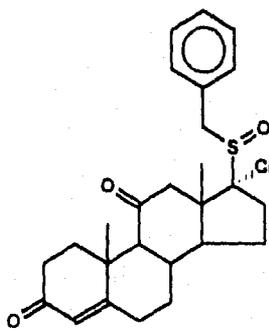
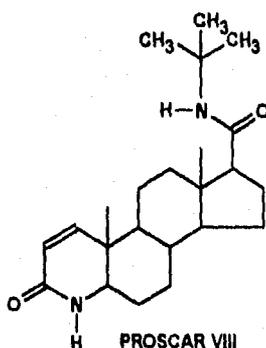
SULFONILPIRAZOLANDROSTANO IV



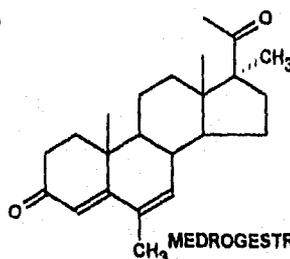
DES-A-ANDROSTANO V



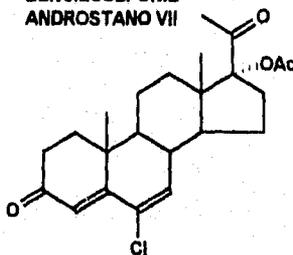
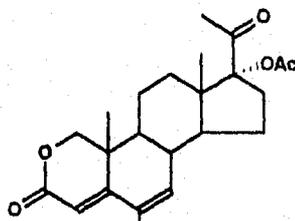
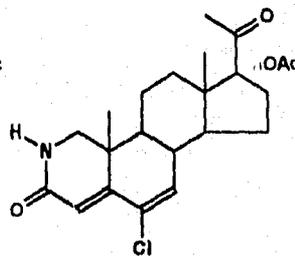
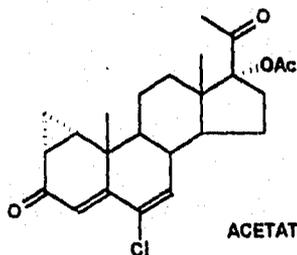
ESPIRONOLACTONA VI

BENCILSULFONIL
ANDROSTANO VII

PROSCAR VIII

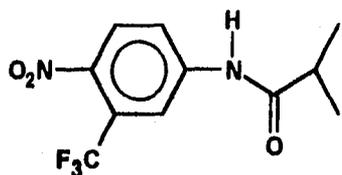


MEDROGESTRONA IX

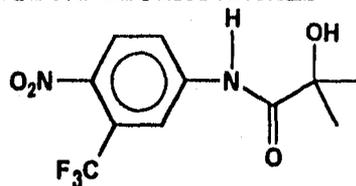
ACETATO DE
CLORMADINONA XACETATO DE 2-OXO-
CLORMADINONA XIACETATO DE 2-AZA-
CLORMADINONA XII

ACETATO DE CIPROTERONA XIII

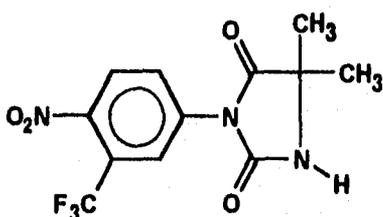
ESQUEMA 3. ANTIANDROGENOS NO ESTEROIDALES



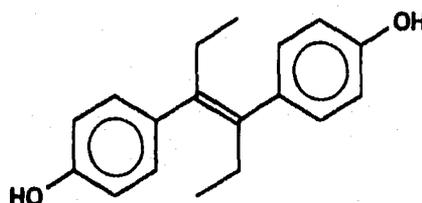
FLUTAMIDA XIV



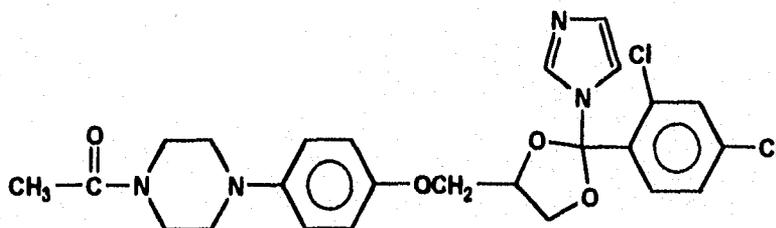
HIDROXIFLUTAMIDA XV



ANDRONON XVI



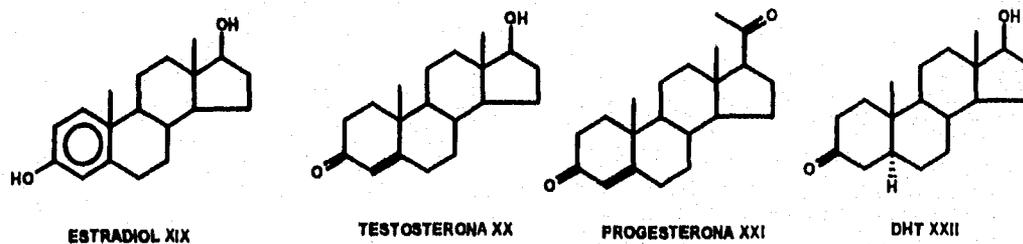
DIETILESTILBESTROL XVII



KETOCONAZOL XVIII

La amplia gama de compuestos mencionados no debe confundirse con un esfuerzo inútil de redundancia sobre el mismo aspecto, sino más bien, la diversidad de compuestos utilizados ha estado determinada por el matiz particular de cada variante del hiperandrogenismo, del grado de avance de la enfermedad, la vía de administración, las contraindicaciones de su utilización y los efectos colaterales nocivos de cada fármaco. Particularmente este último punto es el factor que estimula el esfuerzo por la búsqueda de nuevos fármacos con mayor potencia antiandrogénica y menor efecto colateral posible.

Entre los efectos nocivos que reducen la utilidad clínica de antiandrógenos, se han evaluado los que se pueden presentar a corto y largo plazo, y a todos los niveles fisiológicos que van desde comportamiento sexual, hasta anormalidades hormonales y atrofia celular. Por ejemplo entre los tratamientos del cáncer de la próstata la utilización de estrógenos como estradiol **XIX** (página 11) o dietilestilbestrol **XVII** (página 10) fueron las opciones durante un tiempo, sin embargo se necesitan dosis altas para disminuir los niveles de LH en plasma y se ha observado que tales dosis de estrógenos aceleran las tasas de muerte vascular, además de producir ginecomastia, retención de fluidos, náuseas y fallas cardíacas. Por su parte la espironolactona **VI** (página 9) en tratamientos crónicos se ha observado que llega a producir ginecomastia, pérdida de la libido, impotencia, anormalidades en el semen e irregularidades menstruales (Biffignandi P. *et al* 1987).



Por otro lado, tratamiento con antiandrógenos no esteroideos como ketoconazol **XVIII** (página 10), ha mostrado tener serios efectos hepatotóxicos (Eil C. 1992). Mientras que la flutamida **XIV** (página 10) llega a producir náuseas severas, además de esto, su propiedad de antiandrógeno puro no le permite interactuar con el ciclo de retroalimentación negativa por testosterona y por lo tanto no tiene utilidad en pacientes que no han sido objeto de la prostatectomía (Neumann F. y Shenck B. 1976; Donn F. y Becker H. 1989; Mukherjee M. *et al* 1992).

En relación a los efectos colaterales nocivos producidos por el acetato de ciproterona **XIII** (página 9) se sabe que mantiene actividad progestional parcial y es débilmente androgénico (Shibata K.1992), además de que en tratamientos prolongados llega a provocar atrofas celulares en la forma y disposición de RER y dilatación del aparato de Golgi, (Migally N. 1981; Migally N. 1982), disminuye la libido, provoca impotencia sexual y produce regresión de las características sexuales secundarias.

En virtud de la limitada utilidad clínica de varias de las opciones disponibles de antiandrógenos, se hace necesario el estudio de nuevas alternativas que en general disminuyan al máximo los efectos colaterales del fármaco, y que expresen mayor potencia antiandrogénica.

La toma de decisiones acerca del diseño de fármacos nuevos con actividad antiandrogénica, se basó en los siguientes factores: las correlaciones estructura actividad descritas previamente, el mecanismo de acción del fármaco; el metabolismo reportado para fármacos con homologas estructurales y una relación estructura actividad establecida empíricamente en el laboratorio donde se llevó a cabo este proyecto.

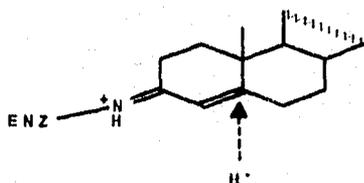
En primer lugar, acerca de los requerimientos estructurales que una molécula esteroideal debe cumplir para mostrar actividad antiandrogénica potencial, es prudente observar el esquema 2, donde están agrupados los antiandrógenos esteroidales más importantes. La primera aproximación que se puede realizar, es una clasificación superficial de estos, en derivados de la testosterona (androstanos) y por otro lado derivados de la progesterona (pregnanos), esta conclusión no es casual, ya que se ha reconocido sin lugar a dudas la actividad antiandrogénica de la progesterona, por lo tanto la estrategia en estos dos grupos fue la obtención de derivados de la testosterona que puedan antagonizar el efecto de ésta por

competencia con su receptor, mientras que en los derivados del pregnano la intención es aumentar la actividad antiandrogénica y disminuir al máximo la actividad progestional .

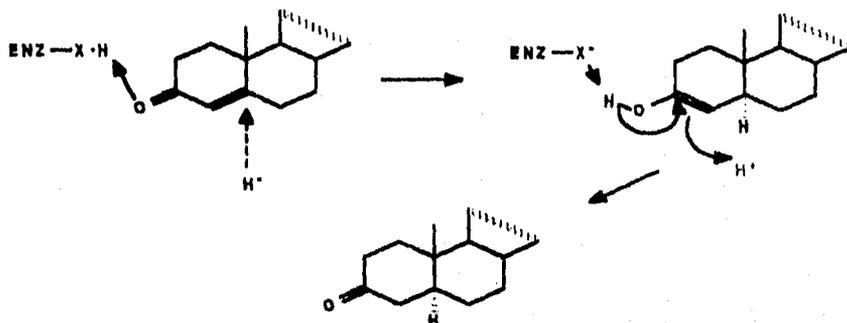
Esta dualidad aparente de la progesterona **XXI** (página 11) puede ser resultado de un traslape o falta de especificidad del receptor progestional y androgénico debido a la homología del sistema 4-en-3-ona en ambas hormonas (Wakeling A. 1987). Además siendo la progesterona **XXI** precursor inicial de la biosíntesis de otros esteroides con actividad biológica como: andrógenos, estrógenos y corticoides, parece razonable pensar en efectos combinados como resultado de su metabolismo. Finalmente la progesterona **XXI** es un buen punto de partida, dado que la actividad progestional de ésta se puede manipular fácilmente como se ha demostrado (Deghenghi R. et al 1963), ya que mientras que cambios drásticos en la estereoquímica de la molécula, como el caso de la retroprogesterona le permite mantener su actividad, la simple introducción de un hidroxilo la disminuye drásticamente.

La principal asociación que se a hecho de la progesterona **XXI** con su actividad antiandrogénica se explica por la inhibición de la 5- α -reductasa, enzima que cataliza la formación de DHT **XXII** (página 11) que es un andrógeno más potente que la testosterona **XX** (página 11) (Tymoczko J. y Liao S. 1976)

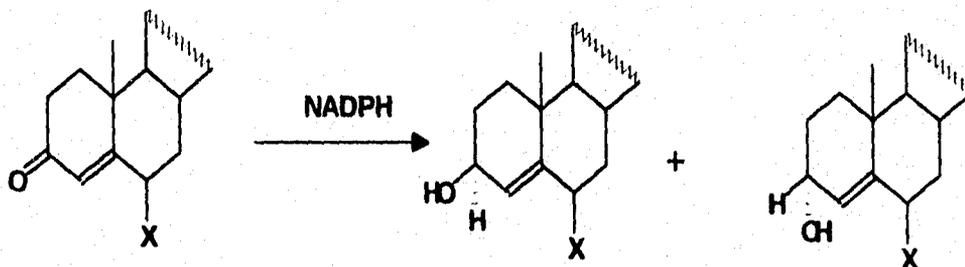
Existen dos mecanismos propuestos para la reducción enzimática de la testosterona por la 5- α -reductasa, el primero de los cuales transcurre por la formación de una base de Schiff y la posterior formación de la imina por parte de un amino libre de la 5- α -reductasa, de ésta forma se polariza más el doble enlace en C-4 para facilitar la aproximación del hidruro en C-5- α .



La segunda propuesta para la reacción es la protonación inicial del carbonilo en C-3 y la polarización de la cetona conjugada que facilita la transferencia del hidruro en C-5- α .

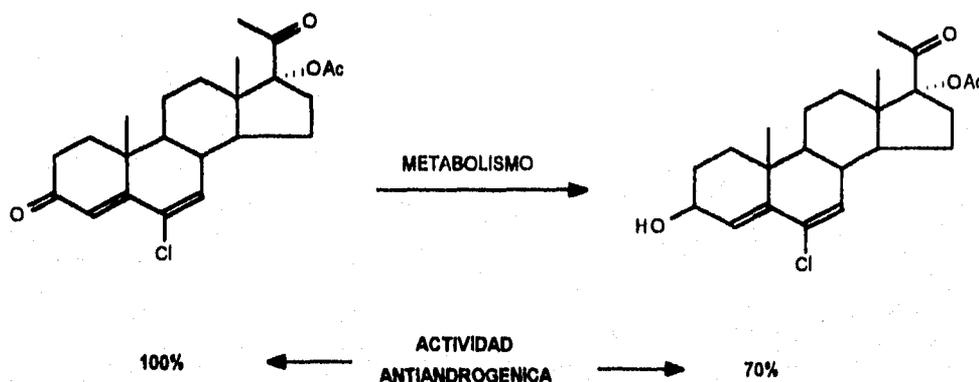


Estudios del efecto electrónico de sustituyentes halógenos en C-6 (Tymoczko J. y Liao S. 1976), han demostrado que la reducción de 4-en-3-cetoesteroides descrita antes, no transcurre normalmente en presencia de halógenos, ya que la introducción de estos en C-6 interfiere con la resonancia usual de la cetona alfa-beta insaturada, desestabilizando la molécula y disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro, que en este ambiente electrónico, da lugar preferentemente al alcohol alílico en posición beta



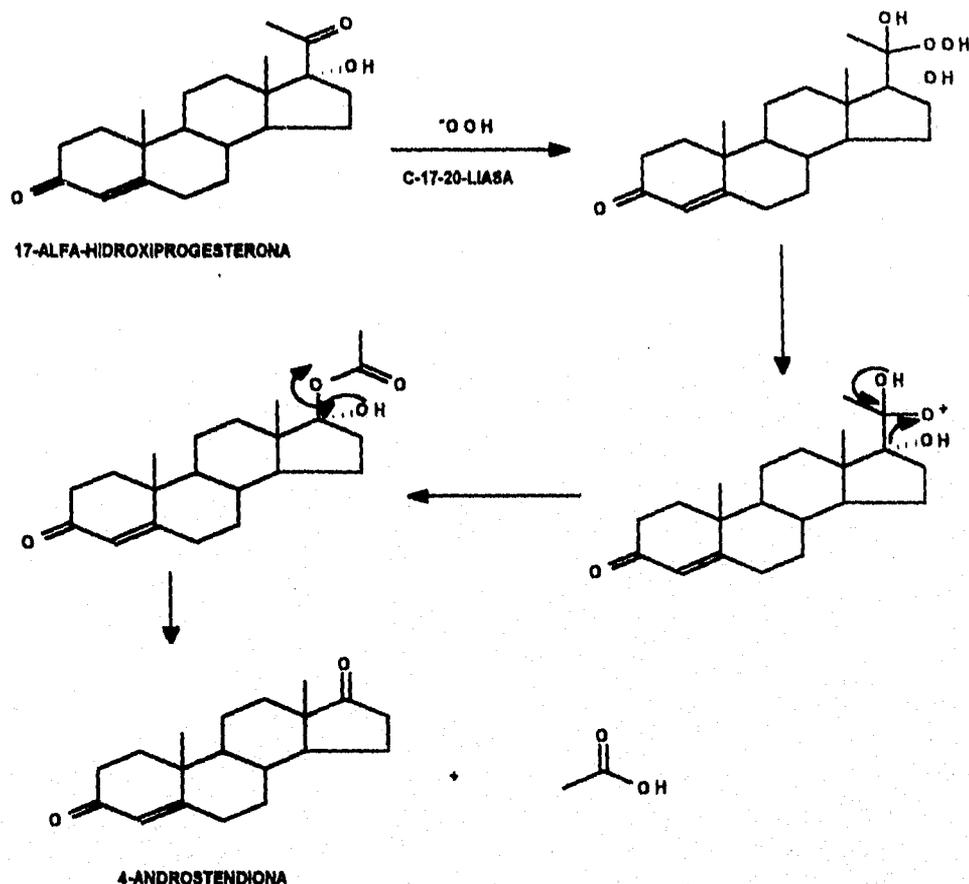
Por otro lado se ha caracterizado que la insaturación en C-6 confiere resistencia al metabolismo de la progesterona **XXI** (página 11), probablemente inhibiendo la hidroxilación en C-6 (Cooke B. y Vallance D. 1965). Además de que combinaciones 4,6-dien-6-halo-3-cetopregnanos también eliminan la posibilidad de la formación del metabolito 5- α -reducido,

como se estableció de los metabolitos principales de la clormadinona **X**, donde se forma el alcohol alílico en C-3, que lejos de representar un riesgo de ser precursor androgenico, mantiene el 70% de la actividad antiandrogénica (Honma S. *et al* 1977).



En adición a los resultados anteriores (Shapiro E. 1972), se ha descrito que las características del halógeno en C-6 determina cambios en la actividad antiandrogénica, encontrando que con la serie H, Br, F, y Cl, se obtienen 81, 73, 46 y 31% respectivamente siendo el 100% el peso de la próstata inducida por testosterona **XX** (página 11). Este efecto antiandrogénico registrado por sistemas 4,6-dien-6-halo-3-cetopregnanos se ha explicado por la unión débil del compuesto con el receptor androgénico (Raynaud J. 1982), lo cual es una ventaja ya que uniones estables conducirían a efectos androgénicos mientras, que uniones débiles implican solo una inhibición competitiva.

En relación al metabolismo que sufre la progesterona **XXI** (página 11) en la cadena lateral, se ha descrito el mecanismo de la reacción catalizada por la enzima C-17-C-20-liasa, que contiene en su sitio activo al citocromo P-450 (Grower D. 1984). En esta reacción que conduce eventualmente a la síntesis de testosterona **XX** (página 11) a partir de la progesterona **XXI**, es necesaria la previa hidroxilación y la reducción del carbonilo en C-20 para la posterior ruptura del enlace C-17-C-20 mediante el siguiente mecanismo :



En vista de que la progesterona **XXI** (página 11) y análogos de ésta son inactivados rápidamente en el plasma por el metabolismo previamente descrito, la protección de la cadena lateral es un requisito esencial para fármacos con esta estructura, para lo cual, se han experimentado derivados 17- α -alquil ó 17- α -aciloxi, observando que se incrementa notablemente la actividad antiandrogénica (Deghenghi R. et al 1963; Cooke B. y Vallance D. 1965), así como aumenta su biodisponibilidad por administración oral, lo cual tratándose de esteroides es una ventaja que hay que apreciar bastante. Se han preparado series en las que se examina el efecto del tamaño del éster en C-17- α sobre la actividad antiandrogénica, encontrando que ésta aumenta hasta cierto punto con el tamaño del éster, con el siguiente comportamiento: formil, acetil, propionil, butiril, valeril y caproil con 61, 46, 49, 62, 108 y

81% respectivamente tomando como 100% el tamaño de la próstata producido por testosterona XX (Shapiro E. *et al* 1972).

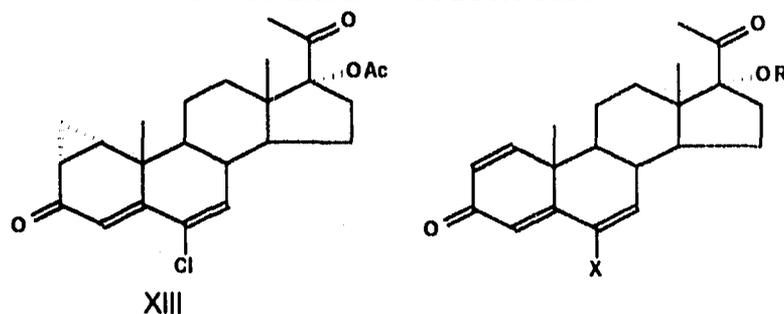
Finalmente la alquilación en C-16 es un factor adicional que está pensado en la protección del metabolismo de la cadena lateral de los derivados de progesterona XXI (página 11), que para el caso del presente trabajo resulta en un elemento determinante para separar la actividad progestional y androgénica de los derivados de ésta. De acuerdo a los datos obtenidos (Shapiro E. *et al* 1962) se ha establecido que la sustitución en C-16 α -metil conserva la actividad progestional de los derivados de la progesterona, mientras que los derivados C-16 β -metil la disminuyen notablemente. Por lo tanto para el diseño de un fármaco que tenga un grupo 17- α -aciloxi y que exhiba baja actividad progestional, la sustitución con C-16 β -metil conduce a una marcada separación de la actividad progestional de la antiandrogénica.

Todos los elementos mencionados hasta ahora en relación a las necesidades estructurales de una molécula esterooidal que se supone exhibirán actividad antiandrogénica, han sido tomados en cuenta en un proyecto de diseño y síntesis de derivados del pregnano con actividad antiandrogénica potencial, del cual el presente trabajo forma parte.

Como antecedentes de esta tesis, en el laboratorio donde se realizó este trabajo, se han sintetizado derivados de la progesterona XXI, (cuadro 1); los cuales cumplen con los requerimientos estructurales señalados como son : 4,6-dien-6-halo, 17- α -aciloxi, 16- β -metil y en sustitución del ciclopropil en C1 α -C2 α una insaturación.. Tomando como 100% la actividad antiandrogénica del acetato de ciproterona XIII (página 9) es interesante notar que cuando se sustituye el ciclopropilo en C1 α -C2 α por una insaturación, la actividad es de 90%, lo cual resulta útil ya que la introducción de ambas funcionalidades implica diferencias significativas en el rendimiento neto, obteniéndose mayores para el caso de la insaturación

(Osawa J. y Spaeth D. 1971; Shibata K. *et al* 1992) respecto del ciclopropilo (Shering Co. 1967). Por otro lado la sustitución del cloro por bromo resulta en un aumento a 240% de la actividad lo cual se puede explicar por la mayor actividad de desestabilización del sistema conjugado por el bromo, o porque este no es susceptible de reacciones de dehalogenación como la declorinación que se ha observado en la clormadinona **X** (página 9) y que representa al 30% del fármaco excretado en orina (Honma S. *et al* 1977), asimismo ya se habían reportado previamente compuestos bromados en C-6 con altas actividades antiandrogénicas (Clark C. y Nowell N. 1979). Además de esto, es notable la influencia del tamaño del sustituyente éster en C-17 α para las series con cloro y con bromo, donde la actividad antiandrogénica es mayor conforme el éster es más grande, observación que se podría explicar por el impedimento estérico que resulta del éster para la reducción del carbonilo en C-20 (Deghenghi R. *et al* 1963). Reportes previos ya habían indicado dicho comportamiento del efecto del tamaño del éster (Shapiro E. *et al* 1972). Por último hay que mencionar el importante aumento de actividad antiandrogénica que se esperaría al introducir un metilo en C-16- β , como resultado de un impedimento estérico adicional para bloquear la reducción del carbonilo en C-20, hecho que es consistente con la observación realizada con las series de corticoides, en los cuales, la actividad antiinflamatoria aumenta significativamente con la introducción del metilo en C-16- β , esta analogía en el efecto hormonal de ambos compuestos, es comprensible en función del traslape de receptores para los derivados de progesterona **XXI** (página 11) (Wakeling A. 1987), lo cual se comprueba al haber observado (Pend, I. 1975) la actividad glucocorticoide de acetato de ciproterona **XIII** (página 9) (antiandrógeno) similar a la prednisona y que tiene su corolario con el reporte de actividad antiandrogénica de bencensulfonilandrostandano **VII** (página 9) (Green M. *et al* 1983) que es un compuesto oxigenado en C-11, lo cual es una característica específica de corticoides.

CUADRO 1. SERIE DE COMPUESTOS SINTETIZADOS QUE SE TOMARON
COMO BASE PARA ESTA TESIS.



C-1	C-6	C-17	ACTIVIDAD
α CICLOPROPIL	Cl	AcO	100 %
DOBLE LIGADURA	Cl	H	50 %
DOBLE LIGADURA	Cl	AcO	90 %
DOBLE LIGADURA	Cl	CH ₃ CH ₂ CO	120 %
DOBLE LIGADURA	Cl	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO	140 %
DOBLE LIGADURA	Cl	CH ₃ (CH ₂) ₃ CO	160 %
DOBLE LIGADURA	Cl	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO	160 %
DOBLE LIGADURA	Br	AcO	240 %
DOBLE LIGADURA	Br	CH ₃ CH ₂ CO	260 %
DOBLE LIGADURA	Br	CH ₃ (CH ₂) ₂ CO	270 %
DOBLE LIGADURA	Br	CH ₃ (CH ₂) ₃ CO	275 %
DOBLE LIGADURA	Br	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO	290 %

La actividad de los derivados está expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento de la prostata, tomando como 100 % el efecto observado del Acetato de ciproterona XIII

OBJETIVOS

En base a los antecedentes descritos, se definieron los siguientes objetivos generales, que son el propósito de este trabajo.

- **Sintetizar el compuesto 6-bromo-17 α -butiroxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona.**
- **Valorar la actividad antiandrogénica potencial del compuesto sintetizado a través de su capacidad de inhibir la actividad de la 5- α -reductasa**

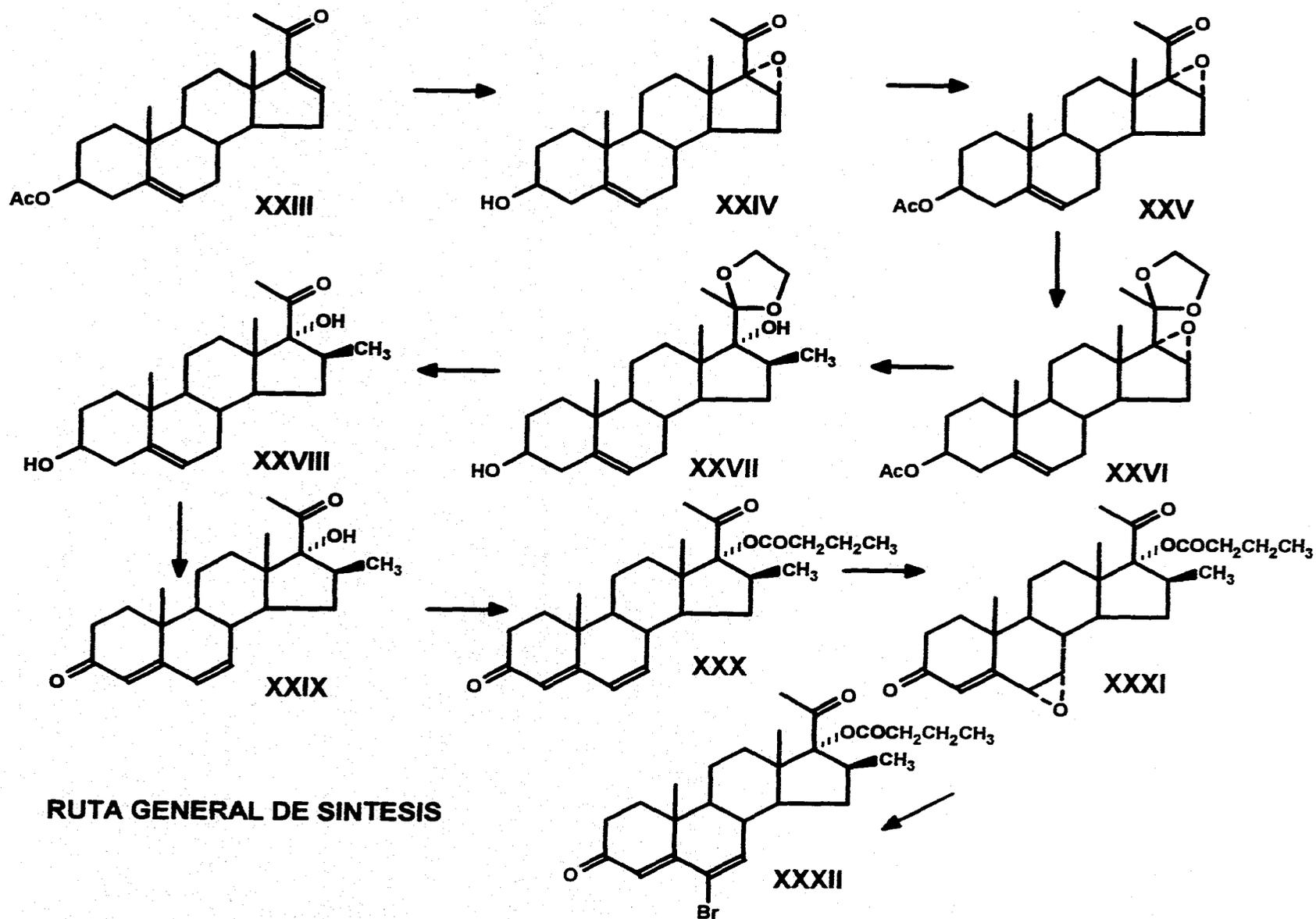
Para llevar a cabo los objetivos generales anteriores se contemplaron los siguientes objetivos particulares:

- Optimizar los métodos sintéticos utilizados previamente, mediante rutas alternativas, variación en tiempo y temperaturas de las reacciones, así como modificación en las concentraciones y tipo de catalizadores y disolventes utilizados.**
- Sintetizar, aislar, purificar e identificar espectroscópicamente el compuesto final y los intermediarios.**
- **Estandarizar el método de aislamiento de la enzima 5- α -reductasa y cuantificar su actividad en presencia del compuesto final y sus intermediarios.**

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

Los resultados que se describen a continuación, son producto de al menos tres repeticiones independientes de los métodos descritos, y básicamente consisten en el análisis de las constantes físicas y espectroscópicas del producto final y sus intermediarios, lo cual permitió su identificación química, así como la descripción de los resultados de inhibición de 5- α -reductasa.

La ruta de síntesis, tal como está resumida en el esquema 4 (página 23), se inició tomando como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) **XXIII**, el cual presenta las funcionalidades químicas necesarias para su transformación discrecional en el compuesto objetivo. Antes de iniciar la ruta de síntesis, la materia prima se identificó mediante sus constantes físicas y espectroscópicas (tabla 1, página 37): El espectro de UV (espectro 1, página 49) reflejó la existencia del cromóforo con λ_{\max} 240nm correspondiente a la cetona $\alpha\beta$ -insaturada en C-16-en-20-ona. Por su parte el espectro de IR (espectro 2, página 50) registró la existencia de dos señales en la zona de los carbonilos en 1662 cm^{-1} y 1730 cm^{-1} correspondientes a la cetona $\alpha\beta$ -insaturada en C-20 y al carbonilo del acetóxi sobre C-3 respectivamente. En tanto el $^1\text{HRNM}$ (espectro 3, página 51) de este compuesto, denotó señales intensas en 1.0 ppm (3H) y 1.2 ppm (3H) asignadas a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente, así como dos señales en 2.1 ppm (3H) y 2.3 ppm (3H) perteneciendo al metilo C-21 y al metilo α -carbonilo de éster sobre C-3 respectivamente. Además se observa un multiplete en 4.3 ppm (1H) asignado al protón base del acetóxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presenta un doblete en 5.4 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6, así como un multiplete en 6.8 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-16.



RUTA GENERAL DE SINTESIS

El primer paso de la ruta sintética involucró la oxidación de la insaturación en C-16, la cual es parte de un sistema cetona α,β -insaturada, el método de elección en estos casos es la epoxidación con H_2O_2 en medio básico, reacción que se favorece por la conjugación con el carbonilo en C-20 (Meyer, J. et al 1950; Löken, B. et al 1954). La reacción transcurre con una transformación cuantitativa hacia el epóxido deseado **XXIV**, compuesto que se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas que se resumen en la tabla 2 (página 38). El IR (espectro 4, página 52) de este compuesto presenta una señal intensa correspondiente al epóxido en 805 cm^{-1} , también se puede observar la señal de carbonilo perteneciente a la cetona en C-20 en 1692 cm^{-1} . Como resultado de las propiedades nucleofílicas de la solución de KOH utilizada en esta reacción, ocurre la hidrólisis del acetóxi en C-3, que se confirma por la ausencia de la señal del carbonilo de éster y la aparición de una señal intensa para el alcohol en 3462 cm^{-1} . Por su parte el espectro $^1\text{HRNM}$ (espectro 5, página 53) de este compuesto, muestra evidencia de la reacción en función de la presencia de dos señales de protones base de funciones oxigenadas; una de ellas correspondiente a la base del epóxido en C-16 con un singulete en 3.3 ppm (1H) y la base del alcohol en C-3 con un singulete en 3.6 ppm (1H); además de la desaparición de la señal de protón vinílico correspondiente a la insaturación en C-16. El espectro $^1\text{HRNM}$ muestra en presencia de D_2O una señal intercambiable correspondiente al alcohol en C-3 con un desplazamiento de 2.2. ppm (1H). En este mismo espectro se registran las señales correspondientes a los metilos angulares en 1.1 ppm (3H) y 1.2 ppm (3H) asignadas a los metilos C-18 y C-19 respectivamente, así mismo la señal del metilo α a la cetona en C-20 en 2.1 ppm (3H).

El siguiente paso de la síntesis consistió en la acetilación del alcohol en C-3 del compuesto **XXIV**, el cual estando en orientación ecuatorial favoreció el que se obtuvieran rendimientos cuantitativos. El método empleado consistió en una acetilación convencional mediante una mezcla de anhídrido acético y piridina. El producto acetilado **XXV** se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 3 (tabla 39). El espectro de IR

(espectro 6, página 54) indica la presencia de una señal en 1732 cm^{-1} asignada al carbonilo del acetóxi y una señal en 1698 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; la ausencia de la señal del alcohol confirma la acetilación realizada. Por su parte el $^1\text{HRMN}$ (espectro 7, página 55) mostró un singulete centrado en 1.0 ppm (6H) correspondiente a los metilos C-18 y C-19. El singulete en 2.1 ppm (6H) se asignó al metilo del grupo acetilo sobre C-3 y al metilo en C-21 α a la cetona en C-20. La señal aguda en 3.7 ppm (1H) se asignó al protón base del epóxido en C-16. El multiplete en 4.5 ppm (1H) corresponde al protón base del acetóxi en C-3. El doblete en 5.3 ppm (1H) se asignó al protón en C-6.

El siguiente paso de la síntesis implicó la protección del carbonilo en C-20 del compuesto **XXV**, ya que el próximo paso involucra la apertura de epóxido con un reactivo de Grignard. Esta reacción se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de metilo, tolueno como disolvente y cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico para la formación de dioxolano (Dauben, H. et al 1954). El cetal formado **XXVI** se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 4 (página 40). El espectro de IR de este compuesto (espectro 8, página 56) refleja la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo cetónico en C-20, mostrando únicamente una señal intensa en 1720 cm^{-1} perteneciente al carbonilo del éster sobre C-3. El espectro $^1\text{HRMN}$ (espectro 9, página 57) del compuesto **XXVI** muestra dos singuletes en 1 ppm (3H) y 1.1 ppm (3H) correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente. También se observa un singulete en 1.5 ppm (3H) asignado al metilo C-21. Se registra además, un singulete en 2.1 ppm (3H), perteneciente al metilo del acetoxi sobre C-3. En 3.3 ppm (1H) el espectro muestra un singulete correspondiente al protón base del epóxido en C-16. Como evidencia de la formación del grupo funcional etilendioxi deseado se presenta un multiplete en 3.9 ppm (4H) asignado al dioxolando sobre C-20. En 4.6 ppm (1H) se registra un multiplete perteneciente al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos encontramos un doblete en 5.3 ppm (1H) que se asignó al protón en C-6.

El siguiente paso de la síntesis consistió en la inserción del metilo en C-16 β en el compuesto **XXVI**, reacción que representó el mayor obstáculo de este trabajo. La posición β del metilo resulta del mecanismo de la reacción, el cual se trata de una sustitución S_N2 en la apertura del epóxido que necesariamente debe ser una sustitución transdiaxial (Bernstein, B y Litell, R. 1960). El compuesto metilado obtenido **XXVII**, se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 5 (página 41). El espectro de IR de este compuesto (espectro 10, página 58) evidenció la presencia de una señal intensa en la zona de alcohol en 3416 cm^{-1} , correspondiente al hidroxilo que aparece como resultado de la hidrólisis del acetilo en C-3 por el reactivo de Grignard, también se observa una señal aguda en esta zona característica de alcoholes terciarios en 3576 cm^{-1} correspondiente al hidroxilo en C-17, que se generó con la apertura del epóxido en C-16-C-17. El espectro de $^1\text{HRMN}$ (espectro 11, página 59) presenta dos singuletes en 0.87 ppm (3H) y 0.98 ppm (3H) correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente; un doblete en 1.17 ppm (3H, $J=1.5\text{ Hz}$), asignado al metilo adicionado en C-16 β ; el doblete resulta del acoplamiento de este metilo con el protón en C-16. El singulete en 1.37 ppm (3H) corresponde al metilo α del dioxolano sobre C-20. En 3.5 ppm (1H) se presenta un multiplete perteneciente al protón base del alcohol en C-3. El multiplete en 4.0 ppm (4H) pertenece a los metilenos del grupo etilendioxo sobre C-20. Finalmente en la zona de protones vinílicos se observa un doblete en 5.4 ppm (1H) asignado al protón vinílico en C-6.

La siguiente reacción consistió en la hidrólisis del dioxolano del compuesto **XXVII** para regenerar el carbonilo en C-20. Esta reacción se llevó a cabo mediante un reflujo moderado en medio ácido, cuidando el tiempo y la temperatura de la reacción, en virtud de la labilidad del alcohol en C-17 α , que al ser un alcohol terciario con una configuración axial, fácilmente podía sufrir una reacción de eliminación en el medio ácido de la hidrólisis. Este compuesto hidrolizado obtenido **XXVIII** se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas

enlistadas en la tabla 6 (página 42). El espectro de IR de este compuesto (espectro 12, página 60) denotó una señal intensa en 1696 cm^{-1} asignada al carbonilo de la cetona, que se regeneró por la hidrólisis del cetal, también se observó una señal intensa en la zona de alcoholes en 3462 cm^{-1} correspondiente a los grupos oxidrilos en C-3 β y C-17 α . Por otro lado el espectro de ^1H RNM (espectro 13, página 61) evidenció ausencia del multiplete en 4 ppm que correspondía a los metilenos del dioxolano hidrolizado. Los metilos en C-16 y C-18 aparecen como dos singuletes sobrepuestos en 1.1 ppm (6H). También se observa un singulete en 1.3 ppm (3H) correspondiente al metilo angular C-19. En 2.1 ppm (3H) se presenta un singulete agudo perteneciente al metilo C-21. Por otro lado el multiplete en 3.5 ppm (1H) se asignó al protón base del alcohol en C-3; la señal en 5.3 ppm (1H) es característica para el protón vinílico en C-6.

El siguiente paso de la ruta sintética constituyó la formación del sistema 4,6-dien-3-ona del compuesto **XXIX**, cetona conjugada que se obtuvo oxidando el alcohol en C-3 β . Esta reacción representó el ahorro de pasos adicionales de síntesis que serían necesarios en caso de oxidar primero el sistema 5-en-3-ol por la oxidación de Oppenauer para formar la función 4-en-3-ona (Djerassi, C. 1951) y la posterior introducción de la doble ligadura en C-6 mediante una deshidrogenación con Cloranilo (Agnelo, E. Laubach, G. 1960; Sprech R. et al 1966). La reacción de bromación-dehidrobromación empleada se implementó utilizando bromo como agente oxidante, así como el carbonato de litio, base que abstrae el protón alílico en C-4, obteniéndose como producto el sistema deseado 4,6-dien-3-ona. Esta reacción se mejoró en sus rendimientos con respecto a los rendimientos obtenidos en trabajos previos y en trabajos publicados (Shapiro, E. et al 1972), llegando a un rendimiento del 85% variando la cantidad de bromo adicionado a la reacción. El compuesto oxidado obtenido **XIX** presentó cromóforo en CCF y sus constantes físicas y espectroscópicas se enlistan en la tabla 7 (página 43). La formación del cromóforo 4,6-dien-3-ona se confirmó por la presencia de un máximo de absorbancia en 284 nm (espectro 14, página 62). Por su

parte el espectro de IR (espectro 15, página 63) de este compuesto denotó la existencia de dos señales en la zona de carbonilos, una de ellas en 1662 cm^{-1} asignada al carbonilo α,β - γ,δ insaturado en C-3, y otro en 1702 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de cetona en C-20; así mismo se observa una señal en el área de alcoholes en 3498 cm^{-1} asignada al hidroxilo en C-17 α . El ^1H RMN de este compuesto (espectro 16, página 64) mostró señales asignables al compuesto esperado; de las cuales, dos singuletes en 0.7 ppm (3H) y 0.9 ppm (3H), fueron asignados a los metilos C-18 y C-19 respectivamente, así como un doblete en 1.1 ppm (3H, $J=1.5\text{ Hz}$) correspondiente al metilo en C-16 β . La señal intensa en 2.1 ppm (3H) se asignó al metilo C-21. En el espectro se observa también una señal intensa en 3.9 ppm producto del DMSO empleado para disolver el compuesto. En la zona de protones vinílicos se registró una señal en 5.3 ppm (1H) perteneciente al protón vinílico en C-6; un singulete en 5.6 ppm (1H) asignada al protón vinílico en C-4 y una señal muy desplazada a 6.2 ppm (1H, $J=1.5\text{ Hz}$) asignada al protón en C-7, el triplete observado con este desplazamiento se acopla con el protón en C-8 y la desprotección registrada es producto de la resonancia habitual de este sistema multiconjugado con la cetona en C-3.

El siguiente paso de la síntesis constituyó la esterificación del alcohol en C-17 α para obtener el compuesto XXX, reacción que se llevo a cabo mediante la formación *in situ* del anhídrido mixto con anhídrido trifluoracético y el ácido butírico (Shapiro, E. et al 1962; Shapiro, E. et al 1972). Esta reacción requirió de cuidados especiales en virtud de la acidez que se generaba con la producción del ácido trifluoracético, capaz de catalizar la eliminación del alcohol terciario en C-17 α como agua o bien como ácido butírico. Esta condición fue controlada regulando el tiempo de reacción, el cual resultó óptimo en 5 minutos, este momento se estableció considerando el máximo de rendimiento del éster deseado y el mínimo de formación de productos secundarios. El éster butirato esperado XXX, se identificó analizando sus propiedades físicas y espectroscópicas (tabla 8, página 44). El espectro de UV (espectro 17, página 65) reflejó un máximo de absorción a $\lambda_{\text{max}} 284\text{ nm}$,

resultado de la presencia del cromóforo de la cetona $\alpha\beta\text{-}\gamma\delta$ -insaturada en C-3. El espectro de IR (espectro 18, página 66) de este compuesto, registró dos señales intensas en la zona de carbonilos, una de ellas en 1728 cm^{-1} característica de carbonilo de éster, evidencia de la reacción que se esperaba y la señal del carbonilo en C-20 que queda enmascarada por la amplitud de la señal del éster. También se observa una señal de carbonilo de cetona en 1664 cm^{-1} correspondiente a la cetona en $\alpha\beta\text{-}\gamma\delta$ -insaturada en C-3; así mismo se distingue la desaparición de la señal del alcohol en C-17 α en la zona de hidroxilos. Por su parte el espectro de $^1\text{H NMR}$, (espectro 19, página 67) reflejó señales asignables al compuesto esterificado, en 0.8 ppm (3H) y 1.1 ppm (3H), se presentan los singuletes correspondientes a los metilos en C-18 y C-19 respectivamente. En 0.9 ppm (3H, $J=3\text{ Hz}$) el doblete asignado al metilo en C-16 β ; el singulete en 1.9 ppm (3H) es característico para el metilo C-21 (3H). La señal intensa en 3.6 ppm es típica para los metilos de DMSO empleado para la disolución del compuesto. En la zona de los protones vinílicos se encuentra un singulete en 5.6 ppm (1H) asignado al protón en C-4. Finalmente el singulete en 6.2 ppm (2H) es característico para los protones en C-6 y C-7.

Es prudente mencionar que los espectros de los compuestos oxidado y esterificado muestran señales evidentes de impurezas, hecho que se trató de evitar al máximo, sin embargo hay que indicar que particularmente estos dos compuestos presentaron serios obstáculos para su purificación, ya que son poco solubles, lo cual impedía su cristalización, además la separación cromatográfica por capa fina hecha en ambos casos, a pesar de haber empleado diversos sistemas de disolventes, no resolvían bien las impurezas que mostraron R_f s similares a los compuestos deseados. Se decidió continuar con la síntesis utilizando estos compuestos con impurezas, ya que se detectó que para el caso del compuesto oxidado **XXIX**, las señales de la impureza correspondían a la materia prima, compuesto que sería resuelto en la siguiente reacción de esterificación, ya que formaría dos ésteres en vez de uno, dando lugar a un compuesto menos polar, tal como se observó al esterificar esta mezcla. Por

su parte las impurezas presentadas en el éster XXX se eliminaron al formar el producto siguiente; compuesto soluble que cristalizaba y que se podía separar fácilmente de otras impurezas.

El siguiente paso de la ruta sintética constituyó la formación del epóxido en C-6 α -C-7 α , (compuesto XXXI), funcionalidad química necesaria para la inserción del halógeno en C-6. La configuración alfa del epóxido resulta del impedimento estérico del metilo angular en C-19; aun así, en esta reacción se forma un 5% del epóxido con configuración beta. Para esta reacción la literatura recomienda la utilización de perácidos para la epoxidación de dobles ligaduras aisladas, en este caso, se tiene un sistema conjugado con una cetona, por lo cual se podría emplear la epoxidación con peróxido en medio básico, sin embargo la necesidad de la conformación alfa del epóxido para dirigir la sustitución en C-6 en la reacción posterior, determinó la utilización del perácido sobre el peróxido. Esta reacción también sirvió para la purificación de las impurezas acumuladas previamente. Se llevó a cabo la oxidación selectiva de la insaturación C-6 α -C-7 α mediante el reactivo del perácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA) (Shering, A. 1963; Shering, A. 1967; Shapiro, E. et al 1972). Esta síntesis fue altamente demandante de condiciones anhidras. El compuesto epoxidado XXXI presentó cromóforo en CCF y las constantes físicas y espectroscópicas se enlistan en la tabla 9 (pagina 45). El espectro de UV (espectro 20, página 68) evidenció la existencia de un máximo de absorbancia en λ_{max} 239 nm correspondiente al cromóforo de la cetona α - β insaturada, así como la desaparición del cromóforo de la cetona α - β - γ - δ -insaturada en 284 nm. Por su parte el espectro de IR de este compuesto (espectro 21, página 69) indica la presencia del carbonilo del éster en 1728 cm^{-1} y la señal intensa de alcohol en 3428 cm^{-1} posiblemente indica una transformación parcial del epóxido a un hidroxíster. En tanto, el espectro de 1H RNM (espectro 22, página 70) demuestra la presencia de un singulete en 0.8 ppm (3H) y otro en 1.1 ppm (3H) asignados a los metilos C-18 y C-19 respectivamente; así como el doblete en 1.4 ppm (3H) perteneciente al metilo en C-16 β . El triplete en 1.0 ppm

(3H, $J=1.5$ Hz.) se asignó al metilo terminal de éster butírico acoplado con el metileno en posición β . El metilo C-21 muestra un singulete en 1.9 ppm (3H). Se distingue un triplete en 2.3 ppm (2H, $J=2$ Hz.) perteneciente al metileno α al éster butírico. La presencia del epóxido se confirma por las señales de dobletes en 3.3 ppm (1H, $J=1.5$ Hz.) y 3.5 ppm (1H, $J=1.5$ Hz.) correspondientes a los protones en C-7 β y C-6 β respectivamente. En el área de los protones vinílicos se presenta un singulete en 6.1 ppm (1H) asignada al protón en C-4.

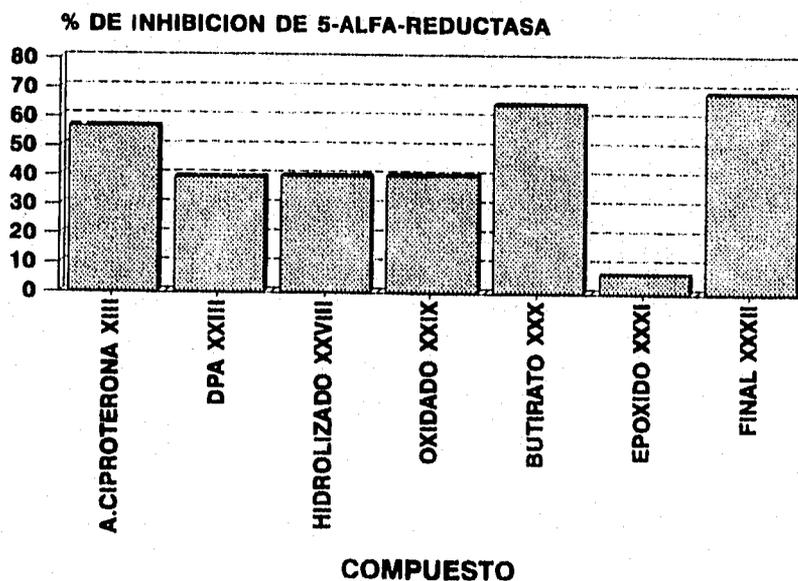
La última reacción de esta ruta sintética, la constituyó la inserción del bromo en C-6. El primer paso de esta reacción es la formación de la halohidrina que en el medio de la reacción se deshidrata y forma el compuesto final **XXXII**. Esta reacción requirió modificaciones en la mezcla de reacción recomendada por (Akagi, S. y Tsuda K. 1961; Shapiro, E. et al 1972; Shibata, K. et al 1992), ya que se identificó que un exceso de ácido bromhídrico daba lugar a la formación de compuestos adicionales, probablemente derivados bromados. El máximo rendimiento alcanzado para esta reacción fue cuando se disminuyó la cantidad de bromuro de hidrogeno utilizado y a través de un cuidadoso calentamiento de la reacción a 40°C durante 30 minutos. La posición en C-6 del bromo resulta de la configuración alfa del epóxido **XXXI** utilizado; ya que, al ser una sustitución transdiaxial, es necesario que el nucleófilo se aproxime por la posición axial, siendo ésta el C-6. El compuesto bromado final **XXXII**, se identificó mediante sus constantes físicas y espectroscópicas enlistadas en la tabla 10 (página 46). El espectro de UV de este compuesto (espectro 23, página 71) reveló la regeneración del cromóforo de la cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -insaturada con una máximo de absorbancia en 284 nm; en tanto que el IR (espectro 24, página 72) indicó la presencia de los carbonilos en C-3, C-20 y carbonilo de éster con 1660cm^{-1} , 1690cm^{-1} y 1722cm^{-1} respectivamente. Por su parte el espectro de $^1\text{HRNM}$ (espectro 25, página 73) registró un singulete en 0.7 ppm (3H) correspondiente al metilo en C-18, el triplete en 0.9 ppm (3H) se asignó al metilo terminal del éster butiroxi. La señal en 1.1 ppm (3H) corresponde al metilo en C-19. El metilo en C-16 β mostró un doblete en 1.4 ppm (3H, $J=1.5\text{Hz.}$) debido a la interacción con el

protón en C-16. Los protones del éster butiroxi mostraron las siguientes señales: el metileno α al carbonilo dió en 2.3 ppm (2H, $J=2$ Hz.) un triplete debido a la interacción con el metileno en C-3'. El multiplete en 1.7 ppm (2H) corresponde a los protones en C-3'; el metilo C-4' dió un triplete en 1.0 ppm (3H, $J= 1.5$ Hz.) debido a la interacción con el metileno en C-3'. El doble de dobles en 1.8 ppm (1H) se asignó al protón en C-8. Los protones en C-2 α al carbonilo en C-3 dieron una señal múltiple en 2.5 ppm (2H). El singulete agudo en 2.0 ppm (3H) se asignó al metilo C-21. En la zona de protones vinílicos se distinguen dos singuletes en 6.3 ppm (H) y 6.6 ppm (H) correspondientes a los protones en C-7 y C-4 respectivamente, desplazados a campo bajo como resultado de la influencia desprotectora del bromo en C-6. Por su parte en $^{13}\text{CRNM}$ (espectro 26, página 74) permitió fortalecer la identidad química del compuesto revelando 26 señales asignables de acuerdo a la teoría de desplazamiento químico a los 26 carbonos que conforman este compuesto final que por analogía al espectro $^{13}\text{CRNM}$ de 17α -hidroxiprogesterona (Blunt, J. y Stothers, J. 1977) y con auxilio de una secuencia de pulsos DEPT (espectro 27, página 75) que discrimina entre CH, CH_2 y CH_3 se asignaron las señales. Se estableció la existencia de 5 metilos en C-18, C-19, C16 β , C-21 y C-4' con 14.7 ppm, 19.65 ppm, 16.37 ppm, 28.17 ppm y 13.75 ppm respectivamente. Así mismo la existencia de carbonos con hibridación sp^2 correspondientes a la cetona en C-20, la cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ insaturada en C-3, el carbonilo de éster C-1' y las insaturaciones en C-6, C-7, C-4 y C-5 están dados con desplazamientos químicos de 203.81 ppm, 198.81 ppm, 173.47 ppm, 159.20 ppm, 142.65 ppm, 126.62 ppm, 121.41 ppm respectivamente. Se reconoce además una señal bastante desplazada a campo bajo 94.17 ppm, asignada a C-17. La totalidad de las asignaciones de $^{13}\text{CRNM}$ se enlistan en la tabla 11. Finalmente se confirmó el peso molecular del compuesto así como la presencia del bromo mediante el espectro de masas realizado con ionización química, el cual confirmó el peso molecular esperado de 490 uma y $M+1=491$ (espectro 28, página 76).

EVALUACION FARMACOLOGICA

Para el ensayo *in vitro* de la actividad inhibitoria del compuesto final y de sus intermediarios de síntesis se empleó el extracto de testículos en virtud de ser el principal sitio de biosíntesis de testosterona y andrógenos relacionados, valorando la actividad de inhibición de la 5 α -reductasa como índice de actividad antiandrogénica potencial (Grower; D. 1984.). Los resultados obtenidos utilizando el extracto de testículo de rata como se observa en la gráfica 1, se registra que la mayor actividad inhibitoria se presenta en la presencia del compuesto final **XXXII** con 68.34% y en el compuesto esterificado **XXX** con 64.36%. En esta serie, el acetato de ciproterona **XIII** inhibe la actividad de la 5 α -reductasa en un 56.6%, en tanto que la materia prima **XXIII**, el compuesto hidrolizado **XXVII** y el oxidado indican valores de inhibición similares al rededor de 39%. Es interesante observar que la presencia del epóxido en C-6 α -C-7 α conduce a una pérdida de la actividad, probablemente por la desaparición del sistema conjugado 4,5-6,7-dien-3-ona necesario para la actividad según se ha documentado previamente (Cook, B. Vallance, D. 1965).

GRAFICA 1. EFECTO DE LOS INTERMEDIARIOS Y PRODUCTO FINAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE 5-ALFA-REDUCTASA DE EXTRACTO DE TESTICULO DE RATA



Las actividad de los compuestos como inhibidores de la 5- α -reductasa en extracto de testículo de rata reflejan buenos porcentajes con respecto al acetato de ciproterona que es el antiandrógeno esteroidal de elección en el mercado, dicha actividad puede estar vinculada al mayor tamaño del bromo con respecto al cloro, ofreciendo un mayor obstáculo para la reducción del carbonilo en C-3; así como la presencia del éster indica que la actividad se incrementa cuando este substituye al hidroxilo en C-17 α . Dichas funcionalidades incorporadas en el compuesto final influyen favorablemente sobre este compuesto como inhibidor de la 5- α -reductasa como lo indica la gráfica 1, Para valorar fisiológicamente la inserción del metilo en C-16 β es preciso el estudio *in vivo*, ya que se reconoce que esta funcionalidad protege al esteroide en contra de la acción de enzimas que reducen el carbonilo en C-20 o, que pueden hidrolizar el éster en C-17 α .

El presente estudio solo explora la actividad del compuesto como inhibidor de la 5- α -reductasa y es preliminar; actualmente se realiza una valoración farmacológica detallada en el Instituto de Pediatría.

La actividad *in vitro* del compuesto final **XXXII** lo hace buen candidato para realizar estos estudios farmacológicos adicionales como: su actividad antiandrogénica *in vivo* sobre regresión del cáncer prostático inducido en ratas, así como su valoración frente a efectos colaterales (progestagenos y tóxicos) que recomienden o eliminen su posible utilización en tratamientos antiandrogénicos en humanos.

CONCLUSIONES.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos y la discusión hecha de este trabajo, se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se obtuvo un derivado esteroidal nuevo con actividad antiandrogénica potencial con 4.6% de rendimiento neto.

- El derivado esteroidal obtenido es más activo que el acetato de ciproterona utilizado como estandar.

- Los resultados de la evaluación in vitro del producto y sus intemediarios, confirman la relación estructura-actividad tomada como base de este trabajo:

* La presencia del ester en C-17 α aumenta la actividad.

*La presencia del epoxido C6 α -C-7 α disminuye la actividad.

- El ensayo de inhibición de la enzima 5- α -reductasa puede utilizarse como índice de la actividad antiandrogénica.

APENDICE A. PARTE EXPERIMENTAL

DETERMINACION DE CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS.

-Los puntos de fusión (pf), se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos.

-Los espectros de ultravioleta (UV), se obtuvieron por barridos de los compuestos disueltos en metanol, mediante un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer 202 y Perkin Elmer Lambda 2.

-Los espectros de infrarrojo (IR) de los compuestos se realizaron sobre pastillas de bromuro de potasio o en solución en un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin Elmer Mod. 337 .

-Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{HNRNM}$) y de carbono 13 ($^{13}\text{CRNM}$), se determinaron en un espectrofotómetro Varian EM390 y Varian UxR-3005, utilizando como referencia interna trimetil silicio (TMS).

MÉTODOS DE SÍNTESIS AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.

Para la obtención del compuesto contemplado como objetivo final, se siguió la ruta de síntesis que se puede observar en el esquema 8 (página 23). En primer lugar se caracterizó espectroscópicamente la materia prima según se puede ver en la tabla 1.

TABLA 1

PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE MATERIA PRIMA 16-DPA XXIII.

n_D^{20}	1.70-1.77°C
PM	200-201
UV	
Amx 240nm	signa. o. absorbencia en C-20
μ	
1603 cm^{-1}	signa. o. absorbencia C-20
1730 cm^{-1}	signa. o. absorbencia C-3
1800 cm^{-1}	
1.8 ppm	2H, proton C-16
1.8 ppm	2H, proton C-16
2.3 ppm	2H, proton C-11
2.3 ppm	10H, proton C-20 en C-9
4.3 ppm	2H, proton C-3
5.4 ppm	2H, proton C-6
6.5 ppm	1H, proton vialico C-16

SINTESIS DE 16 α -17 α -EPOXI-3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA XXIV. Para iniciar la síntesis, se parte de acetato de 16-DPA **XXIII**, el cual es una materia prima disponible comercialmente. Para la formación del epóxido deseado se siguieron las condiciones de reacción previamente reportadas (Löken B. *et al* 1956) En un matraz bola de 150 ml conteniendo 66 ml de metanol, se agregaron 2 ml de solución NaOH 4 N , 4 ml de H₂O₂ al 30% y 1 g de DPA; la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 20 hrs, transcurrido este tiempo se agregaron 10 ml de agua y la suspensión resultante se extrajo 3 veces con 100 ml de CHCl₃ cada una; posteriormente la fase orgánica se lavó 3 veces con 100 ml de H₂O cada una, después de lo cual se secó con Na₂SO₄ en reposo, se filtró y se evaporó a sequedad. El sólido resultante se cristalizó en metanol y baño de hielo, obteniéndose un rendimiento de 99%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 2.

TABLA 2

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO XXIV.

ν_{max}	IR (cm ⁻¹)
3407 cm ⁻¹	alcohol en C-3
1734 cm ⁻¹	C=O en C-20
1620 cm ⁻¹	C=C en C-5
1651 cm ⁻¹	C=C en C-6
1540 cm ⁻¹	OH
1065 cm ⁻¹	alcohol en C-3
1000 cm ⁻¹	OH
1450 cm ⁻¹	C=C en C-5
1430 cm ⁻¹	C=C en C-6
1370 cm ⁻¹	C=C en C-5
1350 cm ⁻¹	C=C en C-6
1250 cm ⁻¹	C=C en C-5
1230 cm ⁻¹	C=C en C-6
1150 cm ⁻¹	C=C en C-5
1130 cm ⁻¹	C=C en C-6
1050 cm ⁻¹	C=C en C-5
1030 cm ⁻¹	C=C en C-6
5.3 ppm	d (1H, protón vinílico en C-6)

SINTESIS DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-4-PREGNEN-20-ONA XXV. La acetilación del alcohol en C-3 se realizó por una acetilación convencional con anhídrido acético y piridina. En un matraz de 50 ml se adicionaron 10 ml de (CH₃CO)₂O, 10 ml de piridina y 1 g del epóxido XXIV. La mezcla de reacción se mantuvo 12 hrs con agitación constante a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo, se adicionaron lentamente 25 g de hielo y el precipitado formado se extrajo 3 veces con 50 ml de acetato de etilo cada una, posteriormente la fase orgánica se lavó 3 veces con 100 ml de una solución de HCl al 8% (p/v), después de lo cual se neutralizó la fase orgánica con una solución de NaHCO₃ saturada. Después de esto se secó con Na₂SO₄ en reposo, se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad, el sólido resultante se cristalizó por par de disolventes acetato de etilo-éter isopropílico, obteniéndose un rendimiento de 99%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 3.

TABLA 3

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO XXV.

PI	157-159°C
FM	
IR	
2954 cm ⁻¹	CH ₃ -CH ₂
1732 cm ⁻¹	carbonilo del éter en C-3
1678 cm ⁻¹	cetona en C-20
1250 cm ⁻¹	epóxido en C-16 α -C-17 α
1.05 ppm	s
1.1 ppm	s (4H, metilos en C-18 y C-19)
2 ppm	s (4H, metilo en C-21 y metilo de acetilo en C-3)
3.7 ppm	s (1H, base del epóxido en C-16)
4.5 ppm	m (1H, base acetilo en C-3)
5.3 ppm	d (1H, protón vinílico de C-6)

SINTESIS DE 3 β -ACETOXI-20-ETILENDIOXI-16 α -17 α -EPOXI-5-PREGNENO XXVI. La protección del carbonilo en C-20 se realizó con modificaciones a la técnica previamente reportada (Dauben H. *et al* 1954). En un matraz de 50 ml, se disolvieron 7 ml de tolueno, 3 ml de etilenglicol, 3 ml de ortoformiato de trimetilo, 14 mg de ácido paratoluensulfónico (pTSA) y 1 g de epoxiacetato **XXV** (Todos los reactivos utilizados estaban anhidros). La mezcla de reacción se mantuvo 6 hrs con agitación y temperatura de 60°C en condiciones anhidras. Transcurrido este intervalo, se adicionaron 5 mg de acetato de sodio anhidro y se extrajo 3 veces con 50 ml de CHCl₃ cada una; posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄ anhidro, después de lo cual se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad. El sólido resultante se cristalizó con metanol-CHCl₃, obteniéndose un rendimiento de 74%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 4.

TABLA 4

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO XXVI.

PI	194-196°C
PM	416 μ m
IR	
1700 cm^{-1}	CH ₃ -C(=O)-CH ₃
1720 cm^{-1}	carbonilo del grupo en C-3
¹ H RMN	
1 ppm	s (CH ₃ , grupo en C-18)
1.1 ppm	s (CH ₃ , grupo en C-19)
1.3 ppm	s (CH ₃ , grupo en C-21)
2.1 ppm	s (CH ₃ , grupo del acetato en C-3)
2.3 ppm	s (H, grupo del acetato en C-3)
3.9 ppm	s (H, grupo en C-18)
4.6 ppm	m (H, grupo del acetato en C-3)
5.3 ppm	d (H, protón vinílico en C-6)

SINTESIS DE 20-ETILENDIOXI-3 β ,-17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL 5-PREGNENO XXVII. Para la inserción del metilo en posición C-16 β se utilizó reactivo de metil-Grignard y las condiciones de reacción se determinaron conforme a los rendimientos obtenidos después de numerosas variaciones de la técnica (Bernstein, B. y Litell, R. 1960). En un matraz bola de 100 ml se adicionó 1 g del compuesto cetal **XXVI**, 22.1 ml de cloruro de metil magnesio 3M en tetrahydrofurano, 20 ml de tetrahydrofurano anhidro y 1 g de CuI. La mezcla de reacción se mantuvo 24 hrs a reflujo y agitación en atmósfera de N₂. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 ml de solución de NH₄Cl saturada (lentamente); en seguida se extrajo 3 veces con 100 ml de CHCl₃ cada una, y posteriormente se lavó con H₂O hasta que se observó pH neutro. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a sequedad. El sólido resultante se cristalizó en metanol-éter diisopropílico, obteniéndose un rendimiento de 60%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 5.

TABLA 5

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS EL COMPUESTO XXVII.

FI	163-165°C
FM	360 μ m
IR	
3576 cm^{-1}	alcohol en C-17 α
3416 cm^{-1}	alcohol en C-3 β
1720 cm^{-1}	
6.97 ppm	s (C), metilo en C-16 β
5.75 ppm	s (C), metilo en C-10
1.17 ppm	d (H), metilo en C-16 β
1.37 ppm	s (H), metilo en C-11
3.5 ppm	m (H), protons de alcohol en C-9
4.0 ppm	m (H), etileno en C-20
5.4 ppm	d (H, protón vinílico en C-6)

SINTESIS DE 3 β ,17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNEN-20-ONA XXVIII. Para la desprotección del carbonilo en C-20 se llevó a cabo una hidrólisis en medio ácido con ácido acético acuoso a reflujo. En un matraz de 50 ml se adicionó 1 g de compuesto metilado **XXVII**, 4.5 ml de metanol, 10 ml de ácido acético y 10 ml de agua. La mezcla de reacción se mantuvo 2 h a reflujo con agitación. Transcurrido ese tiempo, se llevó a una temperatura de 40°C, y el precipitado obtenido se filtró y se secó a temperatura ambiente. El sólido resultante se cristalizó en CHCl₃, obteniéndose un rendimiento de 80%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 6.

TABLA 6
PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS EL COMPUESTO XXVIII.

PI	228-230°C
PM	346 μ m
IR	
1696 cm^{-1}	carbonilo en C-20
3462 cm^{-1}	alcoholes en C-3 β y C-17 α
¹ H RMN	
1.1 ppm	d (3H, metilo en C-16 β)
1.1 ppm	s (3H, metilo en C-18)
1.3 ppm	s (3H, metilo en C-19)
2.1 ppm	s (3H, metilo C-21)
3.5 ppm	m (1H, base de alcohol en C-3)
5.3 ppm	d (1H, protón vinílico en C-6)

SINTESIS DE 17- α -HIDROXI-16- β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX.

La obtención del sistema 4,6-dien-3-ona, se realizó mediante la reacción de bromación-dehidrobromación previamente descrita. (Shapiro E. 1972). En un matraz de 50 ml se adicionó 1g de compuesto hidrolizado **XXVIII**, 3.015 g de Li_2CO_3 , 2 g de LiBr y 14.28 ml de DMF, los cuales se mantuvieron en agitación y temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 0.67 g de bromo disueltos en 4.7 ml de dioxano. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a 80°C durante 2.25 hrs, después se enfrió y adicionaron 65 ml de agua conteniendo 12 g de Na_2HSO_3 . La suspensión se filtró y el sólido se secó a temperatura ambiente, obteniéndose un rendimiento de 85%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 7.

TABLA 7**PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS EL COMPUESTO OXIDADO XXIX.**

PT	312-315°C
PM	354 μm
UV	
λ_{max} 284 μm $\epsilon=31,167$	cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ conjugada en C-3
IR	
1750 cm^{-1}	carbonylo en C-3
1660 cm^{-1}	carbonylo en C-20
3450 cm^{-1}	hidroxilo en C-17 α
1300 cm^{-1}	
9.7 ppm	s (3H, metilo en C-18)
9.8 ppm	s (3H, metilo en C-19)
1.1 ppm	d (2H, metilo en C-19)
2.1 ppm	s (3H, metilo en C-21)
3.7 ppm	m (DMSO, disolvente)
5.3 ppm	d (H, protón en C-6)
5.6 ppm	s (1H, protón en C-4)
6.2 ppm	t (1H, protón en C-7)

SINTESIS DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN,3-20 DIONA XXX.
 Para llevar a cabo la esterificación en 17- α se tomaron en cuenta las recomendaciones para esterificar alcoholes impedidos estéricamente previamente publicadas. (Shapiro E. *et al* 1962; Shapiro E. *et al* 1972). En un matraz de 25 ml se adicionaron 1 g de compuesto oxidado XXIX, 10 ml de ácido butírico recién destilado, 5 ml de anhídrido trifluoroacético y 100 ml de ácido pTSA. La reacción se llevó a cabo con agitación, a temperatura ambiente durante 5 min, después de lo cual la mezcla se vertió sobre 5 ml de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 10% (p/v), y se extrajo 3 veces con 20 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se lavó con agua hasta llevarlo a un pH neutro, se secó con Na₂SO₄ anhidro, y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniéndose un rendimiento de 60%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 8.

TABLA 8

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO XXX.

FI	195-197°C
FM	
UV	412 nm
Imax 254 nm	cúmulos α - β insaturada en C-3
IR	
1664 cm ⁻¹	carbocilo de cetona en C-20
1720 cm ⁻¹	carbocilo de éster en C-17 α
1600 cm ⁻¹	
8.2 ppm	1 (1H, protón en C-18)
1.1 ppm	1 (3H, protón en C-19)
0.5 ppm	3 (3H, protón en C-16 β)
5.6 ppm	s (1H, protón vinílico en C-4)
6.2 ppm	s (2H, protones vinílicos en C-6 y C-7)

SINTESIS DE 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METH.-4-PREGNEN-3,20-DIONA XXXI. Para la oxidación de la doble ligadura en C6-C7, se utilizó la técnica con ácido metacloroperbenzónico (MCPBA) previamente reportada. (Shering A. 1967, Shering A. 1963; Shapiro E. *et al* 1972). En un matraz de 25 ml se adicionaron 100 mg del butirato **XXX** disueltos en 10 ml de CHCl₃ anhidro y 400 mg de MCPBA lentamente. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo con agitación durante 18 hrs en condiciones anhidras. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se lavó 5 veces con porciones de 50 ml de solución acuosa de Na₂CO₃ saturada. Posteriormente la fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó con Na₂SO₄ anhidro en reposo. Después de lo cual se evaporó el disolvente a sequedad, obteniéndose un rendimiento de 60%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 9.

TABLA 9
PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO XXXI.

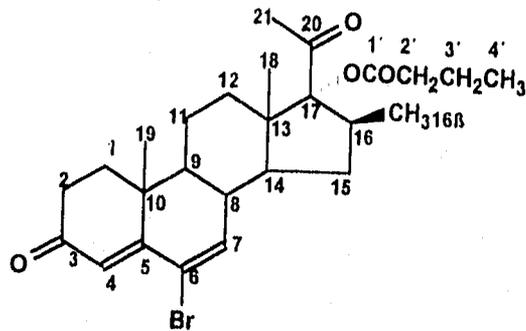
FI	163-165°C
PM	428 uma
UV	
λ_{max} 259 nm	cetona $\alpha\beta$ -insaturada en C-3
IR	
1728 cm ⁻¹	carbonilo de éster en C-17 α
1676 cm ⁻¹	cetona $\alpha\beta$ -insaturada en C-3
¹ H RMN	
0.8 ppm	s (3H, metilo en C-18)
1.1 ppm	s (3H, metilo en C-19)
1.4 ppm	d (3H, metilo en C-16 β)
1.0 ppm	t (3H, metilo en éster butirato)
1.9 ppm	s (3H, metilo en C-21)
2.3 ppm	q (3H, metileno intermedio de butirato)
3.3 ppm	d (1H, base de epóxido en C-7)
3.5 ppm	d (1H, base de epóxido en C-6)
6.1 ppm	s (1H, protón vinílico en C-4)

SINTESIS DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII. La introducción del halógeno en C-6 se realizó mediante la técnica de formación de la halohidrina correspondiente y su posterior deshidratación, reportada previamente. (Akagi, S. y Tsuda, K. 1961, Shapiro E. *et al* 1972, Shibata K. 1992). En un matraz de 50 ml se colocaron 0.8 g del compuesto epóxido **XXXI** y 8 ml de ácido acético glacial. La mezcla se puso en agitación y una vez disuelto todo el compuesto se añadieron gota a gota 2.5 ml de solución de HBr al 28% en ácido acético glacial. Se puso en agitación, a temperatura ambiente, durante 2 h, después de lo cual se calentó la mezcla a 40°C durante 45 min. La mezcla de reacción se enfrió en baño de hielo y se neutralizó con solución de NaHCO₃ al 5 % (p/v) y se extrajo 3 veces con porciones de 50 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄ anhidro en reposo. Se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad, obteniéndose un rendimiento de 47%. Las constantes físicas y espectroscópicas se presentan a continuación en la tabla 10.

TABLA 10
PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO FINAL
XXXII.

Pf	170-172°C
PM	490 (M+1=491)
UV λ_{max} 284 nm	cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -insaturada
IR	
1690 cm ⁻¹	cetona en C-20
1722 cm ⁻¹	carbonilo de éster
1660 cm ⁻¹	cetona $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -insaturada
¹ H RMN	
0.7 ppm	s(3H, metilo C-18)
0.9 ppm	t(3H, metilo en C-4)
1.1 ppm	s(3H, metilo en C-19)
1.4 ppm	d(3H, metilo en C-16 β)
1.7 ppm	m(2H, metileno en C-3')
1.8 ppm	m(H, protón en C-8)
2.0 ppm	t(3H, metilo en C-21)
2.3 ppm	t(2H, metileno en 2')
2.5 ppm	m(2H, metileno en C-2)
6.3 ppm	s(H, protón en C-7)
6.6 ppm	s(H, protón en C-8)

TABLA 11. ASIGNACIONES DE DESPLAZAMIENTO QUIMICO DEL COMPUESTO FINAL XXXII EN $^{13}\text{CRMN}$.



CARBON No.	δ QUIMICO ppm	CARBON No.	δ QUIMICO
1	34.48	14	46.33
2	34.15	15	32.20
3	198.81	16	49.46
4	126.62	17	94.76
5	121.41	18	14.7
6	159.20	19	19.65
7	142.65	20	203.81
8	39.68*	21	28.14
9	46.47*	16B	14.37
10	38.45	1'	173.47
11	18.61*	2'	36.56
12	33.7	3'	20.19*
13	48.36	4'	13.75

* asignación insegura.

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA.

La actividad antiandrogénica de los derivados sintetizados se llevo a cabo tomando como parámetro de la potencia antiandrogénica de los compuestos, la capacidad para inhibir la actividad de la enzima 5- α -reductasa, ya que ésta convierte la testosterona **XX** a DHT **XXII** que se considera un andrógeno más potente (Mallamo J. *et al* 1972).

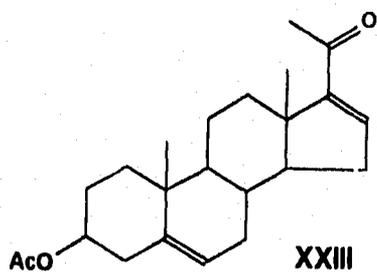
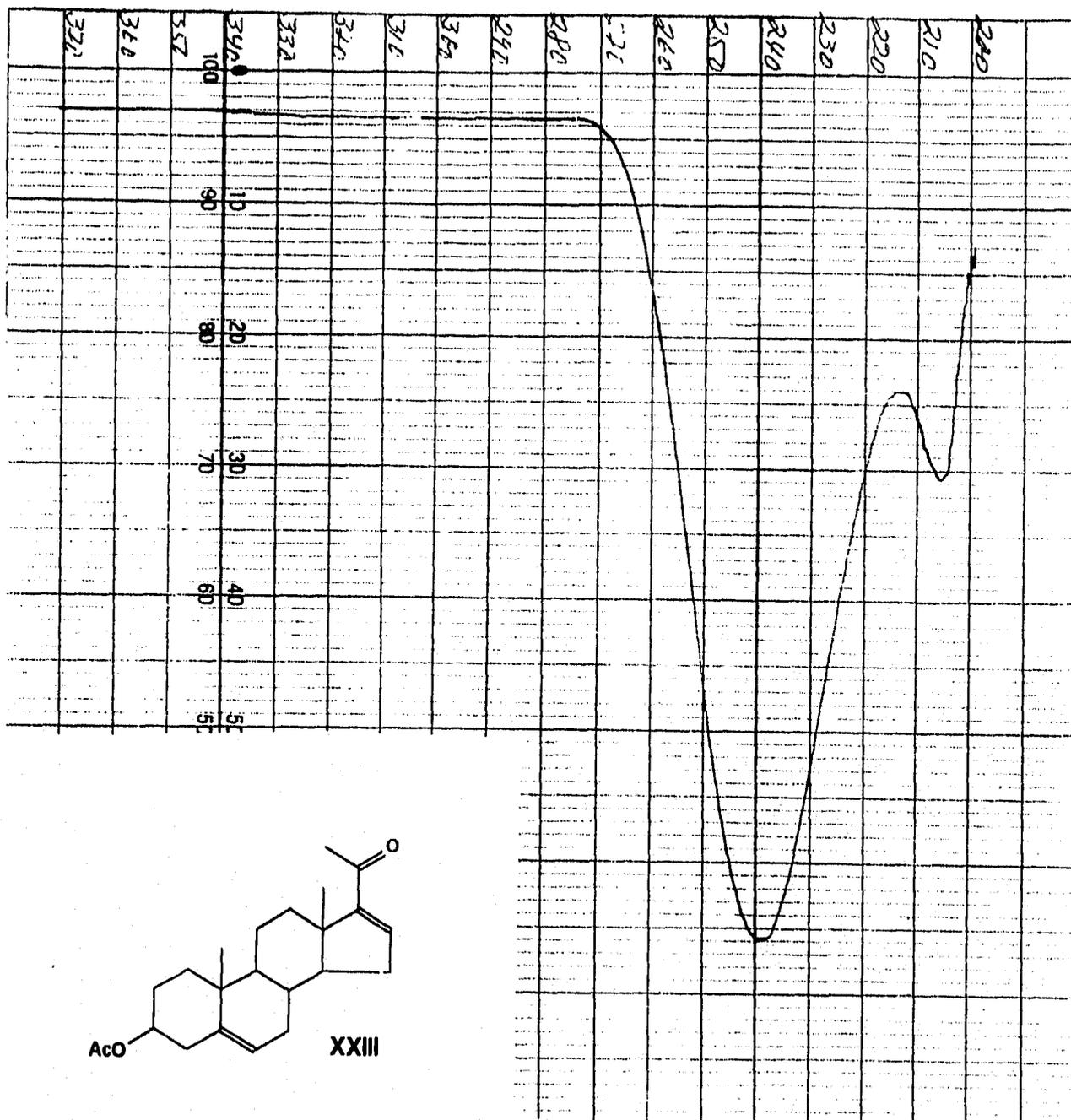
OBTENCION DEL EXTRACTO CONCENTRADO DE PROTEINAS

Siguiendo técnicas de extracción de la enzima previamente publicadas (Frederiksen, D. y Wilson, J. 1971; Usui T. *et al* 1987), se dispuso de 2 ratas macho de 250 g de peso, sacrificándolas por desnucamiento. Inmediatamente fueron extraídos el hígado y los testículos. Estos tejidos se homogeneizaron por separado en 2 partes de solución de KCl 0.17 M; El extracto se filtró y centrifugó a 15,000 x g durante 30 min, se recuperó el sobrenadante y se saturó al 50% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en frío, el precipitado formado se dializó en contra de 1 l de buffer Tris-HCl 50mM pH 7.3 durante 24 hrs, El dializado obtenido se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto concentrado de proteínas para realizar el ensayo enzimático. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. La proteína del extracto se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica de bovino como estándar (Bradford. 1984).

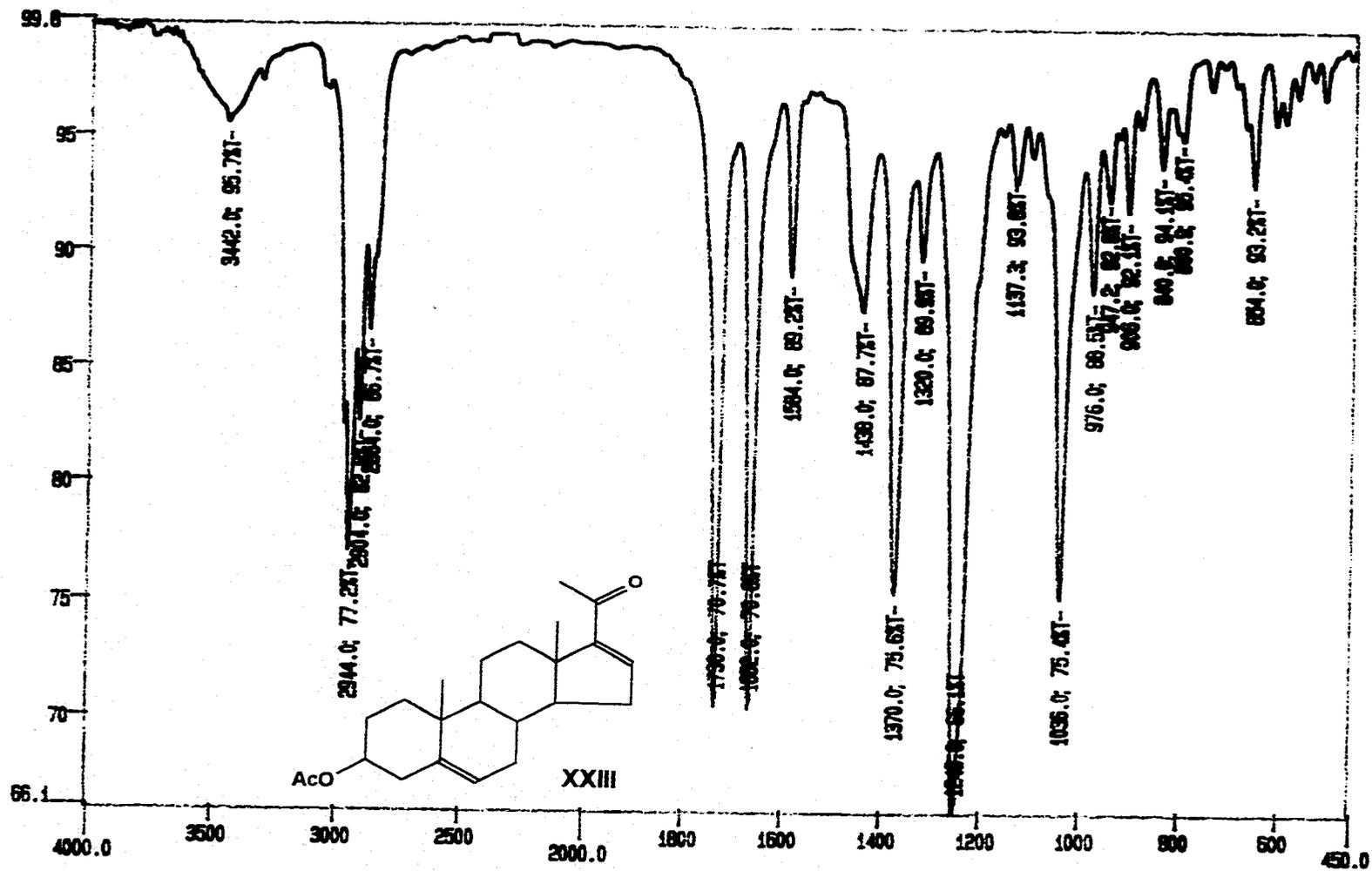
CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD DE 5- α -REDUCTASA.

La cuantificación de actividad de 5- α -reductasa se realizó incubando 100 μg de proteína del extracto concentrado obtenido, en un medio de reacción que contenía: testosterona 500 μM , buffer Tris-HCl 100 mM pH 7, NADPH 100 μM . Se incubo durante 30 min a 37°C con agitación y se determinó la variación de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2.

APENDICE B. ESPECTROSCOPIA

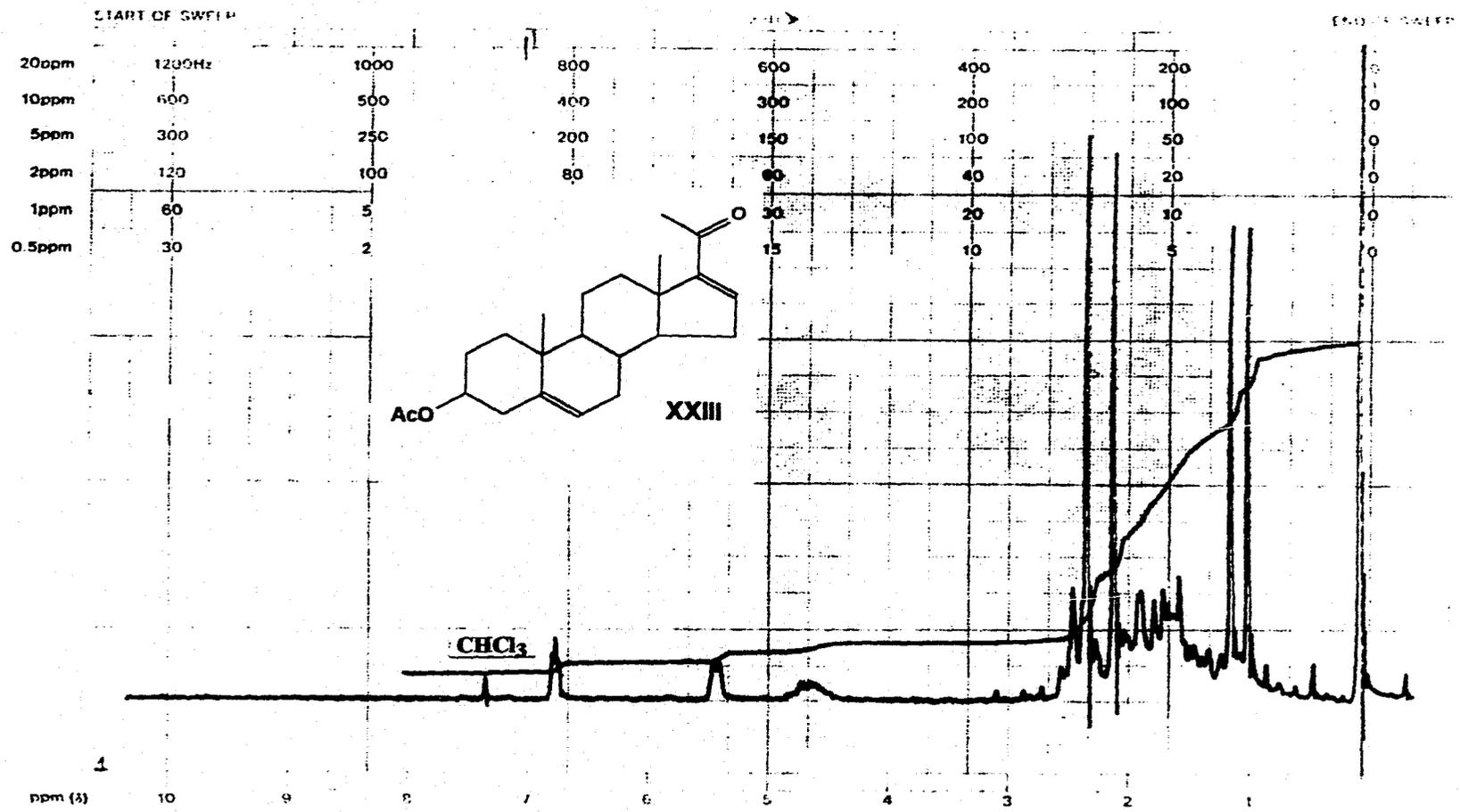


ESPECTRO 1. ESPECTRO DE UV DE 16-DEHIDROPREGNEOLONA XXIII.



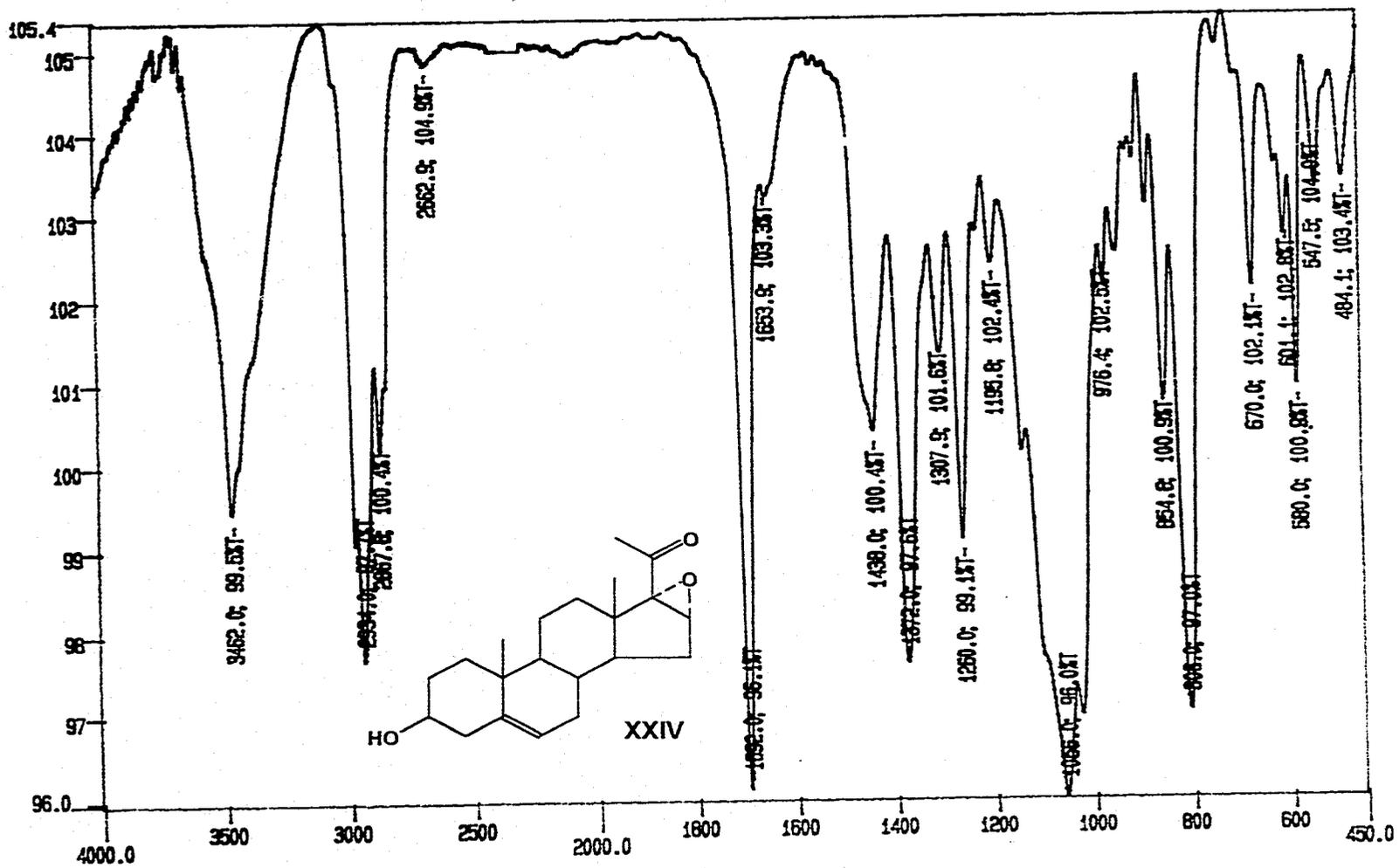
ESPECTRO 2. ESPECTRO DE IR DE ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNEOLONA XXIII.

varian instrumentsdivision
palo alto california

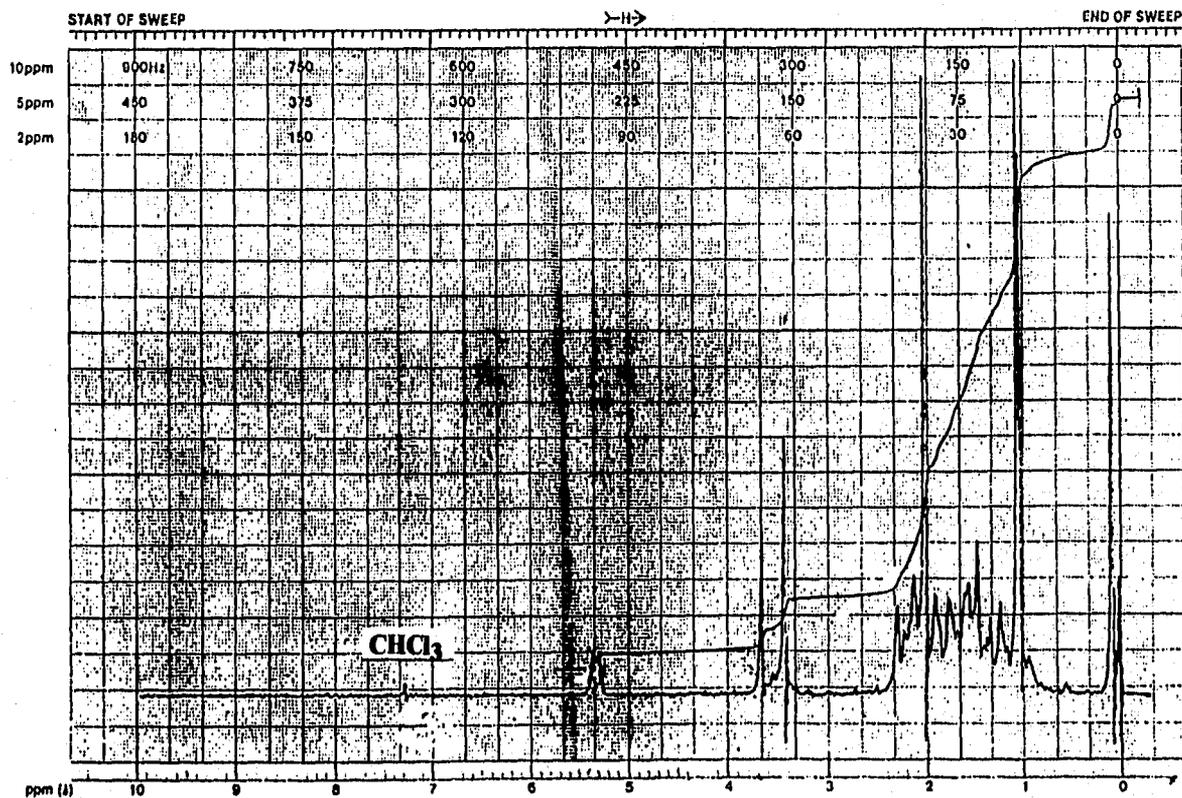
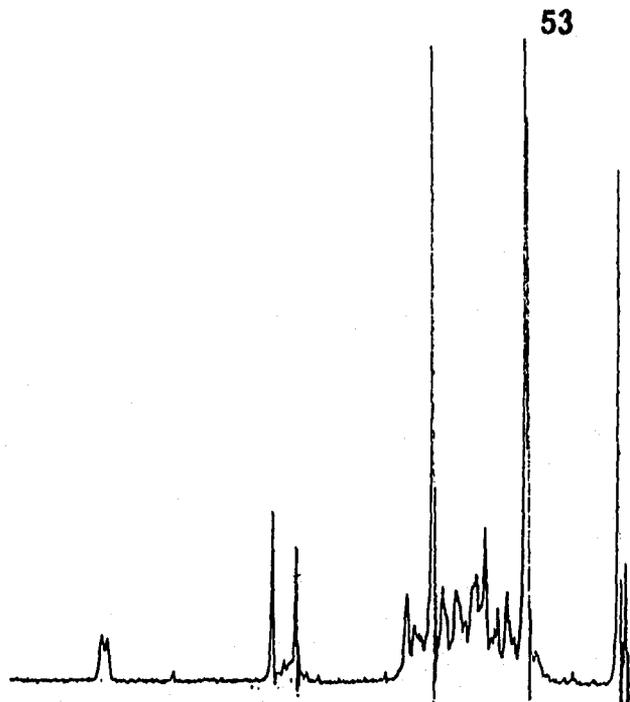
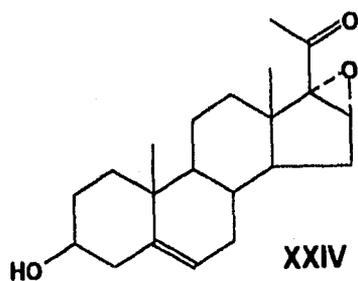


EM-360 60 MHz NMR SPECTROMETER

ESPECTRO 3. ESPECTRO DE ¹HRMN DEL ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA XXIII.

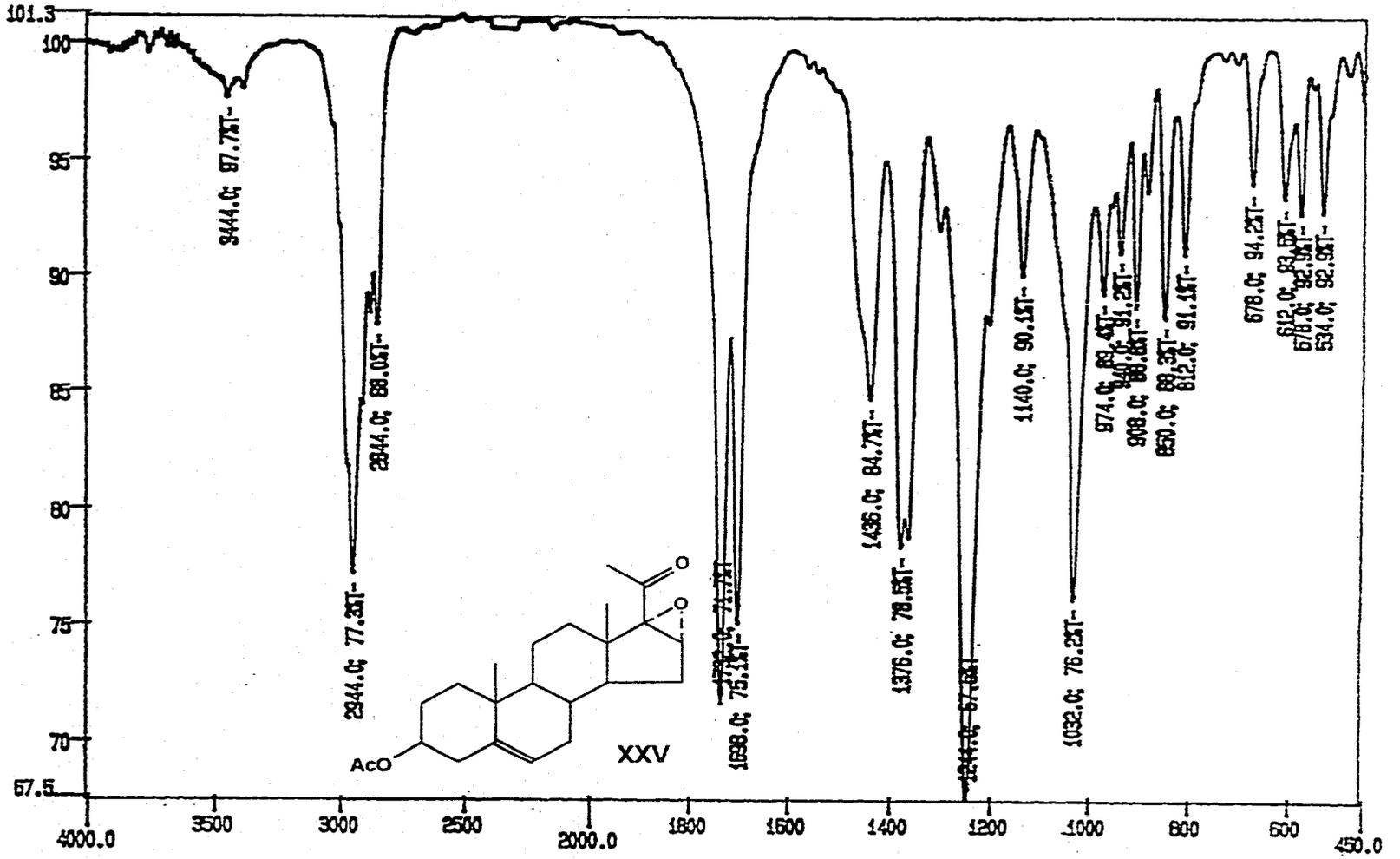


ESPECTRO 4. ESPECTRO DE IR DE 16 α -17 α -EPOXI-3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA XXIV.



ESPECTRO 5. ESPECTRO DE ¹HRMN DE 16 α -17 α -EPOXI-3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA XXIV.

51



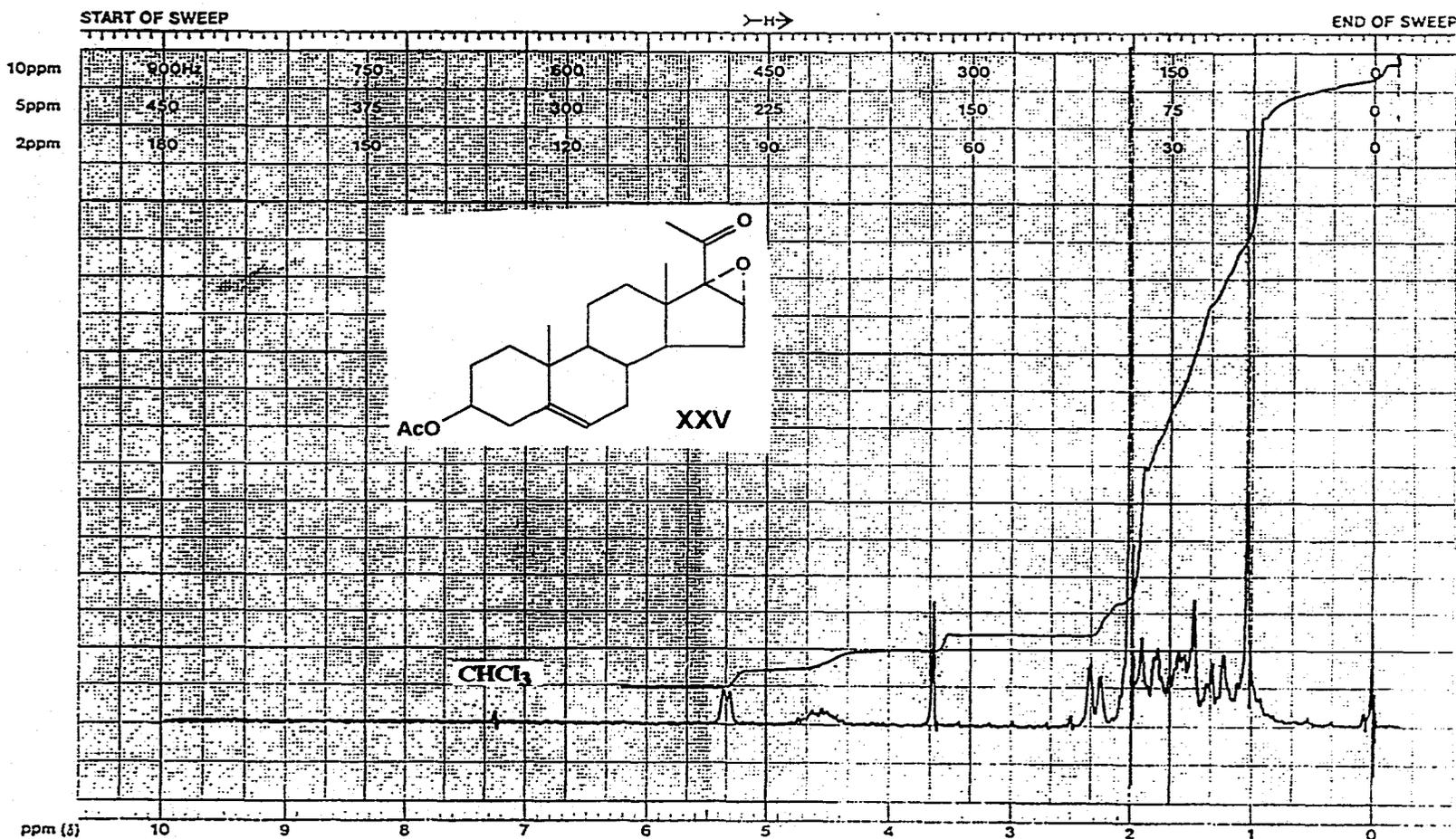
ESPECTRO 6. ESPECTRO DE IR DE 3β-ACETOXI-16α-17α-EPOXI-4-PREGNEN-20-ONA XXV.

PRINTED IN U.S.A.

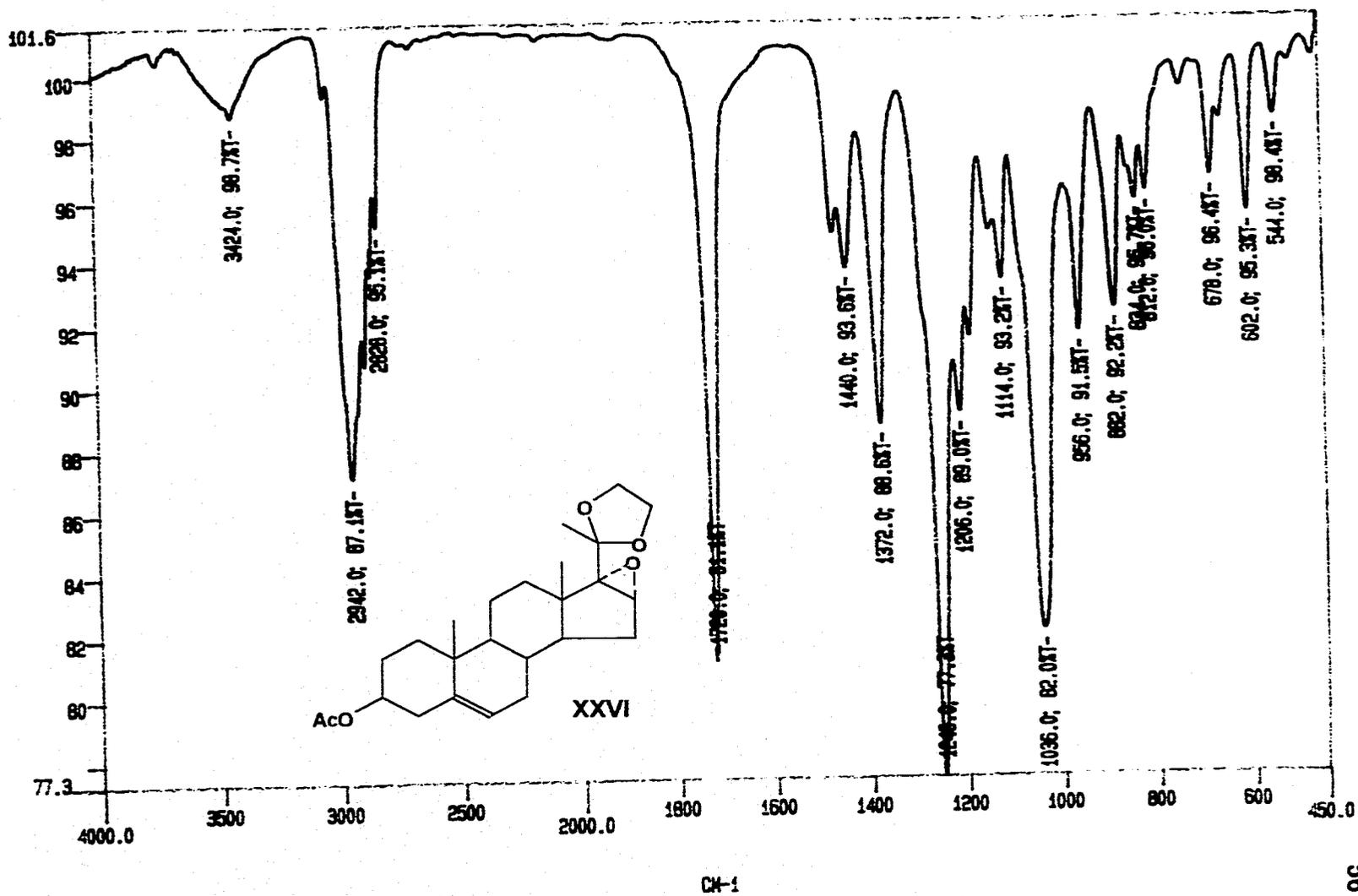
PART NO. 810208-01



varian instrument division palo alto, california



ESPECTRO 7. ESPECTRO DE ¹BRMN DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-4-PREGNEN-20-ONA XXV.



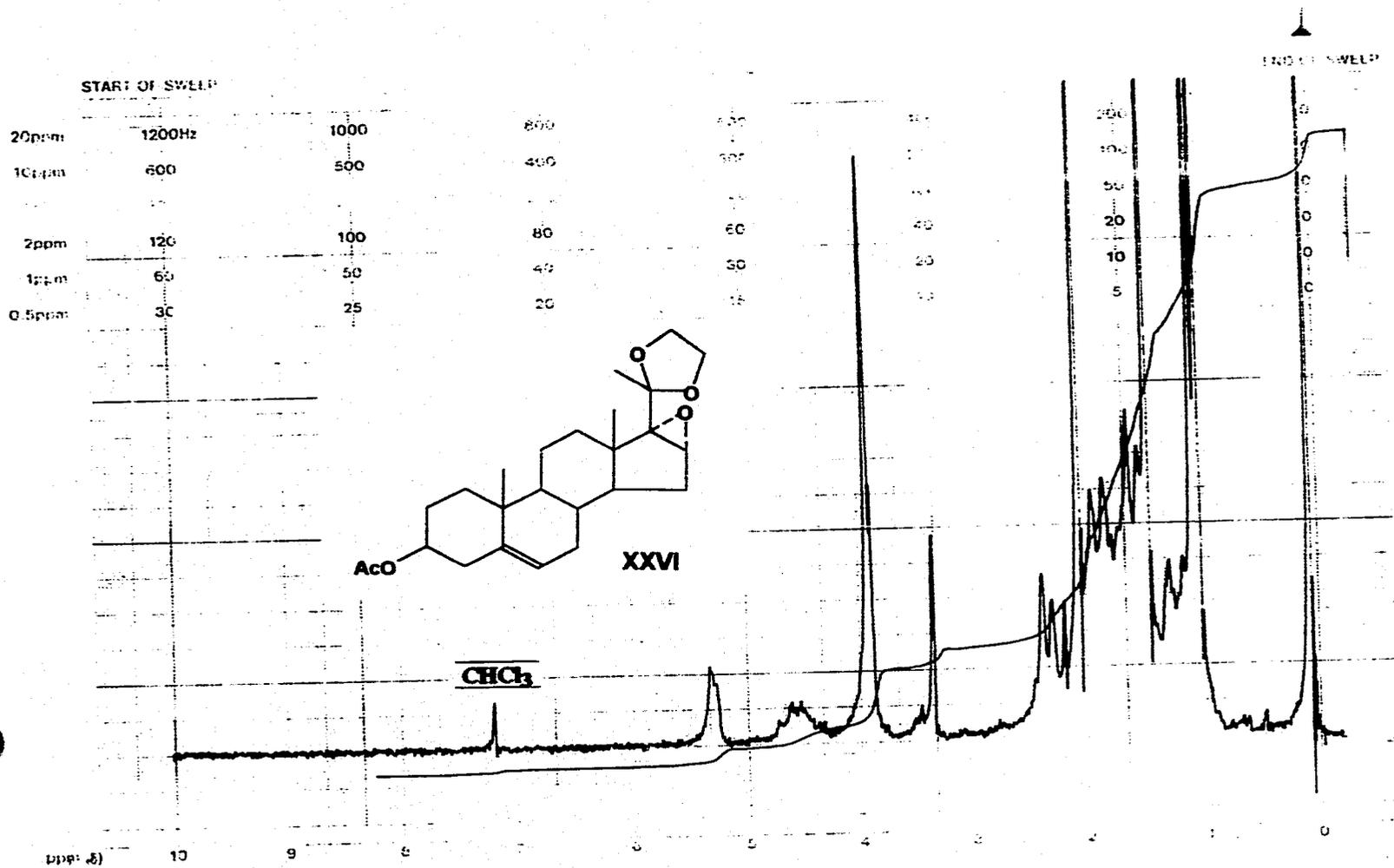
ESPECTRO 8. ESPECTRO DE IR DE 3 β -ACETOXI-16 α -17 α -EPOXI-20-ETILENDIOXI-5-PREGNENO XXVI.

MODEL NO. V-6000-B2

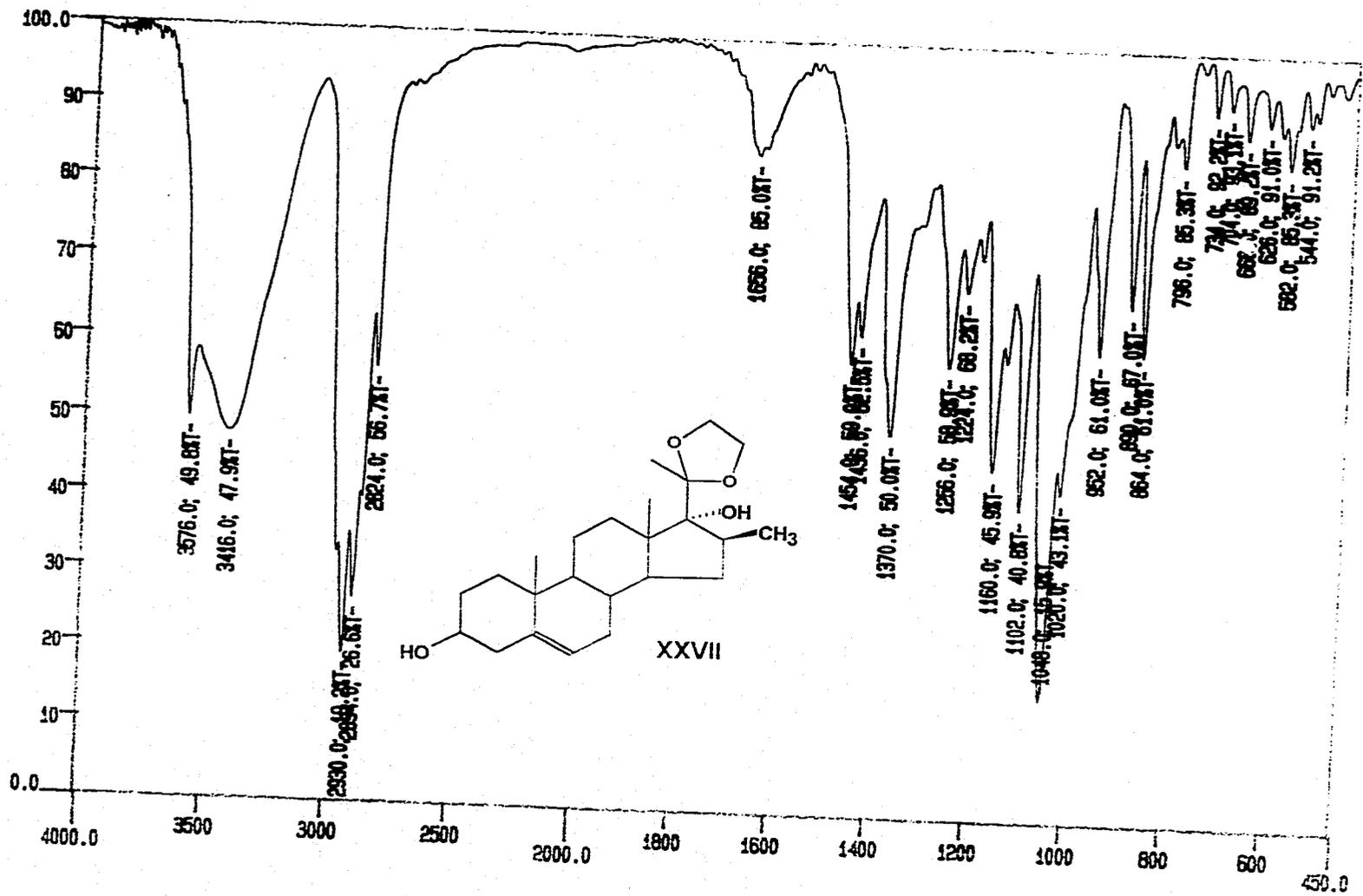
varian instrument division



pat. alto, calif. u.s.a.

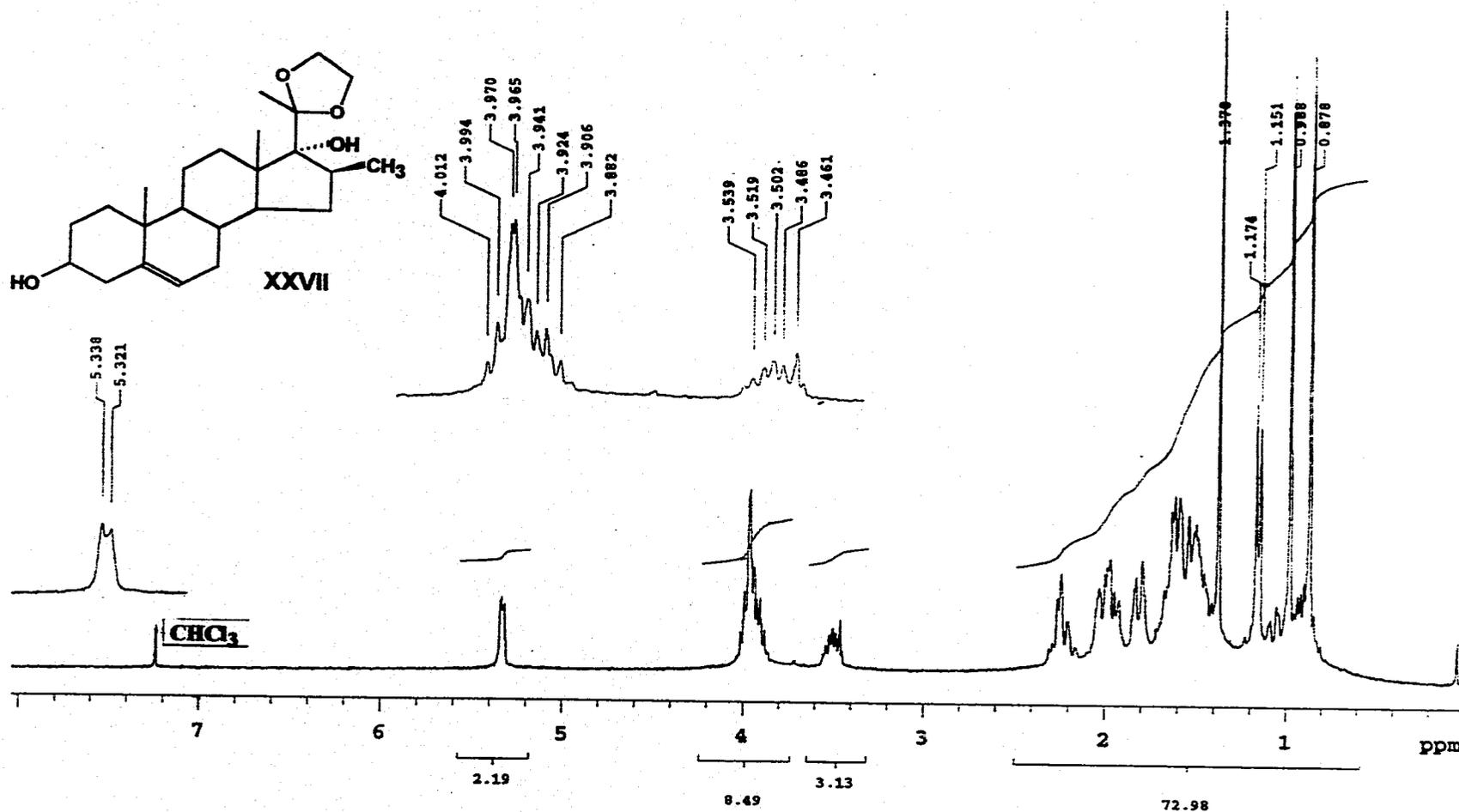


ESPECTRO 9. ESPECTRO DE ¹HRMN DE 3β-ACETOXI-16α-17α-EPOXI-20-ETILENDIOXI-5-PREGNENO XXVI.

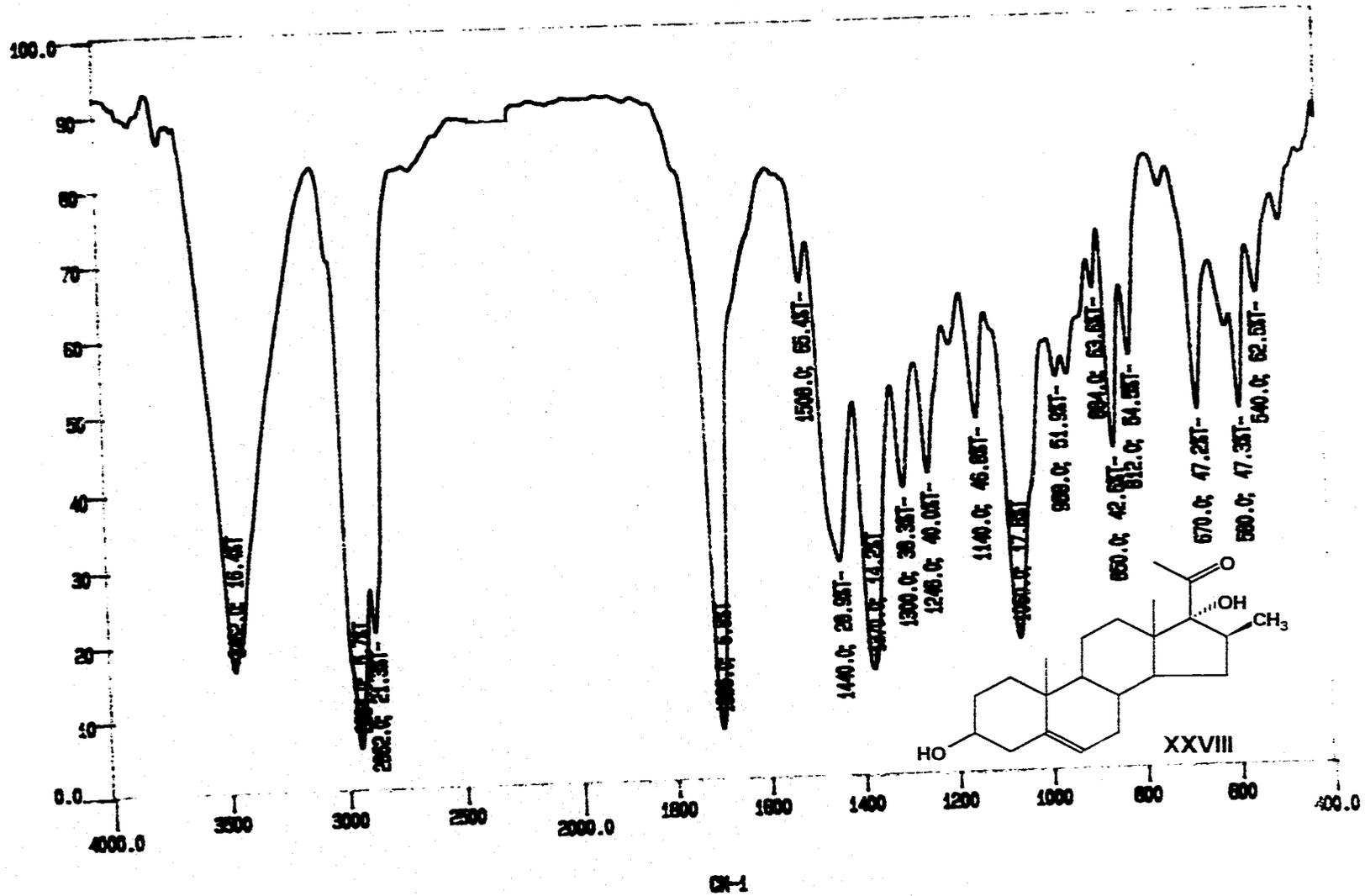


62-1

ESPECTRO 10. ESPECTRO DE IR DE 20-ETILENDIOXI-3β-17α-DIHIDROXI-16β-METIL-5-PREGNENO XXVII.



ESPECTRO 11. ESPECTRO DE ¹HRMN DE 20-ETILENDIOXI-3 β -17 α -DIHIDROXI-16 β -METIL-5-PREGNENO XXVII.

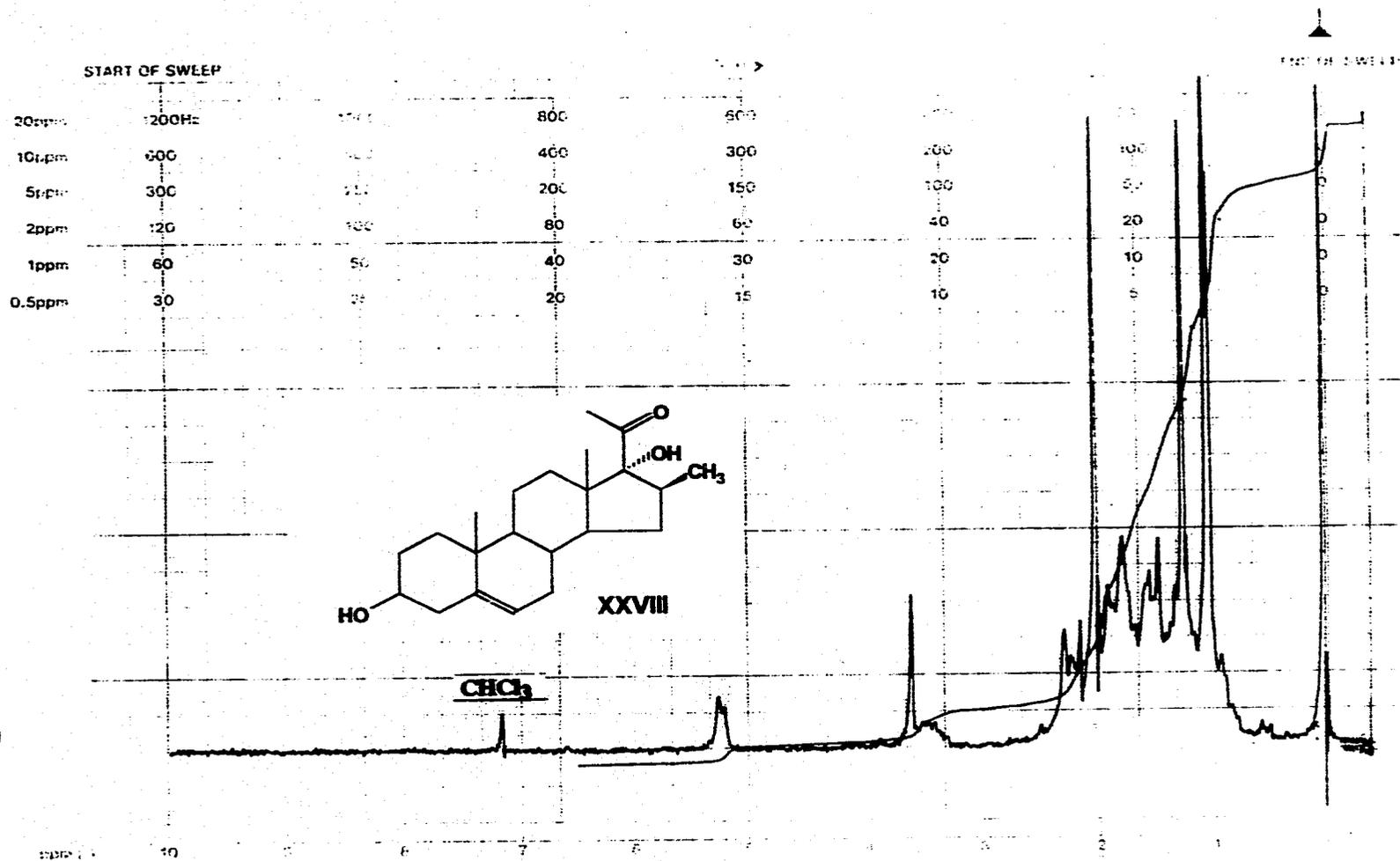


ESPECTRO 12. ESPECTRO DE IR DE 3β-17α-DIHIDROXI-16β-METIL-5-PREGEN-20-ONA XXVIII.

PRINTED IN U.S.A.

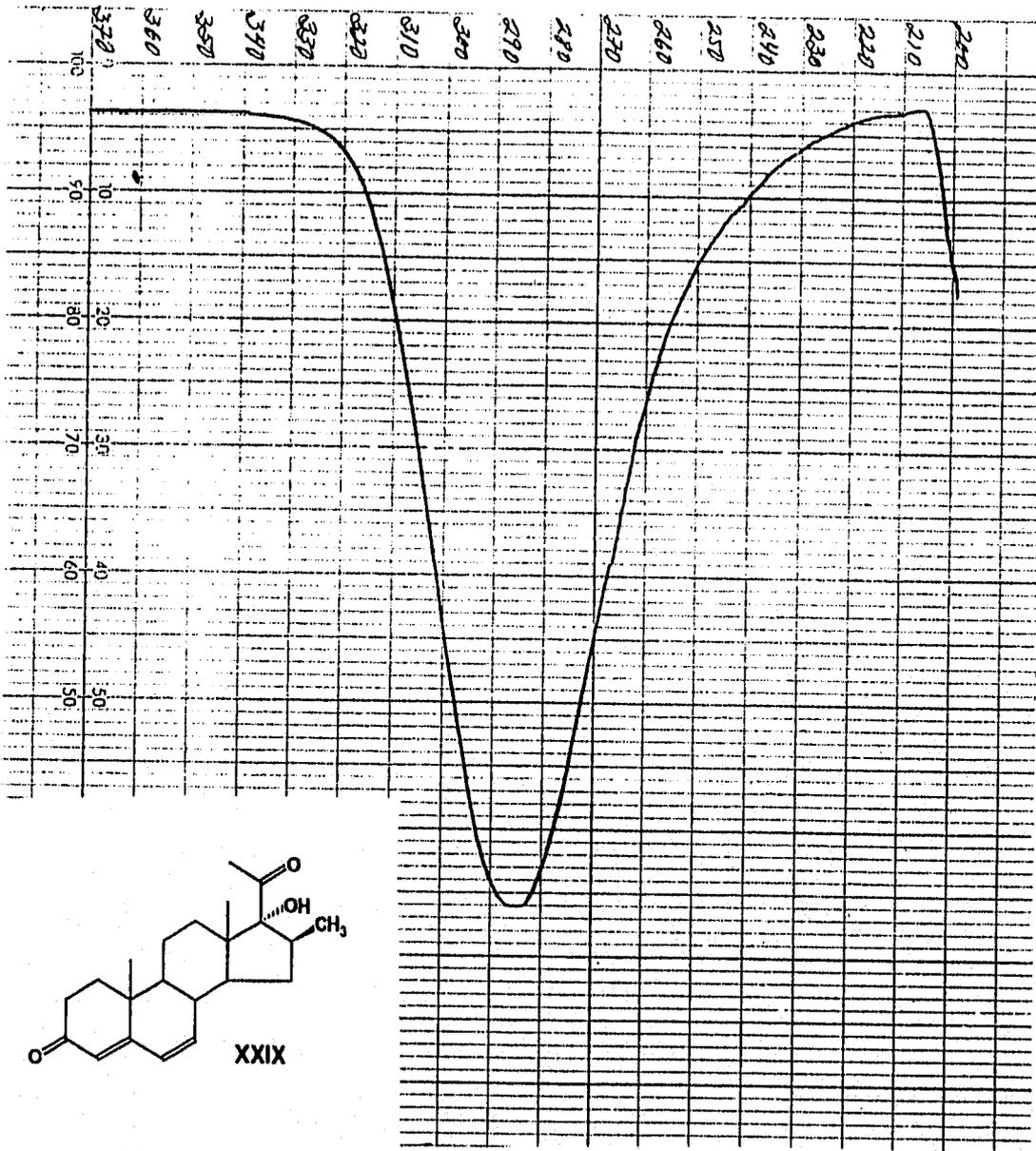
PART NO. 910301-03

varian instrument division
palo alto, california

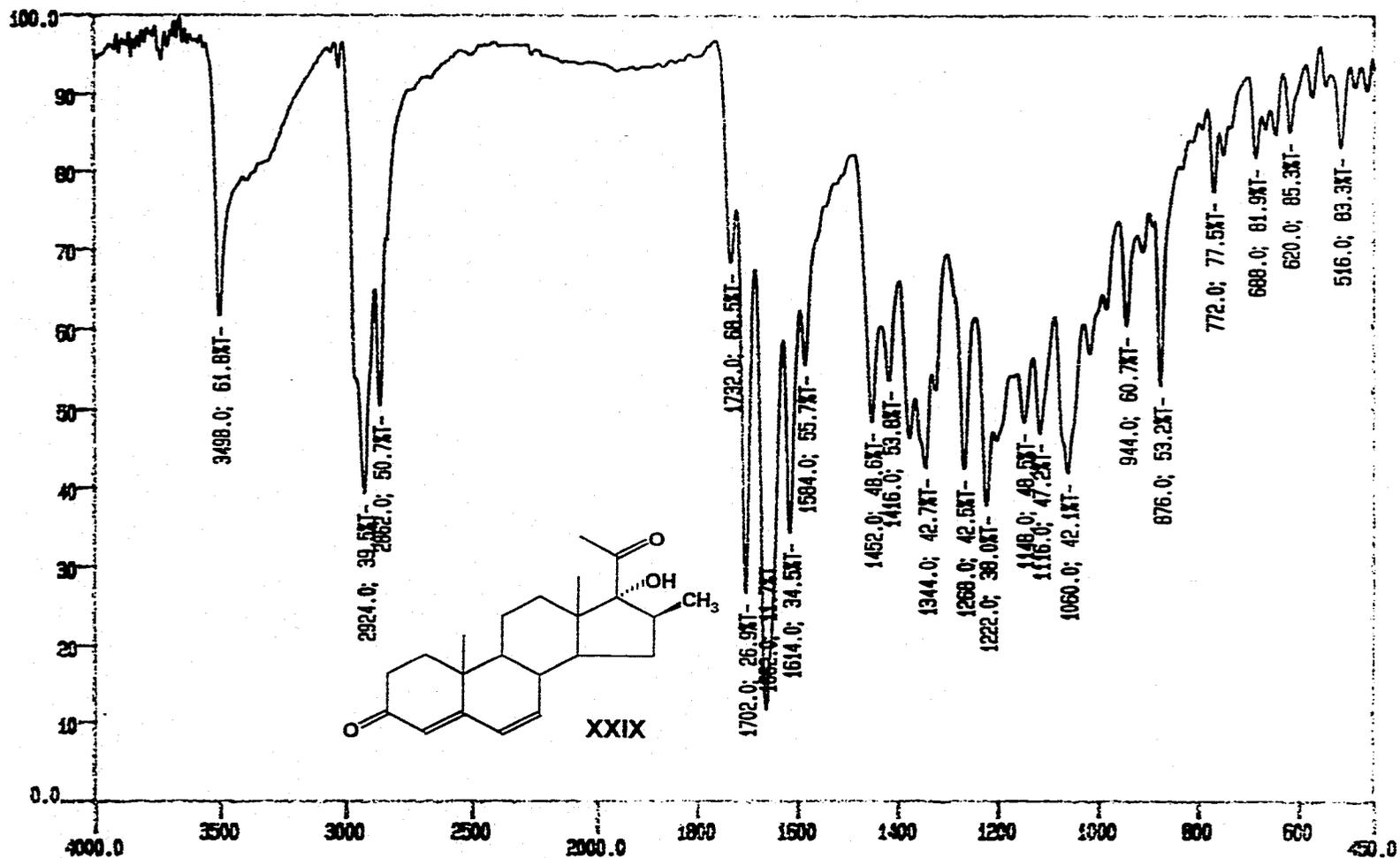


EM-360 60 MHz NMR SPECTROMETER

ESPECTRO 13. ESPECTRO DE ¹H RMN DE 3β-17α-DIHIDROXI-16β-METIL-5-PREGNEN-20-ONA XXVIII.



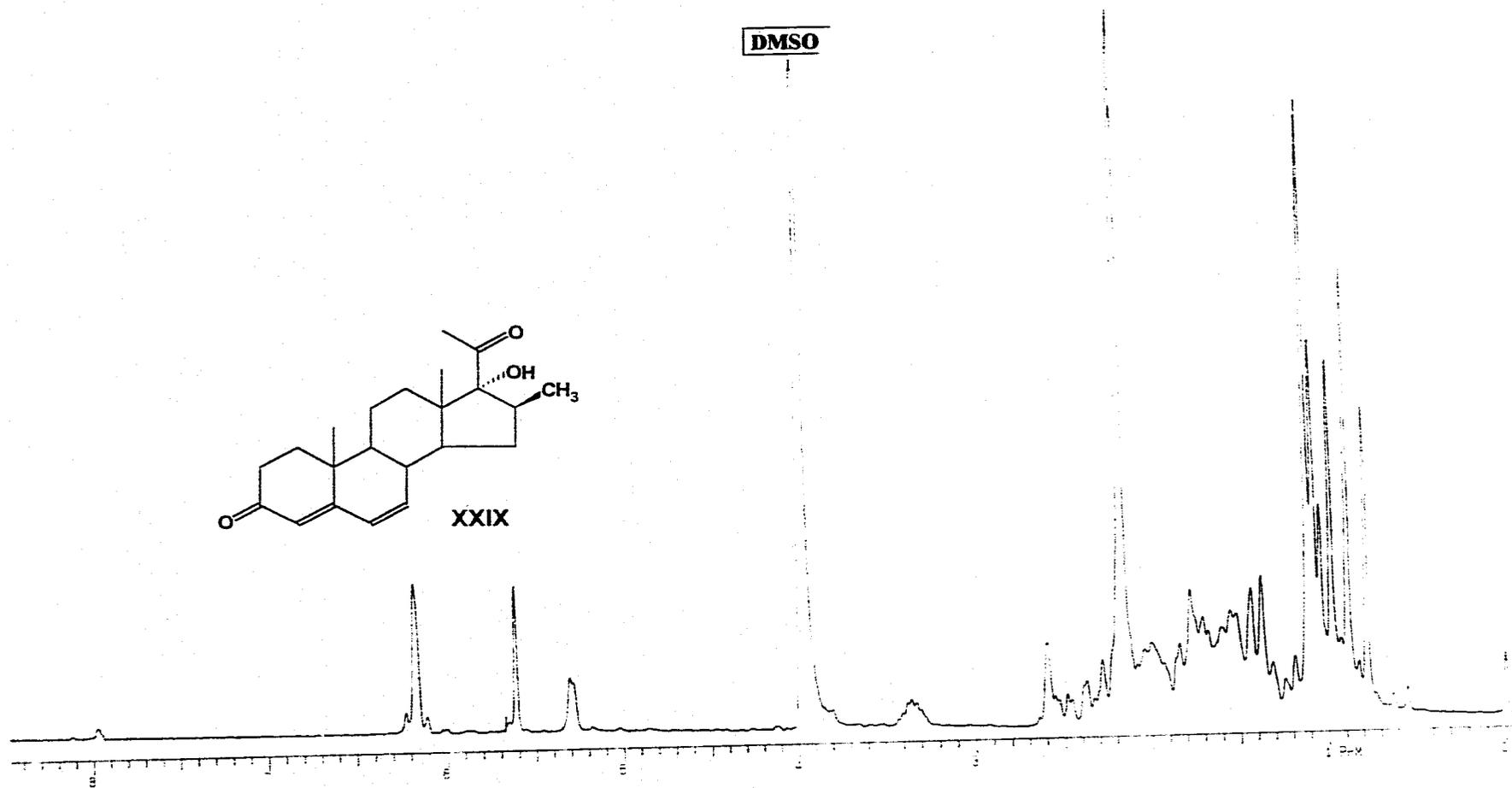
ESPECTRO 14. ESPECTRO DE UV DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX.



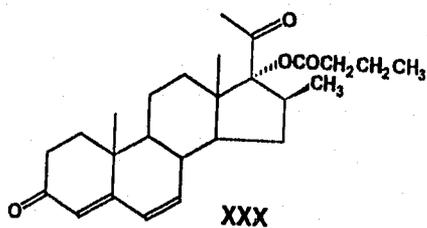
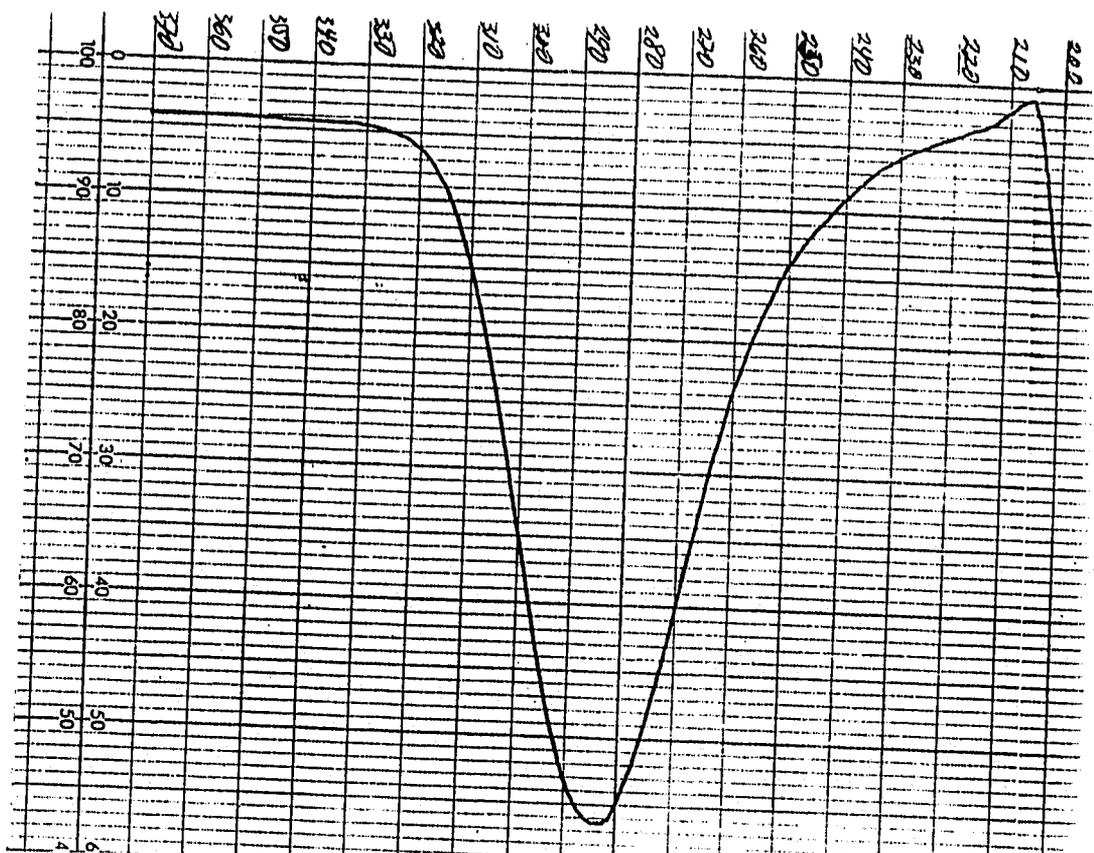
CF-1

69

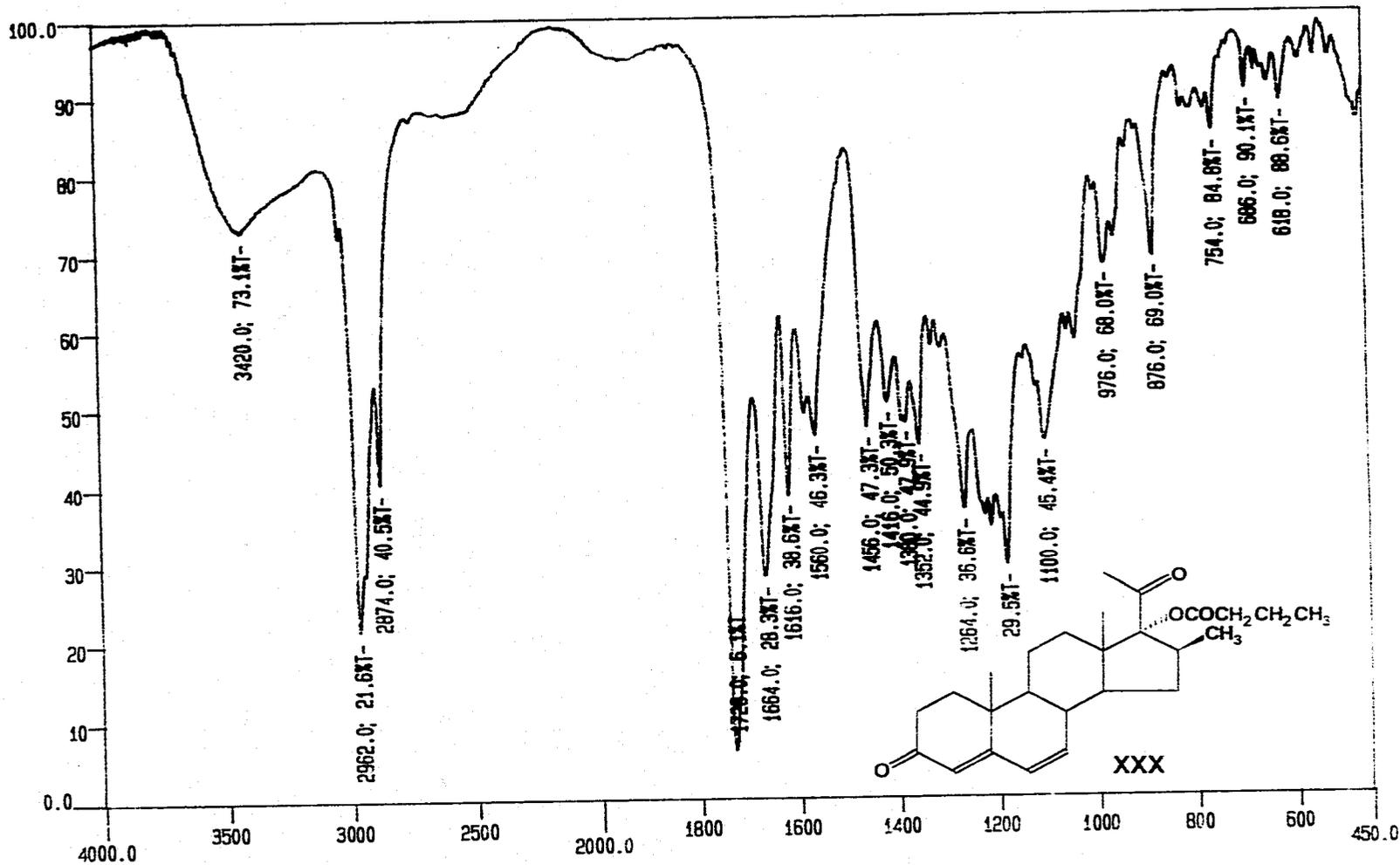
ESPECTRO 15. ESPECTRO DE IR 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX.



ESPECTRO 16. ESPECTRO DE ¹HRMN DE 17 α -HIDROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXIX.

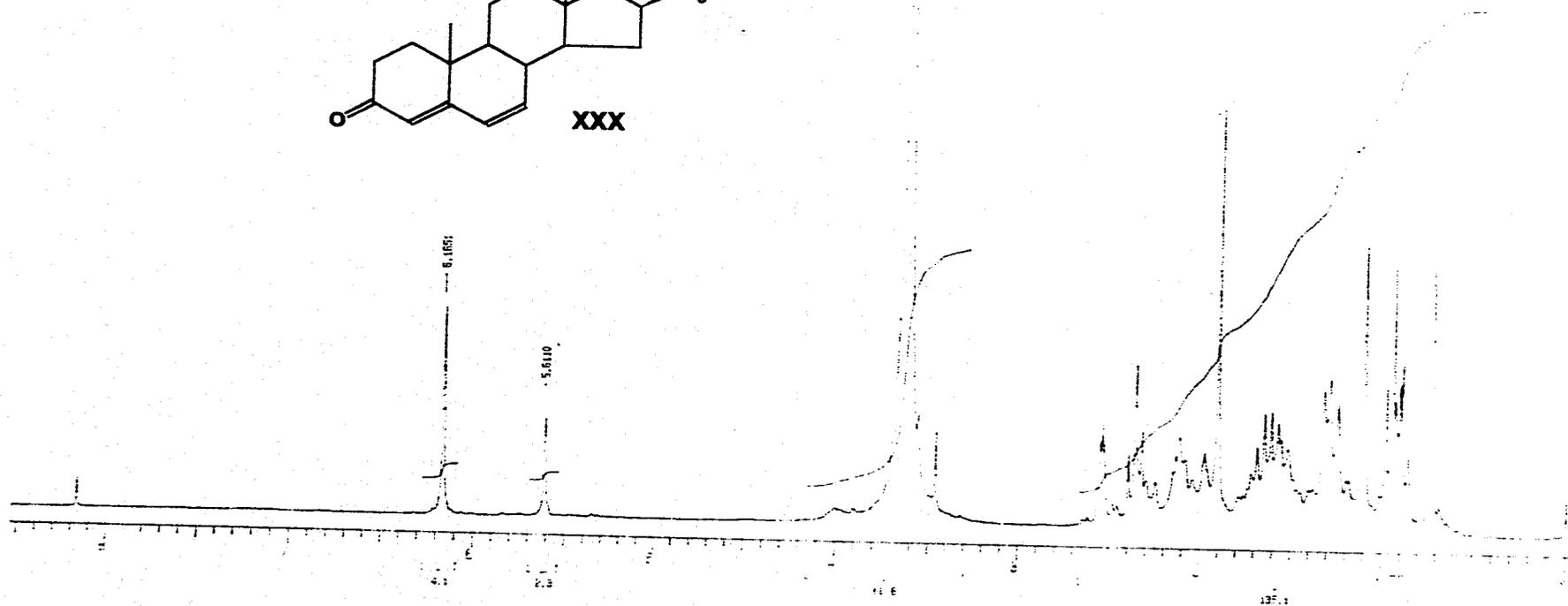
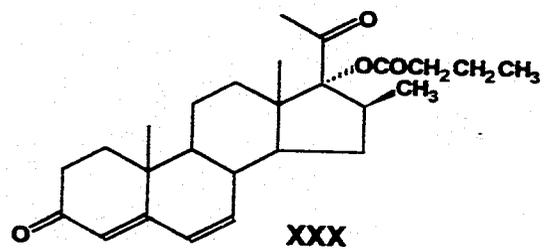


ESPECTRO 17. ESPECTRO DE UV DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX.

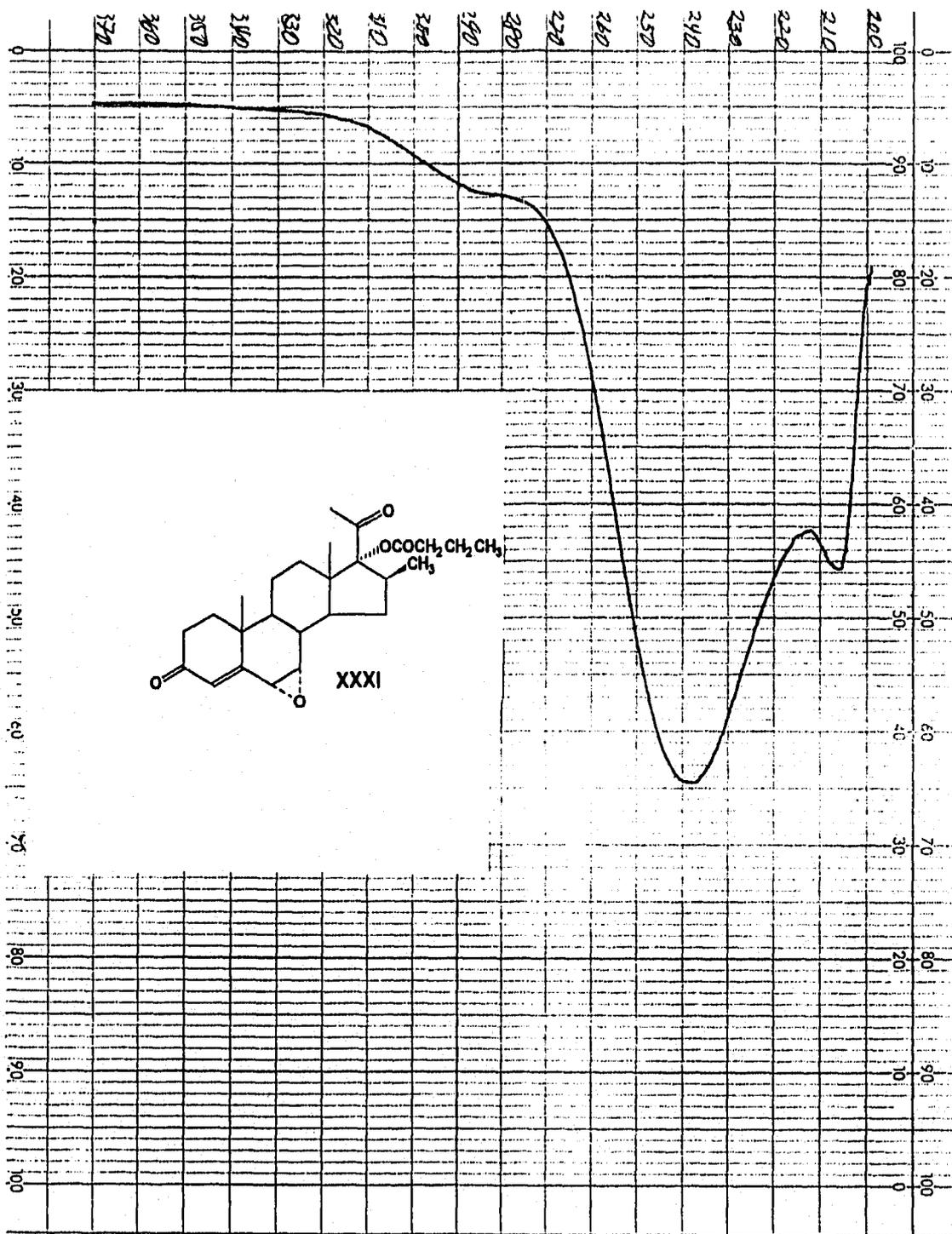


ESPECTRO 18. ESPECTRO DE IR 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX.

DMSO

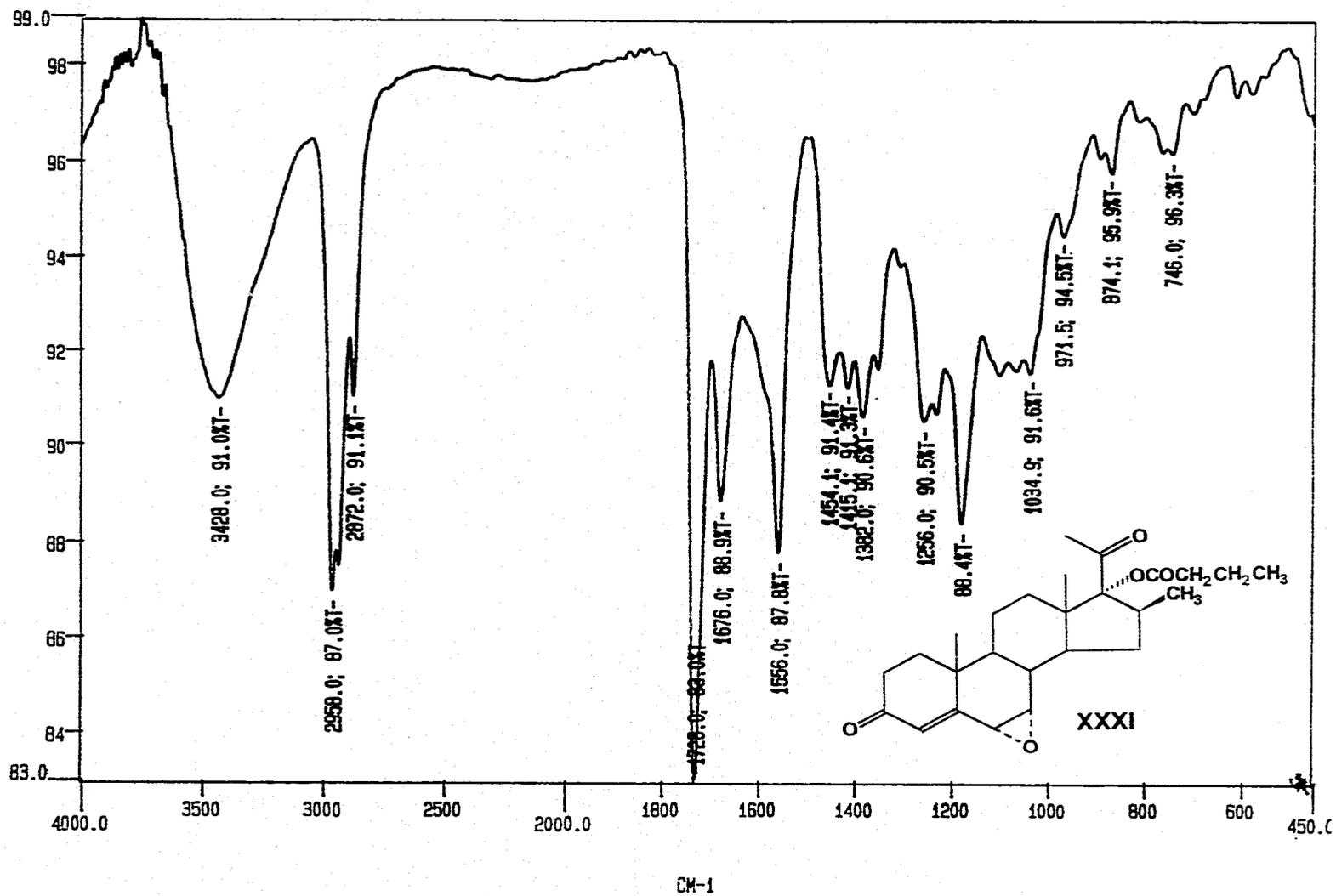


ESPECTRO 19. ESPECTRO DE ¹HRMN 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXX.



ESPECTRO 20. ESPECTRO DE UV DE 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METIL-4-PREGEN-3,20-DIONA XXXI.

ST



ESPECTRO 21. ESPECTRO DE IR 17 α -BUTIROXI-6 α -7 α -EPOXI-16 β -METIL-4-PREGNEN-3,20-DIONA XXXI.

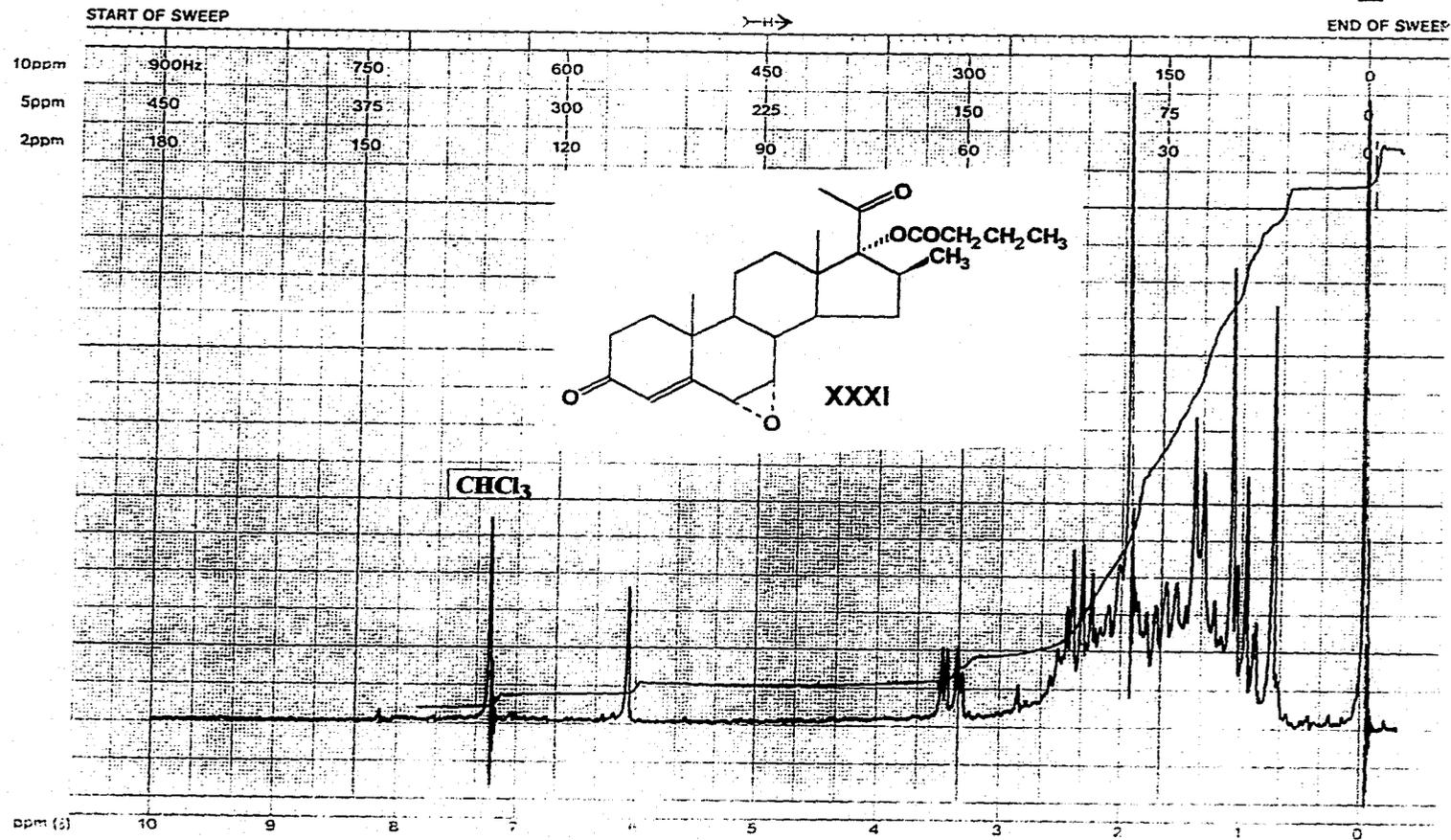
PRINTED IN U.S.A.

PART NO. V-0000-02



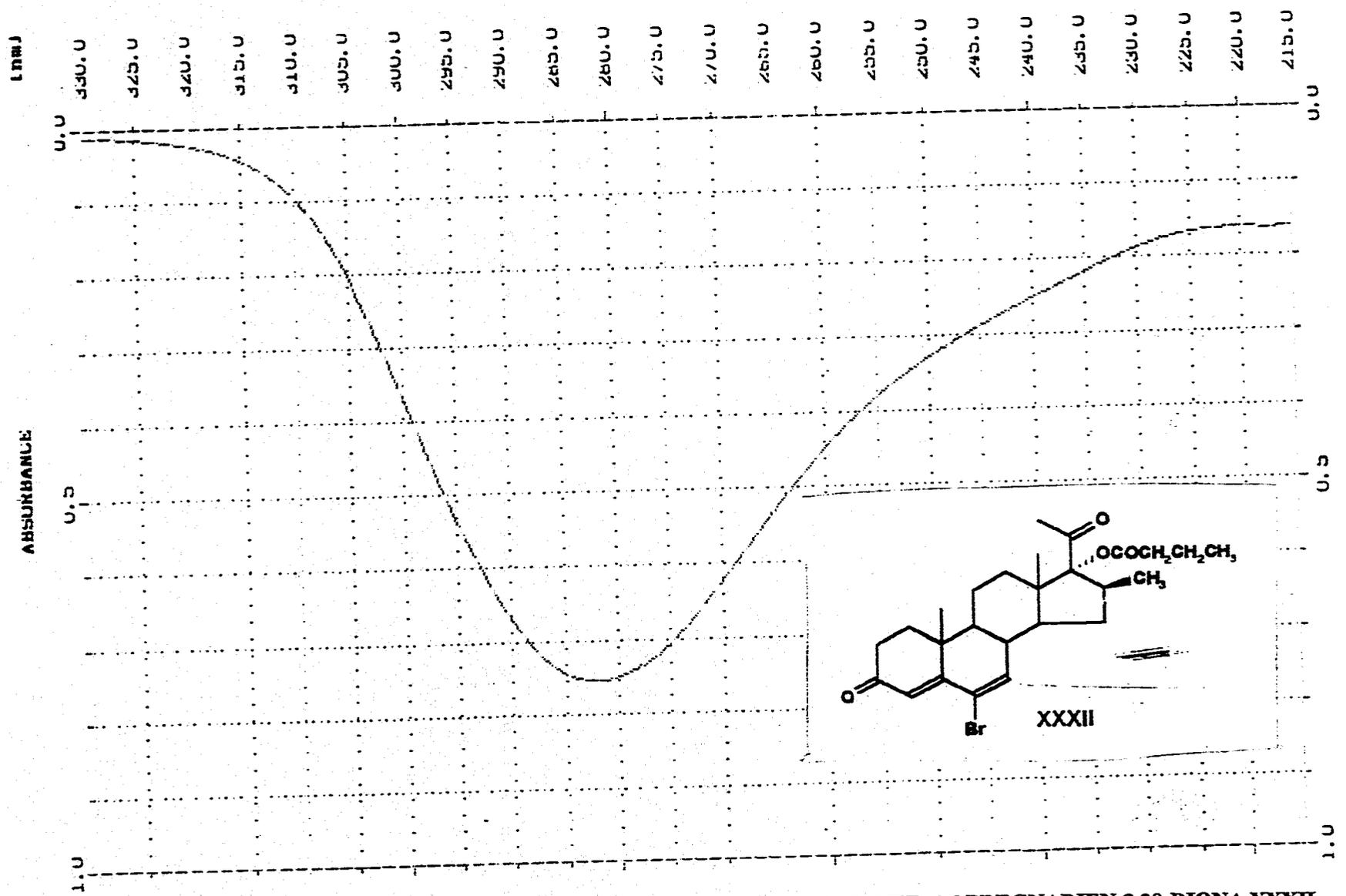
varian instrument division

palo alto, california



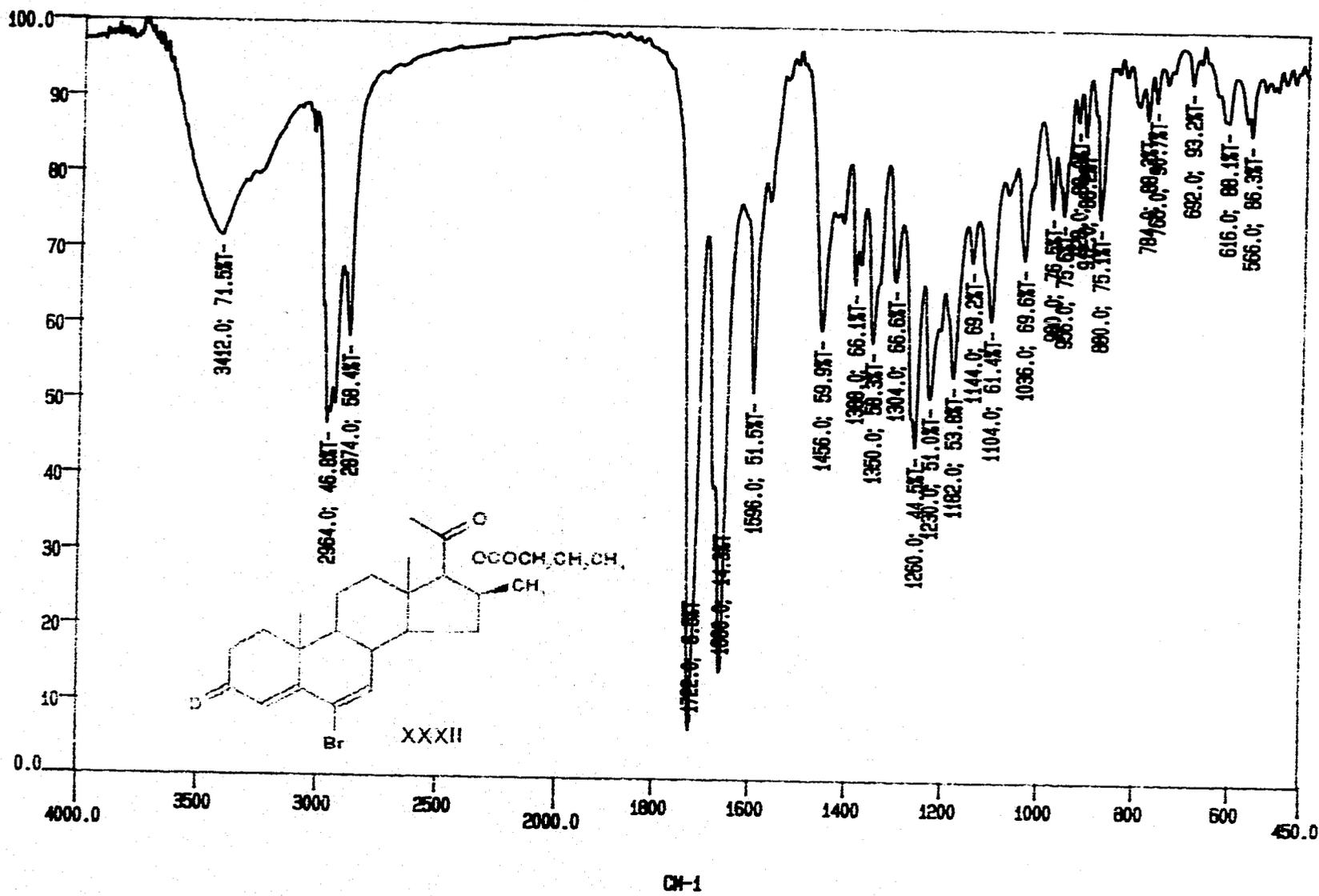
EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

ESPECTRO 22. ESPECTRO DE ¹HRMN 17α-BUTIROXI-6α-7α-EPOXI-16β-METIL-4-PREGNEN-3,20-DIONA XXXI.

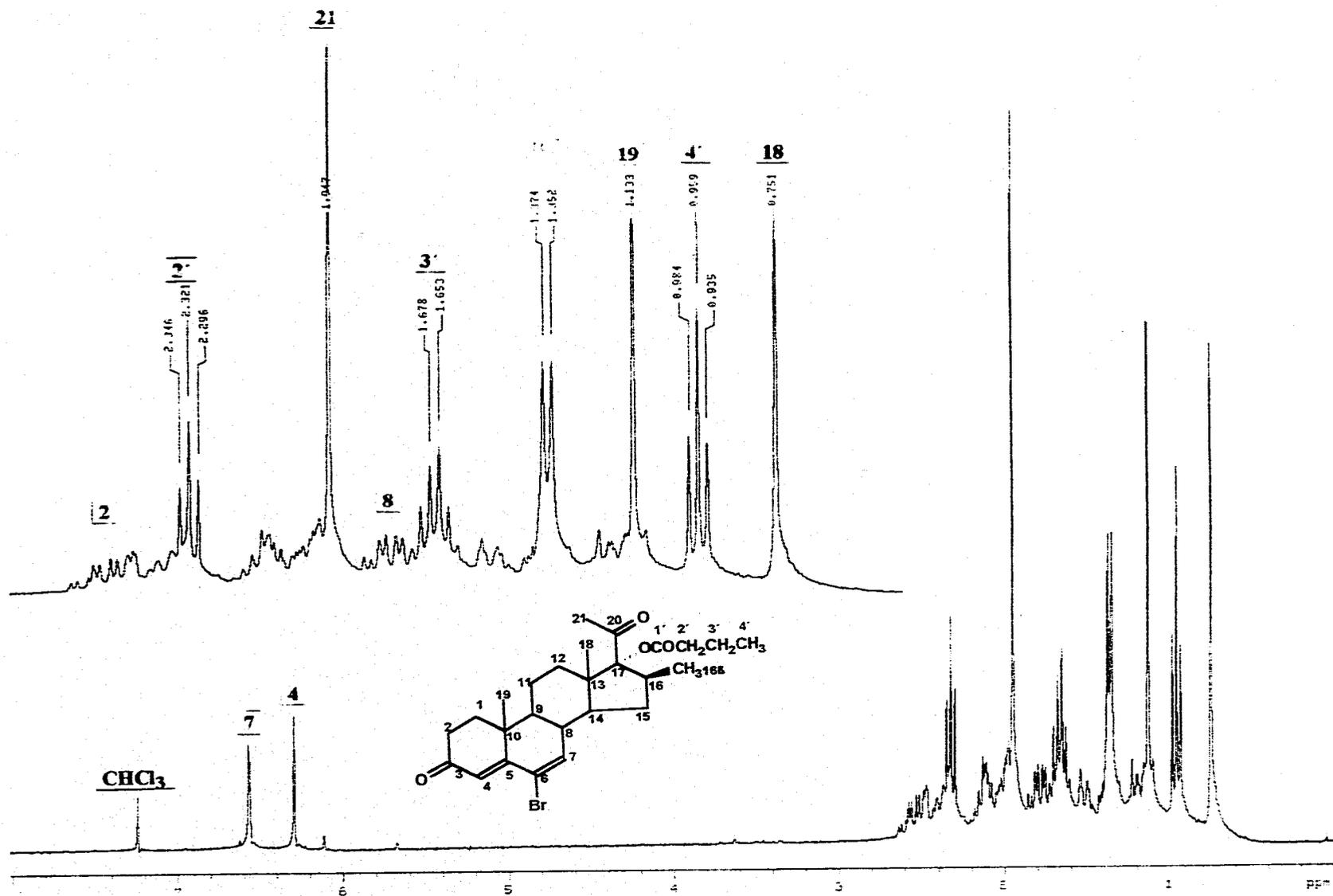


ESPECTRO 23. ESPECTRO DE UV DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.

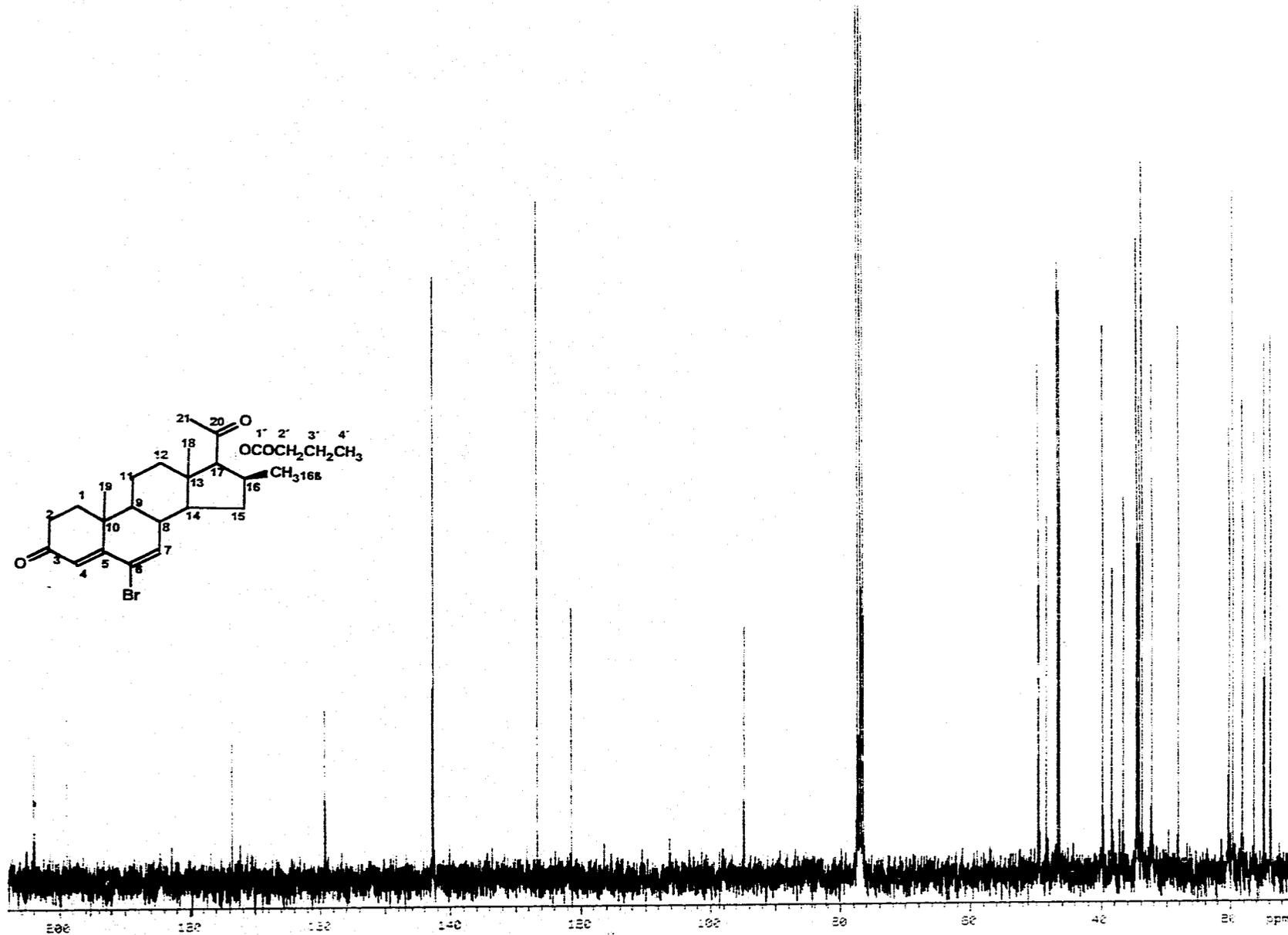
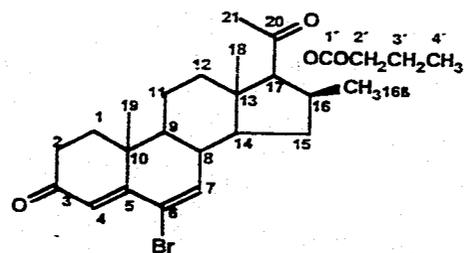
ST



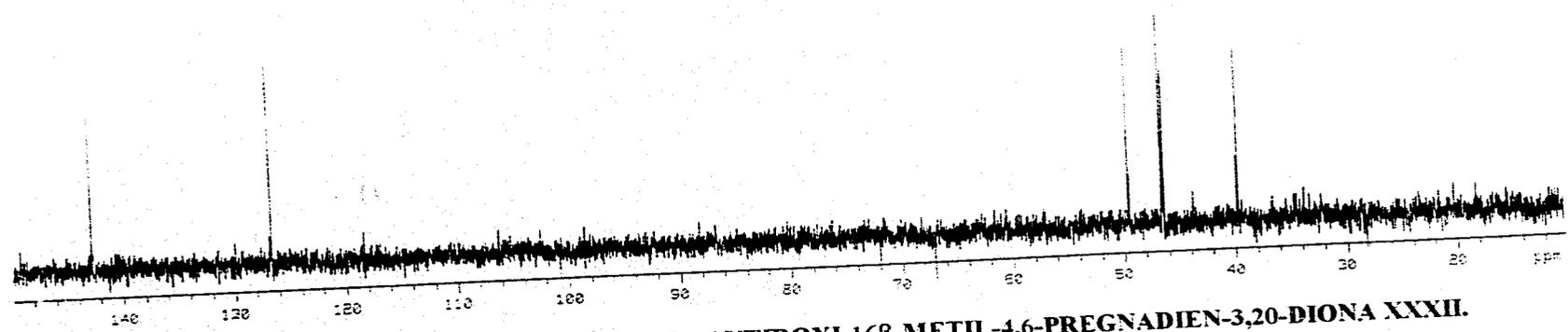
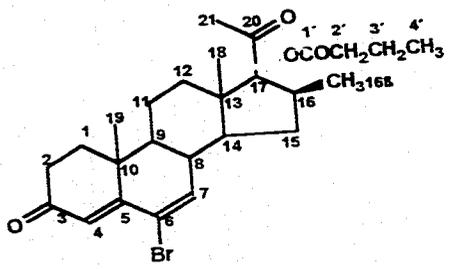
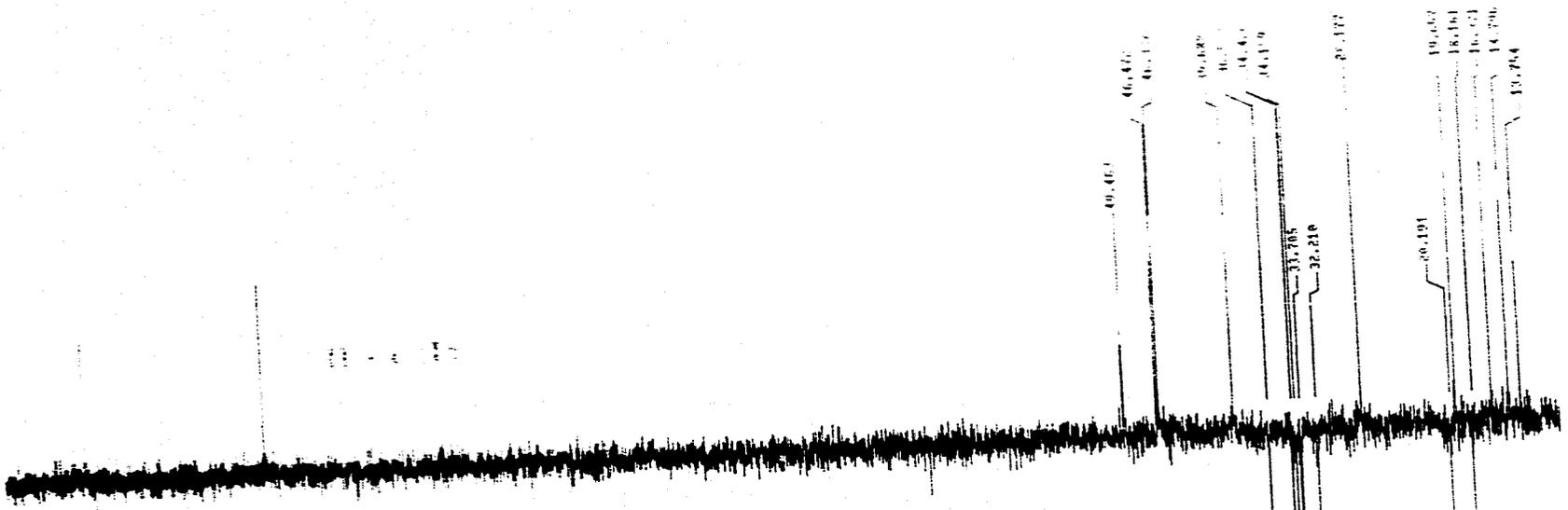
ESPECTRO 24. ESPECTRO DE IR DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.



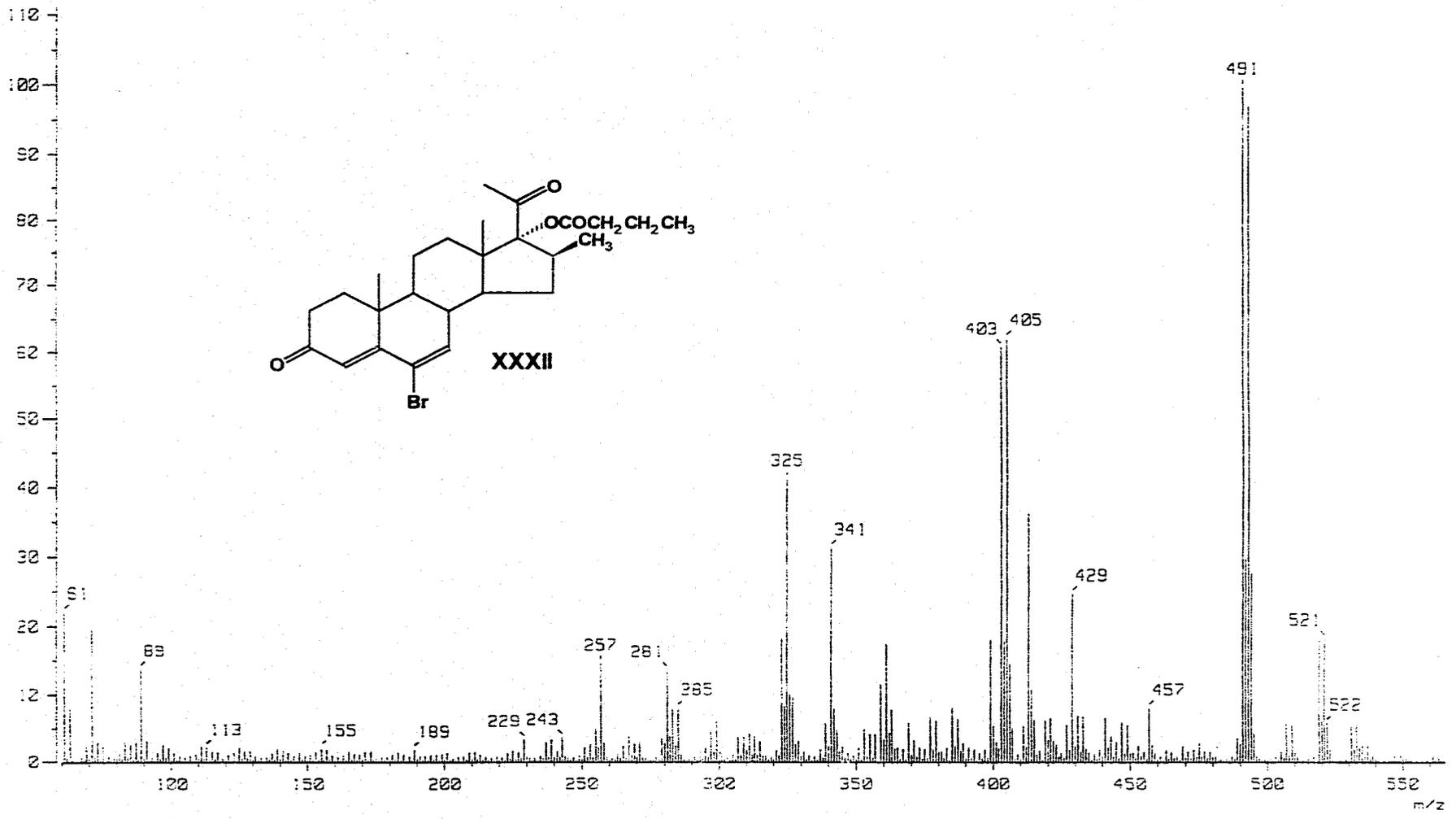
ESPECTRO 25. ESPECTRO DE ¹H RMN DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.



ESPECTRO 26. ESPECTRO DE ^{13}C RMN DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.



ESPECTRO 27. ESPECTRO DEPT DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.



ESPECTRO 28. ESPECTRO MASAS CON IONIZACION QUIMICA DE 6-BROMO-17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-4,6-PREGNADIEN-3,20-DIONA XXXII.

REFERENCIAS.

Agnello, E; Laubach, G. (1960). The dehydrogenation of corticosteroids with chloranil. *J Am. Chem. Soc.* **82**: 4293-

Akagi, S; Tsuda K. (1961) Bromo derivatives of cholesterol. *Chem. Pharm. Bull.* **9**: 464-

Bernstein, S. Litell, R. (1960). *J Am. Chem. Soc.* **82**: 1235

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microquantities of protein. *Ann Biochem.* **72**: 248-

Biffignandi, P; Molinatti, G. et.al. (1987), Antiandrogens and hirsutism, *Hormone Res.* **28**:242-249.

Blunt, J. Stother , J. (1977). 13 CRMN spectra of steroids- A survey and commentary. *Org. Mag. Res.* **9**: 439-464.

Brooks, R; Androgens: physiology and pathology, in *Biochemistry of steroids hormones*, edit. Makin, H. L., Balckwell Sci. Pub. 2nd. Edición 1984: 565-594.

Christiansen, R; Bell, M; (1990), Antiandrogenic Steroidal Sulfonylpyrazoles, *J. Med. Chem.*, **33**: 2094-2100.

Clark, C; Nowell, N. (1979), BOMT is not an androgen antagonist within the central nervous sistem, *Steroids*, **34**: 139-149.

Cooke, B; Vallance, D. (1965), Metabolism of megestrol acetate and related progesterone analogues by liver preparations in vitro, *Biochem. J.*, **97**: 672-677.

Dauben, H; Löken B; Ringold, J. (1954), *J. Am. Chem. Soc.* **76**: 1359.

Deghenghi, R; Revesz, C; et.al. (1963), New synthesis and structure activity relationship in the 17-alkylated progesterone series, *J. Med. Chem.*, **6**: 301-304.

Djcrassi, C. (1951). *Organic Reactions* **6**: 207.

Donn, F; Becker, H. (1989), Effect of Cyproterone acetate in comparison to flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors, *Andrologia*, **21** (5):462-467.

Editorial. (1989), Hormonal therapy of prostate cancer: choosing among several available option, *International Journal of Andrology*, **12**: 165-170.

Eil, C. (1992), Ketoconazole binds to the human androgen receptor, *Horm. metab. Res.* **24**: 367-370.

Frederiksen, D; Wilson, J. (1971). Partial Characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta-4-3-ketosteroid. 5- α -oxidoreductase of rat prostate. *J. of Biol. Chem.* **246**: 2584-2593

Green , M; Tiberi, R; et.al. (1983), Novel 17 α -chloro-17 β -sulfinyl steroids as specific inhibitors of sebaceous gland activity: Potential Antiacne Agents, *J. Med. Chem.*, **26**: 78-85.

Grower, D. The role of cytochrome P-450 in steroidogenesis and properties of some of the steroid transforming enzymes. in *Biochemistry of steroids hormones*, edit. Makin, H. L., Balckwell Sci. Pub. 2nd. Edición 1984: 230-292.

Honma, S; Iwamura, S; et.al. (1977), Identification and Anti-androgenic activity of the metabolites of 17alfa-acetoxy-6-chloropregna-4,6-diene-3,20-dione (chlormadinone acetate) in the rat, rabbit, dog and man, *Chem. Pharm. Bull.*, **25** (8): 2019-2031.

Labrie, C; Trudel, C; et.al. (1991), Combination of antiandrogen and a 5alfa reductase inhibitor: a further step towards total androgen blockade?, *Endocrinology*, **128** (3): 1163-1167.

Löken, B; Kaufmann, S; Rosenkranz, G; Sondheimer, F. (1956), *J. Am. Chem. Soc.* **78**:1738.

Mallamo, J; Pilling, G; et.al. (1972), Antiandrogenic steroidal sulfonyl heterocycles. Utility of Electrostatic Complementarity in defining bioisosteric sulfonyl heterocycles, *J. of Med. Chem.*, **35** (10): 1663-1670.

Merck & Co; Du pont; Neopharmed Sigma-Tau, Yamanouchi. (1992), Testosterona-5alfa eductase inhibitor treatment for BPH, *Drugs Fut.*, **17** (11): 1043-1044.

Meyer, J; et al. (1950). *J Am. Chem. Soc.* **72**: 5145-5147.

Migally, N. (1981), Effect of cyproterone acetate on the mouse adenohipophyses. II. gonadotrophs and somatotrophs , *Archives of andrology*, **6**:127-132.

Migally, N. (1982), Effect of LHRH on cyproterone acetate-injected adenohipophyses of castrated mice, *Archives of andrology* **8**: 247-250.

Midgley, A; Fowkes, G. (1983); The metabolic fate of the anti-androgenic agent oxendolone in man, *Steroids* **41**: 521-536.

Morales, H; Brienne, M; et.al. (1985), Antiandrogenic activity of a series of Des-A-Steroid derivatives, *J. Med. Chem.*, **28**: 1796-1803.

Murphy, G. Current status of therapy in prostatic cancer in managements of prostatic diseases, p.p. 225-229.

Mukherjee, M; Chattopadhyay, S; et.al. (1992), Effect of flutamide on the physiological status epididymis and epididymal sperms, *Andrologia*, **24**: 113-116.

Osawa, J; Spaeth, D. (1971), Estrogen biosynthesis. Stereospecific distribution of tritium in testosterone-1alfa, 2alfa-t2, *Biochemistry*, **10** (1): 66-71

Raynaud, J; Ojasoo, T; et.al. Chemical substitution of steroid hormones: Effect on receptor binding and pharmacokinetics, *Biochemical actions of hormones*, Vol. IX Ed. by Gerald Litwack, Academic Press N:Y., 1982: 305-341.

Raynaud, J; Fiet, J; et.al. (1987), Design of Antiandrogens and their mechanisms of action: A case study (Anandron), *Hormone Res.* **28**:230-241

Shapiro, E; Legatt, T; et.al. (1962), 16-Alkylated progesterones. *J. Med. Pharm. Chem.*

5: 975-988.

Shapiro, E; Weber, L; et.al. (1972), Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylene-17 α -hydroxyprogesterones, *J. Med. Chem.*, 15 (7): 716-

720.

Shering, A. 6-chloro-16 α -methyl-4,6-pregnadien-17 α -ol-3,20-dione acetate, Belg.

Patent. 621,981 (1963), *Chem Abs* 59:10186a .

Shering, A. 1,2 α 16,17 α -dimethylenepregna-4,6-dienes, Brit Patent 1,095,958 (1967),

Chem. Abs., 69:27645a.

Shibata, K; Takegawa, S; et.al. (1992), Antiandrogen I. 2-Azapregnane and 2-

oxapregnane steroids, *Chem. Pharm. Bull.*, 40 (4): 935-941.

Sprencht, H; Jahn, H; Stachowiak A. (1966) Preparation of delta 4,6-3-oxo steroids. *C.*

A. 64: 4245-

Stárka, L; et.al. (1991), Antiandrogenic action of Epitestosterone, Antihormones in health

and disease, Ed. by M.K: Agarwal: Proceedings of the satellite Symposium of the

2nd European Congres, Front Hormone Res Basel, Karger, 19:109-118.

Traish, A; Muller, E; Wotiz, H. (1985), Interaction of cyproterone acetate with rat

prostatic androgen receptors, *Steroids*, 45: 244-262.

Tymoczko, J; Liao, S. (1976), Androgen receptors and molecular basis for the action of antiandrogens in the ventral prostate, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 24:147-162.

Usui, T; Ishibe, T; et.al. (1987), Effect of Diethylstilbestrol diphosphate on activity of 5 α -reductase in human prostate, *Archives of andrology*, 19: 229-235.

Wakeling, A. Anti-hormones and other steroid analogues, *Steroid Hormones, A practical Approach*, Ed. by B. Green; R:E: Leake, IRL Press, Washington, D:C., 1987: 219-236.